

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Toxoplasmose e a Ovelha Serra da Estrela

Avaliação Seroepidemiológica de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* num Estudo Cohort Longitudinal de 2 anos

Daniela Gomes de Almeida

Orientador: Professor Doutor João Rodrigo Gonçalves Goiana Mesquita

Co-orientadores:

Professora Doutora Rita Marisa da Silva Cruz

Dra. Marlene Girão Cabral

Dr. André Filipe Paiva Cambra

Porto, 2021

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Toxoplasmose e a Ovelha Serra da Estrela

Avaliação Seroepidemiológica de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* num Estudo Cohort Longitudinal de 2 anos

Daniela Gomes de Almeida

Orientador: Professor Doutor João Rodrigo Gonçalves Goiana Mesquita

Co-orientadores:

Professora Doutora Rita Marisa da Silva Cruz

Dra. Marlene Girão Cabral

Dr. André Filipe Paiva Cambra

Porto, 2021

Resumo

A Toxoplasmose é uma zoonose importante e causa relevante de abortos em ovinos. Normalmente, as ovelhas são infetadas através da ingestão de oocistos de *T.gondii*, libertados para o ambiente nas fezes de gatos. Abortos podem ocorrer quando as ovelhas são infetadas, pela primeira vez, durante fases precoces da gestação.

A zona centro de Portugal abarca o solar da raça autóctone de ovelhas “Serra da Estrela”, sendo a produção artesanal de queijo “Serra da Estrela” fundamental para a população da região em termos socioeconómicos e culturais. Preocupados pelo crescente número de abortos nesta raça, decidiu-se realizar um estudo de seroprevalência, com o objetivo de averiguar a circulação de anticorpos anti-*T. gondii* nestes ovinos.

Para este efeito, sangue de 168 ovelhas foi recolhido entre janeiro/fevereiro de 2015, e novamente, no mesmo período de 2016. O soro foi separado e utilizado para detetar a presença de anticorpos anti-*T. gondii*, recorrendo a um teste ELISA indireto comercial (microplacas revestidas com antigénio de superfície p30). O teste Qui-Quadrado foi utilizado para estudar diferenças entre as prevalências dos dois anos, sendo um valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Das amostras recolhidas em 2015, 97 animais testaram positivo para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, resultando numa seroprevalência de 57,7% (IC 95%: 49,9-65,3%). No ano de 2016, dos 168 soros, 116 testaram positivo para anticorpos IgG anti-*T.gondii*, revelando uma seroprevalência de 69,1% (IC 95%: 61,5-75,9%). As seroprevalências de IgG anti-*T. gondii* em 2015 e 2016, verificaram-se estatisticamente diferentes, com um valor de $p = 0,031$.

O presente estudo providencia informação prospetiva sobre a serologia anti-*T. gondii*, demonstrando a sua elevada circulação nesta região. Existe necessidade de clarificar a epidemiologia de *T. gondii* em Portugal, idealmente implementando programas de monitorização nacional, pelo seu impacto na saúde animal e por ser uma zoonose importante, tornando-se um problema de Saúde Pública.

Palavras-Chave: Toxoplasmose, Zoonose, Ovelhas Serra da Estrela, Seroprevalência

Agradecimentos

Este trabalho é o culminar de 6 anos de muita aprendizagem e é, de certa forma, uma despedida daquilo que me fez feliz, todos os dias. Espelha todas as pessoas com quem me cruzei nesta jornada. Foram tantas e tão boas que o meu coração fica pequeninho só por pensar que vai ser difícil voltar a rever e conviver com algumas delas. Fui muito feliz nesta casa, sei que fui porque todas as aulas eram uma descoberta, muitos professores eram especiais e todos os que estavam ao meu lado eram amigos.

Quero deixar um agradecimento especial aos meus pais, que mesmo com dificuldades me possibilitaram seguir esta viagem. Aos meus primos, Tony e Patrícia que me mostram o mundo pela sua objetiva e sempre me apoiaram.

A todos os amigos que me acompanharam nesta jornada, a Bia, a Ruiva, a Ninja, a Mendonça, a Sasha, a Rachel, o Dani, o Miniman e o Marcos. Obrigada João, quero verte crescer e ser o Dr. Quirino, que dá aulas e é um fixe para os alunos e para os estagiários. A tua essência é a mais bonita de todas. Um obrigada à Paiva, à Fi, à Leo e à Gabi por serem aquelas amigas que me fazem querer ser sempre a minha melhor versão. Um obrigada às minhas colegas de casa e amigas, Andreia, Guida, Ana e Filipa, que aturaram tanta coisa. À Rose, à Rita, ao Rui e ao David pelos quatro fantásticos meses em Nelas.

Um brinde à minha família Insubordinada, que me roubou noites de sono, mas que me deu o mundo. Convosco aprendi a sonhar e a quebrar as regras (com classe e inteligência). Quero agradecer ao Tio Cambra, que desde o terceiro ano me faz crescer enquanto pessoa e enquanto profissional. Obrigada por todas as horas que despendeste comigo na UPVET e fora dela. Tudo o que sou hoje devo a ti.

Quero agradecer a todos os professores por este caminho espetacular. Estes últimos três anos foram a minha perdição, adorei cada segundo. Agradeço, com especial carinho, ao meu orientador, professor João Mesquita, que fez muito mais por mim do que um orientador precisava de fazer, e o professor sabe disso.

Quero agradecer à equipa da Clínica Veterinária do Dão pela possibilidade de estágio e por todos os momentos divertidos que tive na vossa companhia. Quero agradecer a toda a equipa da UPVET, por tudo o que vivi convosco ao longo do curso e no estágio. Quero agradecer particularmente ao trio maravilha, Dr. André (nunca é demais agradecer-te), à Dr. Raquel e à Dr. Megane e às minhas lindas enfermeiras da noite, a Sara, a Marisa e a Sofia.

Obrigada, Biomédicas. Vou voltar sempre.

Índice

Abreviaturas.....	VII
Enquadramento do Trabalho	1
Estágio Curricular.....	2
<i>PARTE 1- Revisão Bibliográfica</i>	3
1.1 Contextualização Histórica.....	3
1.2 Etiologia, Ciclo de Vida e Transmissão.....	4
1.3 Doença	5
1.4 Epidemiologia.....	10
1.5 Fatores de Risco: O Parasita, o Hospedeiro e o Ambiente	13
1.6 Diagnóstico	15
1.7 Tratamento e Prevenção	18
<i>PARTE 2- Trabalho Prático</i>	20
2.1 Contextualização do Trabalho e Objetivo	20
2.2 Geografia, Clima e Criação	20
2.3 Amostragem e Métodos.....	21
2.5 Discussão.....	24
<i>PARTE 3- Conclusão</i>	28
Referências	29
Anexos.....	36

Abreviaturas

Ac Anticorpo

BID Duas vezes ao dia

BHE Barreira Hematoencefálica

DALYs Anos de vida ajustados por Incapacidade

DAT Teste de aglutinação direta

DGAV Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DNA Ácido desoxirribonucleico

ECDC Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças

EFSA European Food Safety Authority

ELISA “Enzyme-linked immunosorbent assay”

IFN- γ Interferão gama

IFA Ensaio de Imunofluorescência indireta

IgG anti-*T. gondii* Imunoglobulinas G anti- *Toxoplasma gondii*

IL4 Interleucina 4

IL10 Interleucina 10

INSA Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IPMA Instituto Português do Mar e da Atmosfera

MAT Teste de aglutinação Modificada

OIE Organização Mundial da Saúde Animal

PCR Reação de polimerase em cadeia

RT-PCR Real Time PCR

SIDA Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC Sistema Nervoso Central

TID Três vezes ao dia

Th1 Linfócitos T helper 1

Th2 Linfócitos T helper 2

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

Treg Linfócitos T reguladores

T. gondii *Toxoplasma gondii*

UE União europeia

Enquadramento do Trabalho

As amostras utilizadas para o estudo descrito no presente trabalho, foram recolhidas em 2015 e 2016 pela equipa da Clínica Veterinária do Dão/Serravet e foram inicialmente testadas para avaliação de seroprevalência de dois agentes abortivos em ovelhas, o Vírus Schmallenberg e *Coxiella burnetii* (Febre Q).

Foram amostras importantes na medida em que elucidaram sobre a circulação de diferentes causadores de patologia abortiva nas ovelhas “Serra da Estrela”.

Quando, no meu quinto ano de faculdade, escolhi o meu orientador, Professor João Mesquita, falei-lhe da minha vontade de experimentar clínica mista (grandes e pequenos animais) e também a minha vontade de trabalhar, especificamente, com pequenos ruminantes. O professor João lançou-me o desafio de estudar estas mesmas amostras e trabalhá-las para a pesquisa de *T. gondii*. Desafio este que acatei com grande entusiasmo. Acabou ainda por me ajudar a contactar a equipa da Serravet, estabelecendo assim um período de quatro meses de estágio (extracurricular e curricular).

Em 2021, foi publicado o artigo que corresponde à pesquisa de *T.gondii* nestas amostras, espelhando um trabalho realizado em equipa. Por isso, queria agradecer a todas as pessoas que contribuíram e me ajudaram na realização do mesmo, desde a colheita das amostras, avaliação laboratorial, até à análise de dados e construção científica do artigo. Muito obrigada a todos pela vossa ajuda, paciência e boa disposição! Foi uma honra trabalhar convosco.

Estágio Curricular

Durante os quatro meses de estágio curricular, tive a possibilidade de acompanhar dois ambientes distintos, Clínica Veterinária do Dão (CVD)/Serravet e o UPVET.

A CVD/Serravet é uma clínica do tipo misto, localizada na região centro de Portugal, em Nelas. Escolhi este local para realizar 4 meses de estágio (2 extracurriculares e 2 curriculares), porque grande parte do seu trabalho está relacionada com pequenos ruminantes e bovinos de carne, animais com os quais eu não tinha tido oportunidade de contactar durante a frequência do MIMV. Desta forma procurei colmatar uma falha que senti na minha formação. Durante estes 4 meses pude acompanhar saídas de campo e o dia-à-dia da clínica de pequenos animais. Nas saídas de campo pude realizar diferentes tarefas como, colheita de sangue para sanidade de Brucelose, utilização do PISAMobile (programa de Profilaxia e Sanidade Animal), desparasitação e identificação dos animais. Assisti ainda, por exemplo, à resolução de prolapsos uterinos e cesarianas em ovelhas. Pude realizar provas de tuberculinização, vacinação e desparasitação em bovinos de carne. Assisti ainda a inseminações em suínos. A experiência de clínica de pequenos animais foi também nova para mim, pois todos os estágios que realizei ao longo do curso aconteceram em hospitais. Assisti e participei em cirurgias, realizei consultas, participei ativamente nas tarefas de internamento e tive uma maior ligação com os tutores, quer através do contacto telefónico, quer através do contacto e atendimento em receção, o que melhorou, sem dúvida, a minha capacidade de comunicação com os mesmos.

O UPVET é um hospital localizado no centro do Porto. Aqui realizei os últimos 2 meses de estágio curricular, somando-se a outros dois meses realizados em setembro e outubro. Tive a oportunidade de passar pelos diferentes serviços de um hospital de pequenos animais. Alterei e melhorei as minhas capacidades de comunicação aquando da realização de uma consulta. Pude realizar procedimentos muito específicos como colocação de pleurocans, sondas esofágicas e algaliação de gatos obstruídos. Participei ativamente na instituição de protocolos terapêuticos para diferentes casos clínicos e melhorei as minhas capacidades de trabalho em equipa.

Alguns dos procedimentos e casuística podem ser observados nas tabelas IA, IB e II dos Anexos. Estas tabelas não espelham a totalidade do trabalho acompanhado e realizado, no entanto, apresentam a frequência de alguns casos considerados interessantes e situações mais recorrentes no dia-à-dia da CVD/Serravet e do UPVET.

PARTE 1- Revisão Bibliográfica

1.1 Contextualização Histórica

Descoberto em 1908, por Charles Nicolle e Louis Herbert Manceaux, a primeira descrição de *T. gondii* ocorre associada aos Gundi (*Ctenodactylus gundi*), uma espécie norte africana de roedores, tendo sido descoberto no sangue, baço e fígado destes animais (Dubey, 2008; Tenter et al., 2000). Neste mesmo ano, mas no Brasil, *T. gondii* foi observado por Splendore, em coelhos (Dubey, 2008). Anteriormente, teria já sido observado e descrito por diferentes autores, porém pensa-se que a infecção por *T. gondii* terá sido confundida com infecção por *Leishmania* spp. (Weiss & Dubey, 2009). A denominação *Toxoplasma gondii* surge pela sua forma semelhante a um arco, assim, *Toxo* = arco, *plasma* = vida e *gondii* em referência à espécie de roedores onde foi descrito pela primeira vez (Weiss & Dubey, 2009). Ao longo dos anos este parasita foi sendo observado em diferentes animais de sangue quente e, pouco a pouco, o seu ciclo de vida foi descrito e construído. Em 1939, *T. gondii* foi identificado pela primeira vez em crianças com encefalite, por Wolf, Cowen e Paige, comprovando assim o cariz zoonótico deste agente e o seu impacto na saúde humana (Weiss & Dubey, 2009; Wolf et al., 1939).

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, heteroxeno facultativo, tendo, portanto, um ciclo de vida complexo. Os hospedeiros definitivos são os Felídeos, e os hospedeiros intermediários podem ser todos os restantes animais de sangue quente (mamíferos e aves, incluindo o Homem), sendo assim, um parasita muito bem-sucedido no reino animal (OIE, 2019; Tenter et al., 2000). Estando bem-adaptado às várias espécies, inclusive o Homem, este parasita é considerado pelas diferentes organizações de saúde humana e animal, um dos mais importantes a nível mundial; e pela EFSA como uma das doenças parasitárias com um maior “burden of disease” (Koutsoumanis et al., 2018). Estudos de serovigilância (IgG anti-*T. gondii*) realizados mundialmente em humanos, demonstraram seroprevalências anti-*T. gondii* que variam entre 1 e 100%. Esta variação está associada a características socioeconómicas e ambientais, tais como, a higiene, a alimentação, suscetibilidade do hospedeiro, localização geográfica e a humidade do solo (Dubey, 2011; Flegr et al., 2014; Furtado et al., 2011; Tenter et al., 2000). Apesar de não provocar doença grave em adultos saudáveis, pode provocar aborto nas diferentes espécies, alterações congénitas fetais e ainda doença grave em humanos imunocomprometidos (OIE, 2019).

1.2 Etiologia, Ciclo de Vida e Transmissão

Toxoplasma gondii pertence ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoea*, subclasse *Coccidia*, ordem *Eucoccidia*, subordem *Eimeriina*, família *Sarcocystidae* e subfamília *Toxoplasmatinae*. Existe apenas uma espécie do género *Toxoplasma*, *Toxoplasma gondii* (Dubey, 2011).

É nos hospedeiros definitivos (felídeos domésticos e selvagens) que decorre a sua reprodução sexuada, sendo que, nos hospedeiros intermediários (possivelmente, todos os animais de sangue quente) reproduz-se apenas por via assexuada. Até aos anos 70 apenas eram conhecidas as vias de reprodução assexuada deste parasita e só depois foi descoberta a sua capacidade de reprodução sexuada (Dubey, 2009a).

Toxoplasma gondii apresenta três formas morfológicas e infetantes: os taquizoítos, os bradizoítos enquistados em tecidos e os esporozoítos contidos nos oocistos esporulados. Apenas o hospedeiro definitivo é capaz de libertar oocistos nas fezes, já que estes são resultantes da reprodução sexuada, exclusiva deste. Os oocistos resistem no ambiente, podendo ser encontrados não só em objetos (caixas de areia), como também em vegetais e frutas (contaminação telúrica) e ainda na água. É fora do hospedeiro definitivo que ocorre a esporulação dos oocistos, 1 a 5 dias depois de se encontrarem no ambiente, tornando-os infeciosos (Hill & Dubey, 2014). Quando um hospedeiro intermediário contacta com oocistos esporulados e os consome, estes diferenciam-se em taquizoítos que atravessam o epitélio intestinal. Num primeiro momento existe uma reprodução por endodiogenia (um tipo de reprodução assexuada) em que há aumento do número de taquizoítos. Os últimos, disseminam-se pela corrente sanguínea podendo atingir os mais variados tecidos, desde SNC, rim, pulmão, fígado e músculo, por exemplo. Chegados aos tecidos, diferenciam-se em bradizoítos formando quistos. Não se conhece ainda o período pelo qual um quisto pode permanecer no organismo do hospedeiro intermediário, sendo que há autores que referem que estes podem permanecer durante toda a vida; já outros autores acreditam que os quistos raturam ao longo da vida do hospedeiro intermediário dando origem a taquizoítos que enquistam novamente noutros tecidos (Tenter et al., 2000). Além da capacidade de infetar tecidos de órgãos, os taquizoítos de *T. gondii* têm a capacidade de infetar células do sistema imunitário (leucócitos e células dendríticas, por exemplo). Esta capacidade permite a este parasita evadir-se da imunidade do hospedeiro. Este mecanismo foi descrito por Elsheikha e Khan e é conhecido como “Cavalo de Tróia” pensando-se ser um dos mecanismos principais através dos quais *T. gondii* consegue ultrapassar a BHE e a barreira placentária de indivíduos e infetar células cerebrais e o feto, respetivamente (Elsheikha et al., 2010).

Se o hospedeiro definitivo ingerir um destes quistos (por consumo dos tecidos de um hospedeiro intermediário infectado), os bradizoítos contidos nestes, iniciam uma proliferação por endodiogenia chegando às células epiteliais do intestino delgado, onde continuam a sua divisão assexuada por endopoligenia. Após a reprodução assexuada, ocorre o início da gametogonia (reprodução sexuada), também no epitélio do intestino delgado, donde o produto são oocistos. Estes, são libertados pelas fezes do hospedeiro definitivo e contaminam o ambiente (Tenter et al., 2000). Assim sendo, resumem-se as vias de transmissão de *T. gondii* nas seguintes formas:

- ❖ Transmissão Horizontal por oocistos esporulados: em que qualquer hospedeiro, definitivo ou intermediário (incluindo o Homem), pode ser infectado se ingerir material contaminado com fezes de gatos ou outros felídeos infectados com *T. gondii* (Tenter et al., 2000).;
- ❖ Transmissão Horizontal por bradizoítos enquistados: qualquer animal, seja um hospedeiro intermediário ou definitivo pode ser infectado por consumo de quistos bastando apenas consumir tecidos de um animal infectado. No que toca ao Homem, carne crua ou malpassada contendo quistos pode ser potencialmente infectante (Tenter et al., 2000);
- ❖ Transmissão Vertical Verdadeira/ Congénita de Taquizoítos: por via transplacentária da progenitora para o feto. Ocorre tanto em animais como em humanos (Tenter et al., 2000; Elsheikha et al., 2010);
- ❖ Transmissão Vertical Falsa/Horizontal através do Leite por taquizoítos: animais são infectados aquando da ingestão de leite de lactante contaminada (seja a sua progenitora ou outra). Esta via é interessante em Humanos se pensarmos que existe um conjunto de pessoas que manuseia leite cru (como por exemplo ordenhadores, queijeiras) e que basta que levem a mão à cavidade oral para que sejam infectados. Além disso, começam a surgir cada vez mais movimentos naturalistas em que se privilegia o consumo de leite cru (Koutsoumanis et al., 2018).

Posto isto, nos humanos a Toxoplasmose é considerada como uma importante doença veiculada pelos alimentos (ou foodborne disease) (Koutsoumanis et al., 2018).

1.3 Doença

Toxoplasma gondii pode parasitar todos os animais de sangue-quente. Em todos os seres que é capaz de infectar, a sua tendência é a de passar despercebido, ou seja, não

provocando sintomatologia clínica. No entanto, pode ocorrer doença, com diferentes níveis de gravidade, em qualquer hospedeiro, definitivo ou intermediário (Hill & Dubey, 2014).

Hospedeiro Definitivo: as infecções em gatos, provocadas por *T. gondii*, são, na maioria das vezes, assintomáticas. Porém, doença clínica é passível de ocorrer nestes animais e parece estar associada a tratamentos imunossupressores para outras patologias (Calero-Berna & Gennari, 2019). A sintomatologia associada à doença varia em gravidade, sendo que o gato pode apresentar sinais gerais inespecíficos, febre, letargia e anorexia, dispneia (associada a pneumonia) e desconforto abdominal (normalmente devido a hepatite ou pancreatite) e diarreia (Aguirre et al., 2019; Bastan & Bas, 2018; Calero-Berna & Gennari, 2019; Dubey, 2011). Manifestações cutâneas são também uma apresentação possível, e muitas vezes associadas a corticoterapia (Calero-Berna & Gennari, 2019). Os sinais mais graves prendem-se com a componente neurológica e ocular da Toxoplasmose. Em termos neurológicos o gato pode apresentar nistagmos, *circling* central, anisocoria, alterações comportamentais e do estado mental e ataques. Relativamente à apresentação ocular de Toxoplasmose no gato, a uveíte anterior e posterior parecem ser as mais comuns, no entanto a coriorretinite pode surgir. Sinais neurológicos e oculares podem surgir em simultâneo, assim como os restantes sinais inespecíficos (Anca CUCOŞ et al., 2015; Bastan & Bas, 2018). A Toxoplasmose congénita é incomum em gatos, pensa-se que poderá estar relacionado com o curto período de gestação e ainda com o facto das progenitoras segregarem os gatinhos recém nascidos doentes (Dubey et al., 2020).

Homem: usualmente a infeção por *T. gondii* é assintomática. A Toxoplasmose pode apresentar-se em duas formas distintas: adquirida e congénita. A Toxoplasmose adquirida pode ocorrer tanto em indivíduos imunocompetentes como em indivíduos imunocomprometidos. Em pessoas com um sistema imunitário competente, o mais comum é que a infeção por *T. gondii* seja assintomática, podendo eventualmente originar quadros clínicos de doença leve e muito pouco específicos, como febre, apatia, dor de cabeça, fadiga e dores musculares (Aguirre et al., 2019; Dubey, 2011; Flegr et al., 2014). Nalguns casos, se indivíduos com um sistema imune robusto forem infetados por *T. gondii* de linhagem “atípica”, a doença desenvolvida pode ser muito grave e inclusive fatal (Dardé, 2008). Doença agravada, acontece usualmente em indivíduos imunossuprimidos (pacientes com Síndrome da Imunodeficiência adquirida, recentemente transplantados, entre outros) (Dardé, 2008; Hill & Dubey, 2014). O aparecimento de linfadenomegalia é o sinal clínico mais característico da Toxoplasmose aguda (Hill & Dubey, 2014). *Toxoplasma gondii* pode afetar qualquer órgão, mas localiza-se essencialmente no olho e no cérebro (locais onde apresenta sinais clínicos mais graves) (Aguirre et al., 2019).

A Toxoplasmose congénita, resulta da transmissão transplacentária de taquizoítos de *T. gondii*, que infetam o feto em desenvolvimento. Esta transmissão ocorre quando a progenitora já contactou com *T. gondii* e padece de patologias imunossupressoras (Lupus eritematoso sistémico e SIDA), ou quando progenitoras imunocompetentes contactam pela primeira vez com *T. gondii* durante a gestação (Tenter et al., 2000). A probabilidade de transmissão vertical está diretamente relacionada com o tempo de gravidez, já os sinais clínicos apresentados pelo feto/recém-nascido são inversamente proporcionais ao tempo de gravidez (mais graves em infeções em estadios precoces da gravidez). A toxoplasmose congénita pode levar a aborto, morte neonatal e malformações fetais (Dubey, 2011; Flegr et al., 2014; Peyron et al., 2019; Tenter et al., 2000). Os recém-nascidos infetados em estadios mais precoces da gravidez, mas que ainda assim chegam a termo, podem exibir sintomatologia neurológica grave, como hidrocefalia, convulsões e coriorretinite, acabando muitas vezes por falecer (Hill & Dubey, 2014). Aqueles que sobrevivem, apresentam alterações neurológicas progressivas ao longo da vida. Já em fetos infetados no último trimestre de gestação, podem apresentar-se normais ao parto (assintomáticos), sendo que, em qualquer momento da sua vida podem apresentar sinais de Toxoplasmose, como coriorretinite, alterações neurológicas e surdez (Hill & Dubey, 2014; Peyron et al., 2019; Tenter et al., 2000).

Hospedeiros Intermediários (Espécies Pecuárias): No que toca aos restantes hospedeiros intermediários, os bovinos e os equinos parecem ser mais resistentes à toxoplasmose (Dubey, 2011; Hill & Dubey, 2014). Ovinos, caprinos, suínos e frangos são afetados por esta patologia. Os suínos adultos são usualmente assintomáticos, porém em suínos recém-nascidos a Toxoplasmose apresenta elevada mortalidade (Aguirre et al., 2019). Caprinos e ovinos adultos podem desenvolver doença clínica, sendo que esta aparenta ser mais grave em caprinos (Aguirre et al., 2019; Hill & Dubey, 2014). A sintomatologia da Toxoplasmose adquirida é, normalmente, muito leve, tratando-se de uma febre transitória e hiporrexia (Stelzer et al., 2019).

Tem sido nos ovinos que *T. gondii* ganha maior relevância, já que é uma causa importante de perdas económicas nestes animais. Estas perdas relacionam-se, essencialmente com abortos, mas também, com mortalidade neonatal, recém-nascidos com malformações ou com grave condição neurológica (Hill & Dubey, 2014).

Assim como acontece em humanos, a toxoplasmose congénita é normalmente transmitida por ovelhas “naive” infetadas pela primeira vez durante a gestação. A probabilidade de transmissão de *T. gondii* aumenta com o tempo de prenhez (Benavides et al., 2017). Em relação à gravidade das manifestações clínicas resultantes dessa infeção

(quer no embrião/feto/recém-nascido e na placenta) vão depender da fase da gestação em que ocorre infecção. Especula-se que esta variação esteja relacionada com a modulação imunológica da progenitora (Benavides et al., 2017). Embriões/fetos infectados precocemente na gestação poderão ser reabsorvidos/abortados (respectivamente), nascer prematuramente ou apresentar graves condições clínicas aquando do parto (Buxton et al., 2007). Fetos de ovinos infectados tardiamente na gestação terão uma maior probabilidade de sobrevivência, podendo inclusivamente não apresentar sequelas, representando um perigo eminente para a Saúde Pública (animais infectados sem sintomas que atuam como veículo de transmissão ao homem) (Aguirre et al., 2019). Os mecanismos da resposta imunitária da ovelha à infecção de *T. gondii* ainda não são completamente conhecidos. Benavides sugere, em 2017, que:

- ❖ A partir do meio da gestação o feto adquire alguma capacidade de resposta à infecção, promovendo uma reação inflamatória;
- ❖ Pensa-se que, no início da gestação, a progenitora tenha um sistema imune mais competente, fazendo com que infecções numa altura precoce da prenhez sejam menos comuns do que em períodos mais tardios. Porém, nos períodos mais precoces, o feto não apresenta qualquer capacidade de resposta ao agente. Assim, quando *T. gondii* infeta o feto, este não será capaz de montar uma resposta inflamatória;
- ❖ Por outro lado, em fases mais tardias da prenhez, a progenitora apresenta um sistema imunitário menos competente, aumentando a probabilidade de transmissão de *T. gondii*. O feto apresenta algum grau de defesa imunitária que o protege dessa infecção (Benavides et al., 2017).

Em termos de lesões placentárias e fetais, tanto na placenta como nos órgãos do feto existe uma inflamação acentuada, não purulenta, acompanhada de necrose (Benavides et al., 2017):

- ❖ Na placenta: as lesões mais comuns são focos de necrose que surgem como pontos esbranquiçados nos cotilédones (Stelzer et al., 2019). A exuberância das lesões vai aumentando com o tempo de gestação, assim, placentas de fetos infectados tardiamente apresentam lesões mais marcadas. Isto ocorre devido à junção da resposta inflamatória gerada no feto e do sistema imunitário da progenitora (Benavides et al., 2017);
- ❖ No feto: as lesões mais comuns encontram-se no tecido cerebral, sendo que fetos infectados precocemente apresentam maior extensão destas. Nos restantes tecidos,

as lesões são inflamatórias não purulentas com focos de necrose (Benavides et al., 2017).

Em 2019, Pablo Castaño e coautores realizaram um estudo caso-controlo, com objetivo de avaliar a resposta periférica e placentária de ovelhas à infecção experimental com *T. gondii*, em três fases da gestação (início, meio, fim). Perceberam, com este trabalho que:

- ❖ a resposta periférica da progenitora é diferente da resposta a nível placentário;
- ❖ a resposta periférica da ovelha à infecção com o agente não parece variar com as diferentes fases da gestação;
- ❖ ambas as respostas (periférica e placentária) são mediadas por linfócitos Th1, Th2 e Treg e as suas citocinas, IFN- γ e TNF- α , IL4 e IL10, respetivamente. Os Th1 possibilitam uma resposta celular (mais eficaz contra *T.gondii*, por ser um parasita intracelular), os Th2 ativam linfócitos B potenciando a resposta humoral e os Treg regulam toda a atividade anterior (supressão). Assim, o esperado seria que a resposta Th1 da progenitora diminuísse ao longo da gestação, enquanto a resposta Th2 aumenta (poderia justificar o abaixamento da capacidade de defesa da progenitora contra *T.gondii*);
- ❖ o IFN- γ surge quer na resposta periférica quer a nível da placenta, mostrando que a resposta Th1 ocorre nos dois níveis;
- ❖ a nível placentário, uma resposta Th2 parece estar mais associada com a fase precoce e com o meio da gestação (aumento da transcrição de IL-4). O que contraria o que se supunha acontecer;
- ❖ parece existir um aumento da transcrição placentária de IL-10 a partir do meio da gestação, o que indica uma maior ativação dos Treg que diminuem a resposta imunitária. Os autores especulam sobre a possibilidade desta atividade ser desencadeada pelo próprio *T.gondii* como via de atingir a infecção crónica do feto (Castaño et al., 2019).

Este estudo é relativamente recente e foram amostrados poucos animais (total de 36 ovelhas). As conclusões retiradas do mesmo devem ser consideradas, com as devidas precauções. Mais estudos são necessários para elucidar e validar de forma mais robusta as conclusões apresentadas por este grupo.

1.4 Epidemiologia

Existem três variantes genéticas/linhagens clonais principais descritas de *T. gondii*: tipo I, II e III. Estas variantes estão essencialmente presentes na Europa e na América do Norte, que durante muito tempo foram os que mais informação geraram sobre este parasita. No entanto, com o passar dos anos, foram sendo descobertos genomas “atípicos” de *T. gondii* noutras regiões do globo como a Ásia, África e a América do Sul. Em 2008, Dardé compilou informação existente acerca deste tema e percebeu-se que estas “novas variantes” de *T. gondii*, são combinações variáveis de alelos dos tipos “clássicos” (especialmente o tipo I e o III), gerando assim uma maior diversidade genética do que aquela que inicialmente se esperaria para *T. gondii*. Além disto, é também sugerido que, nas populações de animais selvagens, esta diversidade seja ainda maior do que na população humana e de animais domésticos (Dardé, 2008).

No que toca aos diferentes continentes a prevalência das variantes clássicas de Toxoplasmose é diversa. No entanto, é de salientar que, se dentro de um continente, algum país gera mais informação acerca do tipo circulante de *T. gondii* do que outro, o tipo circulante no continente espelha assim esta informação de foco geográfico, no país que mais informação gera (Dardé, 2008). Com esta ressalva, estima-se que:

- ❖ Europa: apresenta, essencialmente, os três tipos clássicos. O tipo II é o que mais vezes surge descrito, sendo a variante mais descrita em França no que toca à Toxoplasmose Congénita Humana. Já em Portugal e Espanha, as variantes mais prevalentes são a tipo I ou III (Dardé, 2008). Tanto quanto se sabia, até 2018 não havia evidência de circulação na Europa de estirpes recombinantes (Koutsoumanis et al., 2018), porém, um estudo recente veio a confirmar a existência de estirpes recombinantes a circular em Portugal quer em animais, quer em humanos (Esteves et al., 2019);
- ❖ Estado Unidos da América: tipo I, II e III (Dardé, 2008);
- ❖ América do Sul: linhagens “atípicas” de *T. gondii*, sendo a zona da Amazónia a que apresenta uma maior diversidade (Dardé, 2008);
- ❖ Ásia e África: pouco explorado. Em África, as recombinações presentes são relativamente fixas e surgiram do tipo I e III (Dardé, 2008);

Seroprevalência de anti-*T. gondii* nos Hospedeiros definitivos

Uma revisão sistemática alargada sobre a seroprevalência de *T. gondii* em felídeos durante um período de 50 anos (1967 a 2017) realizada por Montazeri em 2020, demonstra que, a nível mundial, a prevalência de Toxoplasmose é de cerca de 35% em gatos

domésticos e 59% em felídeos selvagens. Esta prevalência foi ainda mais alta nos gatos domésticos na Austrália e em África, 52% e 51%, respetivamente. Já no continente asiático as prevalências em gatos domésticos foram as mais baixas (27%). Na Europa, os felídeos selvagens atingiram prevalências de 67% (Montazeri et al., 2020).

No Relatório anual de zoonoses produzido pela EFSA e o ECDC, o valor de prevalência apresentado para 2019 é de 10,2%, sendo que, este valor engloba gatos e cães, que se apresentaram à consulta com sinais clínicos de Toxoplasmose (EFSA & ECDC, 2021).

Seroprevalência de anti-*T. gondii* nos Hospedeiros intermediários (excluindo o Homem)

No último relatório conjunto da EFSA/ECDC, referente ao ano de 2019, a prevalência de anticorpos anti- *T. gondii* em pequenos ruminantes (ovelhas e cabras) foi de 13,2%, sendo que esta percentagem tem vindo a diminuir ao longo dos últimos anos (em 2015, a prevalência encontrada foi de 38,8%). Para estes valores contribuíram 14 estados, sendo que, 12 estados eram membros da UE (Membros à data: Alemanha, Grécia, Áustria, Finlândia, Hungria, Irlanda, Itália, Letónia, Países Baixos, Eslováquia, Espanha e o Reino Unido; Não membros: Noruega e Suíça). Nos grandes ruminantes é muito variável, sendo que em 2019 estimou-se uma prevalência de 9,2%, com o contributo de seis estados-membros à data (Áustria, Alemanha, Irlanda, Itália, Letónia e Reino Unido). Nos suínos, quatro estados-membros reportaram informação (Áustria, Alemanha, Itália, Eslováquia), sendo que a prevalência estimada foi de 11,7%. Relativamente, aos animais selvagens, cinco estados-membros contribuíram com informação, sendo que o estado-membro com maior peso foi a Itália, obtendo-se uma prevalência de 19,7% (EFSA & ECDC, 2021). A vigilância ativa sobre a Toxoplasmose na Europa tem algumas limitações, nomeadamente o pequeno número de estados-membros que reportam dados, o facto de não existir um método de testagem uniforme/standard e a não referência à idade e raça dos animais. Tudo isto dificulta a comparação/compilação e tratamento de dados por parte das entidades superiores (EFSA & ECDC, 2021).

Nos Estados Unidos, uma meta-análise levada a cabo por Miao Guo e colegas apresenta dados interessantes. Suínos criados em sistema extensivo revelaram uma prevalência de anticorpos anti-*T.gondii* de 31%, enquanto, suínos criados em regime intensivo apresentam prevalências de anticorpos de 5,6%. Estes dados podem corroborar a teoria de que, animais criados em regime extensivo apresentaram maior prevalência de anticorpos anti- *T. gondii* do que animais criados em sistemas intensivos. Em relação aos pequenos ruminantes, as cabras apresentaram prevalências de 30,7% e as ovelhas de

22%. Foram ainda avaliados dados de frangos com acesso ao exterior, que apresentaram prevalência anti- *T. gondii* de 24,1% (Guo et al., 2016).

Ao longo da zona mediterrânea, existem também variações de prevalência em pequenos ruminantes. No Chipre, uma região do leste mediterrânico, a seroprevalência anti- *T. gondii* ronda os 40,1%(Liassides et al., 2016). No sul de Espanha, o resultado foi de 46,5% em 2020 (Jiménez-Martín et al., 2020), o que não corresponde aos valores apresentados no Relatório de 2019 da EFSA e ECDC, mas parece coincidir com os resultados obtidos em 2018 por Almería (41,2% em ovelhas) (Almería et al., 2018). Em Itália, um estudo realizado por Alessia Gazzonis, na matriz “meat juice” obtida após abate de ovelhas e cabras, revela uma prevalência em ovelhas de 28,6% e de 27,5% em cabras (Gazzonis et al., 2020).

Em Portugal, existem dois estudos focados em animais de produção da região norte de Portugal. O primeiro data de 2009, e foi detetada uma seroprevalência de 17,1% por MAT, sugerindo assim o impacto relevante de *T. gondii* no aborto das ovelhas e nos sinais neurológicos dos cordeiros (infecção congénita) (Sousa et al., 2009). Mais tarde, em 2013, um estudo realizado em diferentes espécies de matadouro (vacas, suínos, cabras e ovelhas) testou, novamente por MAT, a seroprevalência de *T. gondii*. Em ovinos, a seroprevalência encontrada foi de 33,6%, em cabras foi de 18,5%, em suínos de 9,8% e em vacas de 7,5% (Lopes et al., 2013). No que toca à vida selvagem em Portugal, um estudo de 2010 que incluiu, 52 aves selvagens e 20 mamíferos selvagens, das regiões norte e centro do país detetou, através de MAT, seroprevalências de cerca de 50% nas aves e 90% nos mamíferos, originando uma seroprevalência global de 61,1%. Este estudo demonstra a elevada circulação de *T. gondii* em animais selvagens em Portugal (Lopes et al., 2011).

Seroprevalência de anti-*T. gondii* no Homem

Casos de Toxoplasmose são descritos em todo o mundo. Nos Estados Unidos da América, estima-se que a prevalência esteja entre os 9 e os 13% consoante a idade (dados de 2009 e 2010) (Jones et al., 2014). Na União Europeia, no ano de 2019, não foram reportados surtos de Toxoplasmose relacionados com o consumo de produtos animais. Em 2018 registaram-se 208 casos de Toxoplasmose congénita, tendo sido a maioria diagnosticados em França (EFSA & ECDC, 2021).

A incidência de casos de Toxoplasmose é superior em países em desenvolvimento e inferior nos países desenvolvidos (Al-Malki, 2021). As características socioeconómicas relacionam-se de forma mais ou menos direta com a prevalência de Toxoplasmose. A título

de exemplo, no Brasil, grupos com maior estatuto socioeconómico apresentaram seroprevalência de 23%, as pessoas pertencentes à classe média revelaram seroprevalência de 62% e por fim, a classe baixa apresentava seroprevalência de 84% (Al-Malki, 2021).

Em Portugal, a seroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* diminuiu de 47% nos anos 80, para 22% em 2013 (Gargaté et al., 2016). O Norte de Portugal parece ter uma prevalência inferior à região sul, com 13% e 33%, respetivamente (Gargaté et al., 2016). O estudo realizado por Maria Gargaté indica ainda que, mais de 80% das grávidas em Portugal estão vulneráveis a uma infeção primária por *T. gondii*, tendo assim risco de transmitir *T. gondii* ao feto (Toxoplasmose Congénita) (Gargaté et al., 2016). Entre os anos de 2009 e 2013, 21,4% das amostras de soro testadas por suspeita de Toxoplasmose no INSA, foram efetivamente positivas para *T. gondii*. Destes positivos, 97,9% dos casos foram provocados por Toxoplasmose congénita e apenas 2% por adquirida. Do total das amostras positivas testadas, 90,5% das amostras positivas eram de mulheres e 7,2% de homens, já que a maioria dos casos positivos foram associados a Toxoplasmose congénita (Rodrigues et al., 2018). Estes dados não foram transmitidos ao ECDC (ECDC, 2018).

1.5 Fatores de Risco: O Parasita, o Hospedeiro e o Ambiente

Parasita: A virulência das diferentes linhagens clonais (clássicas e atípicas) é normalmente definida através de Bioensaios em ratinhos. Apesar destes estudos serem úteis para determinação de Doses Letais e para diferenciar a virulência dos diferentes tipos clássicos e recombinantes, há uma diversidade de fatores associados ao hospedeiro e ao ambiente que não permitem uma transposição direta da informação obtida nestes bioensaios para a realidade diária. Especificamente em relação a estirpes recombinantes, a sua virulência parece ser mais elevada, tanto *in vivo* como nos cruzamentos realizados em laboratório. Estas estirpes recombinantes mais virulentas são inclusivamente as mais responsáveis por doença clínica em animais e humanos imunocompetentes (Dardé, 2008).

No que toca ao estadio infetante, taquizoítos, bradizoítos ou oocistos, os oocistos são mais eficientes a provocar infeção nos Hospedeiros intermediários. O mesmo não se verifica nos Hospedeiros definitivos. Nos felídeos, uma infeção provocada pela ingestão de bradizoítos é muito mais eficiente, pois além de ter um período pré-patente menor (3 a 10 dias ao invés de, mais de 13 ou 18 dias para taquizoítos e oocistos, respetivamente), quase a totalidade dos hospedeiros definitivos que ingerem bradizoítos libertam oocistos nas

fezes. Por outro lado, a excreção de oocistos, após infecção por taquizoítos ou oocistos, ocorre em apenas cerca de 30% dos Felídeos (Dubey, 2011).

A dose infetante necessária varia muito consoante o hospedeiro e o estadio infetante. Pensa-se que apenas um bradizoíto seja o suficiente para infetar um gato (Cornelissen et al., 2014; Koutsoumanis et al., 2018).

Hospedeiro: O sistema imunitário do hospedeiro é um dos fatores mais importantes. Os grupos de risco são normalmente humanos e animais com um sistema imune comprometido ou fetos de progenitoras “naive” que são infetadas pela primeira vez durante a prenhez (Hill & Dubey, 2014). Todas as patologias que culminem com um abaixamento das defesas do indivíduo, especialmente a imunidade celular por células T, aumentam o risco de desenvolvimento de Toxoplasmose (Weiss & Dubey, 2009). Em Humanos pensa-se inclusivamente que, existem casos de Toxoplasmose clínica que surgem da reativação de infeções antigas (latência), ou seja, indivíduos com quistos de bradizoítos nos tecidos, que, por algum motivo viram a sua imunidade enfraquecida e só então demonstram a doença (Al-Malki, 2021; Tenter et al., 2000). A idade do indivíduo/animal (por exemplo, ovelhas mais velhas) parece ser também um dos fatores de risco no que toca à seroprevalência, já que animais mais velhos têm mais hipótese de já ter contactado com o agente (Almería et al., 2018; Lopes et al., 2013).

Ambiente: o clima de dada região parece afetar a probabilidade de infecção por *T. gondii*. Climas mais frios apresentam prevalências mais baixas, ao contrário de climas com temperaturas mais altas que apresentam maior prevalência (Al-Malki, 2021). De modo a facilitar a apresentação dos diferentes fatores de risco ambientais, serão apresentados os diferentes fatores relacionados com a interface ambiente- animal (animais de pecuária) e ambiente- Homem:

- ❖ Ambiente- Animal: no que toca à infecção de animais de produção por *T. gondii*, um dos fatores de risco mais relevante é a presença do Hospedeiro definitivo nas imediações da exploração, sendo o contacto e consumo de oocistos a principal forma de transmissão de *T. gondii* (Almería et al., 2018). Animais criados em extensivo aparentam ter mais probabilidade de contrair Toxoplasmose do que animais criados em regime intensivo (com boas medidas de Biossegurança) em boa parte dos estudos realizados (Koutsoumanis et al., 2018; Lafrance-Girard et al., 2018). Um estudo realizado na Grécia obteve resultados distintos já que ovinos e caprinos em intensivo apresentaram uma maior prevalência de Toxoplasmose. Isto pode ser devido a falhas de biossegurança, nomeadamente no que toca à

densidade populacional e às instalações que podem servir de abrigo para outros animais (gatos e roedores) (Tzanidakis et al., 2012). A água de bebida é também fundamental, e deve existir garantia da sua qualidade, sendo que os animais não devem ter acesso a águas paradas de superfície (o que se torna difícil em animais em extensivo). A existência de roedores nas explorações é também um risco, sendo que deve ser colmatado com a devida biossegurança interna (dispositivos próprios) (Koutsoumanis et al., 2018). A título de exemplo e segundo Dubey, a intensificação da produção de suínos fez com que a seroprevalência de *T.gondii* diminuísse de tal forma que se verificou a consequente diminuição do risco para a população humana (Dubey, 2009b; Koutsoumanis et al., 2018).

- ❖ Ambiente-Homem: o consumo de carne crua ou mal passada, a ingestão de água ou vegetais contaminados com oocistos e a higiene são os principais fatores de risco para Humanos (Koutsoumanis et al., 2018). O consumo de carne crua ou insuficientemente cozinhada vai depender do contexto gastronómico e cultural do indivíduo (Koutsoumanis et al., 2018). O consumo de alimentos provenientes de animais em produção extensiva vai depender da capacidade económica de cada família assim como das suas crenças pessoais relacionadas com o bem-estar animal (Koutsoumanis et al., 2018; Al-Malki, 2021). A ingestão de leite cru pode, por um lado estar relacionada com regiões mais rurais que consomem o produto animal diretamente sem tratamento, países mais pobres onde existe impossibilidade de comprar produtos termicamente tratados (escassez de mercado ou dificuldade monetária) ou ainda correntes de pensamento naturalistas que apostam no consumo “não processado” dos alimentos (Koutsoumanis et al., 2018). As boas práticas de higiene do indivíduo, como lavar as mãos regularmente após trocar a caixa de areia do seu gato, separar utensílios que contactam com carne crua, o tratamento térmico adequado das carnes, uma lavagem cuidada dos vegetais e frutas antes do consumo, são fundamentais para evitar a disseminação de *T. gondii* (Koutsoumanis et al., 2018). Todas estas pequenas ações dependem diretamente do contexto e do ambiente em que vive o indivíduo.

1.6 Diagnóstico

Existem diferentes métodos de diagnóstico/ pesquisa de *T. gondii in vivo* ou nos produtos para consumo, respetivamente. Os métodos podem basear-se na pesquisa do agente (genoma, antígeno, formas morfológicas) ou pela pesquisa de anticorpos.

Pesquisa do Agente

A pesquisa de *T.gondii* pode ocorrer em diferentes tecidos e fluidos de animais, em carne, bivalves, leite e os seus produtos e água (Koutsoumanis et al., 2018).

Bioensaio Gatos: gatos seronegativos são alimentados com os tecidos/produtos a ser testados (carne, leite e laticínios ou bivalves). À posteriori, são pesquisados anticorpos anti-*T. gondii*, verificando ou não a existência de seroconversão. São ainda realizadas coprologias para pesquisa de oocistos. A vantagem deste tipo de bioensaio é a demonstração da capacidade de infecção e da viabilidade do parasita (Koutsoumanis et al., 2018).

Bioensaio Ratinhos: muito semelhante ao anterior, porém não se pesquisam oocistos nas fezes, mas sim bradizoítos nos tecidos (Koutsoumanis et al., 2018).

Histopatologia: Normalmente este tipo de exames é realizado quando, na prática clínica, o veterinário se depara com lesões nos organismos e deseja saber qual o agente/processo responsável por essas lesões. Existem lesões típicas de Toxoplasmose nos diferentes tecidos que o veterinário pode usar para aferir a origem do processo. Por exemplo, no caso de abortos em pequenos ruminantes infetados, a placenta apresenta focos de coágulos e necrose nos cotilédones que podem mineralizar. Neste caso, a recolha deste material e a análise histopatológica é importante para o diagnóstico de *T. gondii* (OIE, 2019).

PCR: Pode ser utilizado em qualquer tipo de tecido. As zonas do genoma mais pesquisadas são a zona repetitiva B1, o gene SAG1 (que codifica a proteína de superfície p30) e o DNA 18s Ribossomal. O qPCR é utilizado para a amplificação e quantificação da porção do genoma que codifica para o antigénio, sendo bastante dispendioso, mas muito útil quando o objetivo é determinar o número de parasitas presentes nos diferentes tecidos e fluídos (Koutsoumanis et al., 2018; OIE, 2019).

Pesquisa de Anticorpos

A pesquisa de anticorpos anti- *T. gondii* tem sido muito útil em diferentes vertentes. Existem dois tipos de anticorpos passíveis de pesquisa em teste serológico: IgG que indicam normalmente infecção crónica e as IgM que sugerem infeções agudas. Apesar de em termos imunológicos esta relação se verificar, um estudo de 2015 realizado nos Estados Unidos refere que, um resultado positivo para IgG ou IgM anti-*T. gondii*, num laboratório que não seja de referência não pode distinguir de forma precisa entre uma

infecção crônica e uma infecção aguda, respetivamente, sendo portanto fundamental testagem em laboratório de referência (Dhakal et al., 2015).

Sabin-Feldman Dye test/DT: é considerado “Gold Standard” em Humanos. A amostra a testar é o soro. A sua realização exige uma fase de incubação de taquizoítos vivos no soro a testar, um fator acessório (complemento proveniente do soro humano que permite o desencadear do processo) e o azul de metileno. Se na amostra testada existirem anticorpos anti- *T. gondii*, estes vão ligar-se aos taquizoítos e ativar o complemento levando à lise dos mesmos, impedindo que haja uma superfície à qual o azul de metileno se consiga ligar. Por outro lado, se a amostra de soro a testar não contiver anticorpos anti- *T. gondii*, o complemento não será ativado (sem sinalização por parte dos Ac) e, portanto, o azul de metileno liga-se à superfície dos taquizoítos. Assim, uma amostra positiva é uma amostra sem cor e uma amostra negativa é uma amostra com cor (OIE, 2019).

Teste de aglutinação direta/ DAT: baseada na capacidade dos anticorpos (IgG) anti- *T. gondii* aglutinarem taquizoítos. Uma amostra positiva apresenta aglutinação, enquanto que uma amostra negativa apresenta um depósito de taquizoítos (OIE, 2019).

Teste de aglutinação Modificada/ MAT: uma técnica de DAT melhorada em que são testadas também IgM. Isto permite uma redução de falsos negativos nos períodos mais precoces da infecção, ou seja, na infecção aguda (Dubey, 2011; OIE, 2019).

Ensaio de Imunofluorescência indireta/ IFA: muito utilizada para deteção da presença de anticorpos anti- *T.gondii*, porém requer a utilização de microscópio de fluorescência e de espécies específicas de imunoglobulinas fluorescentes. Mesmo não sendo um método caro, como exige equipamento mais específico, pode nem sempre ser o método mais fácil de utilizar. Além disso, os resultados são lidos pelo operador, podendo assim variar consoante o mesmo (algum grau de subjetividade na leitura do teste) (OIE, 2019).

ELISA indireta/ Indirect Enzyme-linked Immunosorbent assay: muito utilizado a nível mundial, especialmente na determinação de seroprevalências. A amostra utilizada é o soro. Neste ensaio, uma placa é impregnada com antigénio de *T. gondii*. Se a amostra de soro contiver Ac anti-*T.gondii*, estes vão ligar-se ao antigénio presente na placa. Um Ac anti-Ac da espécie é adicionado à placa. À ligação entre os dois anticorpos (o anticorpo anti- *T. gondii* da amostra e o anti-anticorpo da espécie em teste) chama-se Conjugado. Esta ligação origina cor, posteriormente lida com o auxílio de um espectrofotómetro com comprimento de onda ajustado ao substrato utilizado (OIE, 2019).

Atualmente, muitos são os cientistas que optam pela utilização do ELISA em detrimento de outros testes serológicos. Um estudo realizado em 2019, em gatos, demonstra que existe uma ótima correlação entre resultados obtidos por MAT e por ELISA (Galat et al., 2019). Em comparação com o IFA, o ELISA demonstra ser uma técnica mais simples, não requerendo material tão específico e é menos dispendiosa para os técnicos, sendo o IFA aconselhado em laboratórios de referência (Sarai et al., 2010).

A testagem serológica é normalmente utilizada em animais vivos e humanos, não sendo comumente aplicada em produtos para consumo humano, já que apresenta consideravelmente menor sensibilidade (Koutsoumanis et al., 2018; Al-Malki, 2021). Porém a sua utilização em fluidos resultantes da carne, por exemplo, é possível (Gazzonis et al., 2020).

1.7 Tratamento e Prevenção

Hospedeiro Definitivo: Em gatos sintomáticos, a utilização de Clindamicina é o tratamento mais comum direcionado para a Toxoplasmose (Calero-Berna & Gennari, 2019). A Clindamicina é um antibiótico bacteriostático da família das Lincosamidas, que bloqueia a síntese proteica na subunidade 50S ribossomal, com largo espectro de ação. Segundo o Formulário BSAVA 2020, no gato, a dose recomendada é de 25mg/kg por via oral, sendo que esta dose deve ser dividida em duas ou três tomas (BID ou TID) diárias. A dose deve ser ainda superior, 30-50 mg/kg por via oral, se existe implicação do SNC. Outras opções nos gatos são a Pirimetamina (antiparasitário que atua no bloqueio da enzima dihidrofolato redutase) conjugado com sulfadiazina (antibiótico bacteriostático do grupo das sulfamidas que bloqueia a síntese de ácido fólico através do bloqueio da dihidroperoxato sintetase) (Dubey, 2005, 2011; Al-Malki, 2021).

Prevenção: gatos com acesso à rua estão mais predispostos à infecção por *T. gondii*, estando gatos indoor mais protegidos. Na alimentação não deverá existir carne crua, já que o seu consumo é um fator de risco para Toxoplasmose (Dubey, 2005; Hill & Dubey, 2014).

Hospedeiro intermediário – Homem: Na medicina Humana, o tratamento é realizado com recurso à associação de Pirimetamina e Sulfadiazina. A associação da Pirimetamina com a Clindamicina pode ser também uma opção, mas não é a primeira escolha. A utilização de Trimetopim-sulfametoxazol também já foi descrita (Al-Malki, 2021).

Prevenção: Confeção adequada das carnes (temperatura superior a 66°C), ou o seu congelamento durante, no mínimo, 2 dias a -12°C. A irradiação da carne garante a segurança alimentar, no entanto não é bem aceite na União Europeia. O consumo de leite pasteurizado é outra ação que reduz a exposição a *T. gondii* (Koutsoumanis et al., 2018). Outras precauções são: lavagem cuidada das mãos sempre que se manuseia a caixa de areia de um gato e se possível, evitar que mulheres grávidas o façam. Caso estas o realizem, devem recorrer ao uso de luvas e executar a tarefa diariamente, evitando o contacto com oocistos esporulados (Hill & Dubey, 2014). Uma lavagem adequada das frutas e vegetais é também fundamental (Koutsoumanis et al., 2018).

Hospedeiros Intermediários – restantes: O tratamento não é realizado.

Prevenção: A mudança de paradigma do consumidor no que toca ao bem-estar animal, não permite que se evite a criação de animais em extensivo. Deste modo é importante que exista garantia de que todos os animais têm acesso a água potável, de que não existam na exploração zonas com águas paradas superficiais, a não permissão do contacto entre hospedeiros definitivos e os animais da exploração (biossegurança externa), forte biossegurança interna no que toca a roedores, a conservação adequada dos alimentos dos animais (local onde hospedeiro definitivo não tenha acesso), são alguns cuidados que podem, só por si, diminuir a prevalência de Toxoplasmose (Koutsoumanis et al., 2018; Stelzer et al., 2019).

Relativamente à Vacinação, a única vacina autorizada no mercado é a Toxovax® e está licenciada em Portugal (Koutsoumanis et al., 2018; OIE, 2019). É uma vacina viva atenuada (S48) para ovinos. Protege contra o aborto, evitando a disseminação de *T. gondii* para a placenta, sendo que há probabilidade de proteger o ovino da disseminação do parasita para outros tecidos (Opsteegh et al., 2015). A vacina pode ser administrada conjuntamente com outras vacinas contra patologias abortivas. Pensa-se que proteja, pelo menos, duas parições (MSD Animal Health, 2021). Estima-se que possa fornecer proteção durante 18 meses, quando são aplicados 2ml da vacina, subcutâneos (Dubey, 2009). Deve ser mantida a 4°C (OIE, 2019). A administração da vacina pode ser prejudicial para o aplicador, devendo ser aplicada por indivíduos experientes (Opsteegh et al., 2015). As ovelhas devem ser vacinadas 3 semanas antes do período reprodutivo, sendo que o protocolo vacinal deve ser decidido pelo veterinário responsável pela exploração (Dubey, 2009; Koutsoumanis et al., 2018; MSD Animal Health, 2021).

PARTE 2- Trabalho Prático

O conteúdo do trabalho prático foi publicado no formato de artigo em revista:

Almeida D, Quirino J, Barradas PF, da Silva PG, Pereira M, Cruz R, Santos C, Mega AC, Esteves F, Nóbrega C, Vala H, Gärtner F, Amorim I, Mesquita JR. A 2-Year Longitudinal Seroepidemiological Evaluation of *Toxoplasma gondii* Antibodies in a Cohort of Autochthonous Sheep from Central Portugal. *Pathogens*. 2021 Jan 6;10(1):40. doi:10.3390/pathogens10010040 (Almeida et al., 2021)

2.1 Contextualização do Trabalho e Objetivo

A zona da Serra da Estrela é conhecida pela sua produção tradicional do “*Queijo de Ovelha Serra da Estrela*”, produto com Denominação de Origem Protegida. O leite utilizado para o fabrico do produto, provém da raça de ovinos Serra da Estrela. Este queijo é reconhecido nacional e internacionalmente como produto de valor acrescentado. A sua comercialização é fundamental para a economia e cultura da região, já que o processo de fabrico engloba pessoas de diferentes idades e contextos sociais, sendo motivo de promoção da região e do seu povo.

Objetivo: Alertados para o crescente número de abortos nas ovelhas “Serra da Estrela”, foi realizado um estudo serológico longitudinal de 2 anos, de modo a aferir a circulação de *T. gondii* na região centro de Portugal.

2.2 Geografia, Clima e Criação

Este estudo foi restrito a ovelhas autóctones raça “Serra da Estrela”, a raça mais abundante e exclusivamente criada na região, de modo a espelhar, da melhor forma possível, a circulação de *T. gondii* nesta população.

A Serra da Estrela encontra-se a uma altitude máxima de 1993 metros, e é a serra mais alta de Portugal Continental, localizando-se na zona centro do país. Esta região é definida como uma pastagem seminatural do Mediterrâneo, sendo uma região acidentada e montanhosa, rica em flora associada ao pastoreio das ovelhas. É uma região com forte circulação de vida selvagem (Monteiro et al., 2021). As temperaturas mais altas fazem-se sentir em julho, já o tempo mais frio do ano é em janeiro com temperaturas que rondam os 0°C, podendo ser negativas (CISE-Seia, 2012). A precipitação da região varia entre os 1000mm/ano na zona do Vale do Mondego, Gouveia e Seia; e os 2500mm/ano nas zonas mais altas; sendo a época das chuvas, usualmente, entre novembro e março. A ANCOSE- Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela, é o órgão responsável pela gestão desta raça autóctone, estando responsável pela sanidade animal da mesma.

Estas ovelhas encontram-se, geralmente, estabuladas no período da noite; e durante o dia, por norma, podem ter acesso a pastagens externas, dependendo da exploração. A reprodução de outras raças, que não as típicas desta zona, não é usual (Monteiro et al., 2021).

2.3 Amostragem e Métodos

Sangue de 168 ovelhas “Serra da Estrela” foi recolhido entre janeiro e fevereiro de 2015. Em janeiro e fevereiro de 2016 repetiram-se as colheitas dos mesmos 168 animais, obtendo-se um total de 336 amostras de sangue. A amostra utilizada para testagem foi soro.

O número de animais a amostrar foi calculado através de uma dimensão da população estimada de 70 000 animais (AniDoP, 2017). A seroprevalência esperada utilizada para os cálculos foi de 17%, de acordo com o estudo realizado por um grupo de autores portugueses, no norte de Portugal, em 2009 (Sousa et al., 2009). O valor de Intervalo de confiança fixado foi de 95% e o erro absoluto (precisão) de 6%. A percentagem de sobreamostragem (contabilização de animais mortos, vendas e substituições) foi de 40% (Esteves et al., 2016). Foi obtido um valor de $n=168$ amostras a recolher.

A amostragem inicial realizada, foi uma amostragem não aleatória propositada. Dentro do leque de animais das diferentes explorações, a população alvo foram:

- ❖ Fêmeas: animais nos quais se verificam os sinais clínicos (aborto);
- ❖ Com mais de 6 meses: por conveniência, já que as colheitas para brucelose se realizam depois da identificação dos animais, e isto pode ocorrer a partir desta idade (consoante também o aporte físico do animal). Ainda porque, desta forma foi impedida a colheita de amostras de animais demasiado jovens que poderiam apresentar ainda anticorpos maternos anti- *T.gondii*, assim seriam positivos sem terem contactado diretamente com o parasita e seria um fator de viés para o trabalho;
- ❖ Com idade adulta, que permitisse, muito provavelmente, a possibilidade de colheita de sangue no ano seguinte (animais com idade avançada foram excluídos para evitar possíveis situações de refugo).

Dentro desta população alvo, a população estudada foi obtida através de amostragem aleatória de quatro animais de cada uma das 42 explorações dos concelhos de Arganil, Carregal do Sal, Celorico da Beira, Fornos de Algodres, Gouveia, Mangualde, Oliveira do

Hospital, Seia e Tábua. Os produtores das ovelhas testadas reportaram nunca ter realizado vacinação contra a Toxoplasmose e ainda que, não teriam à data das colheitas realizado qualquer controlo sobre as movimentações de felinos domésticos, assilvestrados e selvagens.

As amostras de sangue dos 168 animais foram centrifugadas e foi obtido soro. Todos os 336 soros obtidos foram analisados, individualmente, para a presença de anticorpos IgG anti- *T.gondii*, recorrendo a um ELISA comercial multi-espécie (ELISA ID Screen Toxoplasmosis Indirect Multi-Species Kit, IDvet, Grabels, France). Este teste é um ELISA indireto (pesquisa de anticorpos IgG) que utiliza o antigénio p30 (SAG1) de *T. gondii* fixo nas paredes dos poços. A p30 é a proteína de superfície, codificada pelo gene SAG1, mais presente no *T. gondii*, estando cientificamente comprovado que indivíduos infetados aguda ou cronicamente por este parasita apresentam, em circulação sanguínea, anticorpos contra esta proteína (Santoro et al., 1985). Os procedimentos laboratoriais decorreram de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância (ou densidade ótica) foi lida no comprimento de onda de 450nm com recurso à espectrofotometria. Os resultados desta leitura foram avaliados através do cálculo do Rácio de amostras positivas (S/P%). Amostras com um S/P%:

- ❖ inferior ou igual a 40% são consideradas negativas;
- ❖ entre 40 e 50% (exclusive valores limite) são considerados duvidosas. Neste caso as amostras devem ser re-testadas, e se se obtiver novo resultado duvidoso, consideradas negativas. Neste trabalho não existiram amostras duvidosas;
- ❖ igual ou superior a 50% são consideradas positivas.

Para avaliar diferenças entre os resultados das amostras dos anos de 2015 e 2016, foi realizado o teste de Qui-Quadrado (variável dicotómica qualitativa), com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.04. A hipótese nula estabelecida foi “As seroprevalências de 2015 e 2016 não são significativamente diferentes” e a hipótese alternativa “As seroprevalências de 2015 e 2016 são significativamente diferentes”. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado como sendo estatisticamente significativo (IC=95% e $\alpha = 0,05$).

2.4 Resultados

Neste estudo serológico foram encontrados anticorpos IgG anti- *T. gondii*, tanto no ano de 2015 como no de 2016. Das 168 amostras de soro de 2015, 97 amostras testaram

positivo, estimando-se assim, uma seroprevalência de 57,7% (IC 95%: 49,9-65,3%). No total das 168 amostras recolhidas em 2016, 116 testaram positivo, apresentando uma seroprevalência de 69,1% (IC 95%: 61,5-75,9%). A ocorrência de seropositividade nos animais por concelho, encontra-se explicita na tabela 1. As diferenças de seroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* entre as amostras dos anos de 2015 e 2016 foram então avaliadas com recurso ao Qui-Quadrado, obtendo-se um valor de $p=0.031$, rejeitando a hipótese nula, e considerando-as significativamente diferentes.

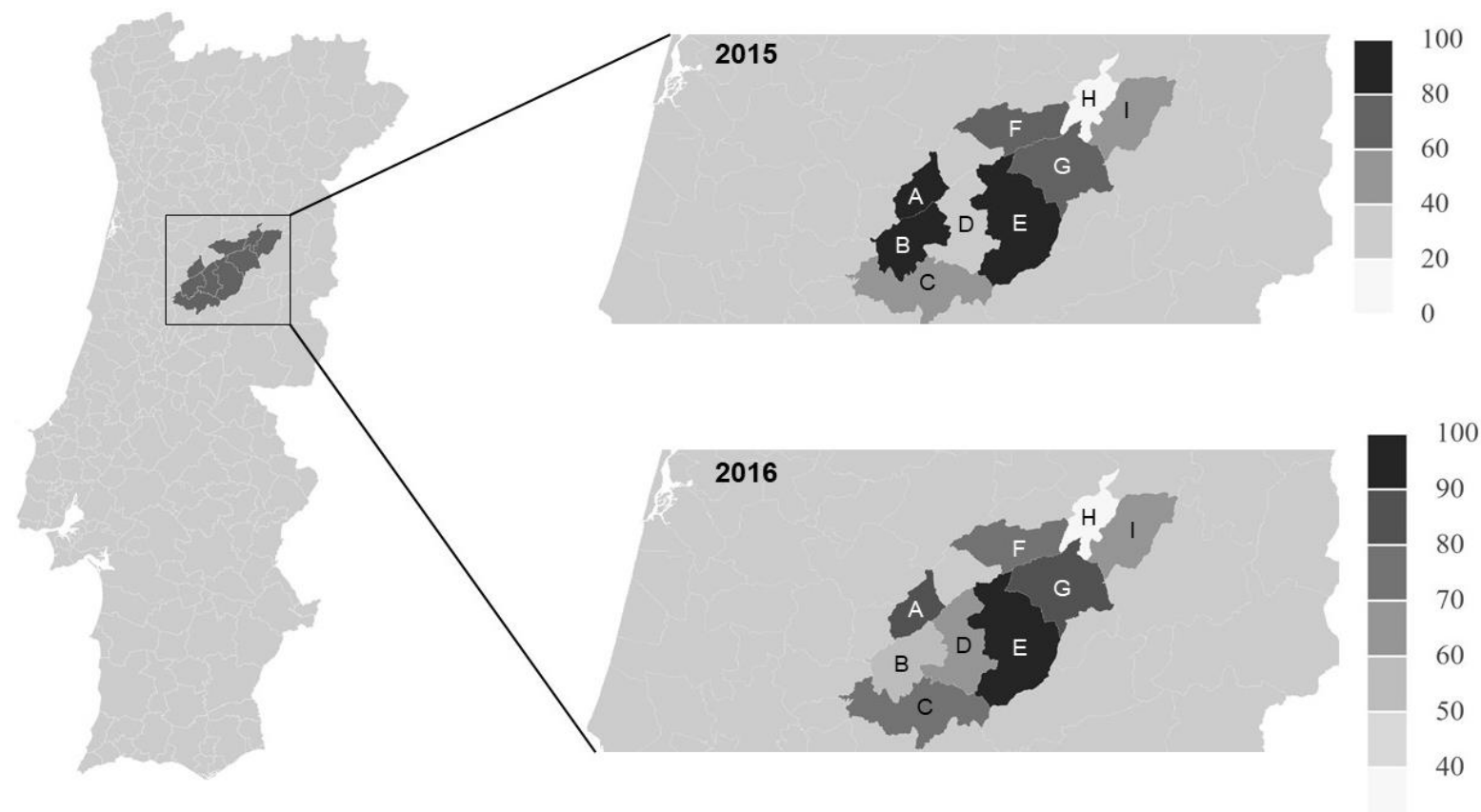
Quando estudada a diferença de prevalência nos anos de 2015 e 2016 para cada um dos nove municípios (ver tabela 1), diferenças estatisticamente significativas foram apenas encontradas em Oliveira do Hospital (valor $p=0,046$). Neste concelho, em 2015, dos 32 animais testados, 12 animais foram positivos para anticorpos IgG anti- *T.gondii* (37,5%; IC 95%: 21,1–56,3%). Já em 2016, 20 dos 32 animais testados foram positivos (62,5%; IC 95%: 43,7–78,9%).

Dos animais que testaram positivo para a presença de anticorpos IgG anti- *T. gondii* em 2015 (97animais), 7 serorreverteram em 2016 (tornaram-se negativos). De 71 animais negativos em 2015, 26 seroconverteram em 2016 (tornaram-se positivos). A incidência de seropositividade observada foi de 37% do ano de 2015 para o ano de 2016.

Tabela 1: Pesquisa de anticorpos IgG anti- *T. gondii* em 168 amostras de soro de ovelhas “Serra da Estrela” nos anos de 2015 e 2016

Município	2015	2016	Nº de Novas Infeções	Valor <i>p</i>
	Anti- <i>T. gondii</i> positivos/total: no. (%; IC)	Anti- <i>T. gondii</i> positivos/total: no. (%; IC)		
Arganil	2/4 (50%; 6.9-93.2)	3/4 (75%; 19.4-99.4)	1	0.465
Carregal do Sal	11/12 (91.7%; 61.5-99.8)	10/12 (83.3%; 51.6-97.9)	-	0.537
Celorico da Beira	14/32 (43.8%; 26.4-62.3)	20/32 (62.5%; 43.7-78.9)	6	0.133
Fornos de Algodres	2/20 (10%; 1.2-31.7)	5/20 (25%; 8.7-49.1)	3	0.212
Gouveia	14/20 (70%; 45.7-88.1)	16/20 (80%; 56.3-94.2)	2	0.465
Mangualde	5/8 (62.5%; 24.5-91.5)	6/8 (75%; 34.9-96.8)	1	0.590
Oliveira do Hospital	12/32 (37.5%; 21.1-56.3)	20/32 (62.5%; 43.7-78.9)	8	0.046*
Seia	33/36 (91.7%; 77.5-98.3)	34/36 (94.4%; 81.3-99.3)	1	0.643
Tábua	4/4 (100%; 39.8-100)	2/4 (50%; 6.9-93.2)	-	0.103
Total	97/168 (57.7%; 49.9-65.3)	116/168 (69.1%; 61.5-75.9)	22	0.031*

Nota: IC: intervalo de confiança de 95%; ND: não determinado; *: valor de $p<0,05$.



Mapa 1: Distribuição visual, por Município, da seroprevalência de anticorpos IgG anti- *T.gondii* nos anos de 2015 e 2016, nos nove diferentes Municípios. Realizado na plataforma digital “Maps in seconds”. A: Carregal do Sal, B: Tábua, C: Arganil, D: Oliveira do Hospital, E: Seia, F: Mangualde, G: Gouveia, H: Fornos de Algodres, I: Celorico da Beira.

2.5 Discussão

Toxoplasma gondii é um dos principais agentes causais de abortos em ovinos (Dubey, 2011). Em Portugal, até à data de hoje, foram apenas realizados dois estudos, na zona Norte do país, que avaliaram a seroprevalência de anticorpos anti- *T. gondii*, em diferentes espécies, incluindo ovinos (Lopes et al., 2013; Sousa et al., 2009). No presente trabalho, apresentamos resultados serológicos sobre a ocorrência de anticorpos anti- *T. gondii*, em dois anos consecutivos, numa raça autóctone de ovelhas (Serra da Estrela), confinada geograficamente à zona centro de Portugal. Acrescenta-se, assim, mais informação sobre a seroepidemiologia de *T. gondii* em ovelhas, em Portugal Continental.

Como resultado da nossa pesquisa, foi observada uma tendência de aumento estatisticamente significativa ($p=0,031$) da seroprevalência de anticorpos IgG anti- *T. gondii* do ano de 2015 (com seroprevalência de 57,7%, IC: 49,9-65,3%) para o ano de 2016 (com

seroprevalência de 69,1%, IC: 61,5-75,9%), tendo ocorrido seroconversão em 26 animais (negativos aquando da colheita da primeira amostra em 2015, sendo positivos aquando da colheita da segunda amostra, um ano depois, em 2016). A tendência de aumento de seroprevalência de anticorpos anti- *T. gondii* verificada do ano de 2015 para o ano de 2016, no presente trabalho, deve ser indicada com cuidado, uma vez que, as amostras de cada ano foram colhidas, exatamente, da mesma população. Assim, o aumento observado estará, muito provavelmente, relacionado com o avançar da idade destes animais, uma vez que se sabe que a exposição/infeção por *T. gondii* se relaciona com a idade, aumentando o risco individual com a mesma. No que toca a outros fatores de risco, não terão ocorrido alterações em termos das 42 explorações amostradas, ou seja, o manejo dos animais manteve-se, não foram aligeiradas nem aplicadas novas medidas de biossegurança externa (a presença do hospedeiro definitivo nas explorações continuou a existir, normalmente estes animais tendem a circular livremente na exploração, tendo contacto direto com os ovinos, as camas, a pastagem e água destinadas ao seu consumo) e interna (no que toca ao controlo de pragas, roedores e aves), obtenção do alimento e da água. Em relação aos fatores de risco relacionados com o clima e as suas alterações, avaliando os boletins climatológicos apresentados pelo IPMA, referentes aos períodos nos quais estes animais estiveram em estudo, a primavera de 2015 e o inverno de 2015/2016 atingiram temperaturas mais elevadas do que no ano imediatamente anterior, o que, pode também ter sido um fator que predispôs/contribuiu para o aumento da probabilidade de exposição a *T.gondii* na população de animais testada (IPMA, 2015a, 2015b, 2016). Uma serorreversão da positividade (ou seja, animais positivos em 2015 apresentaram-se negativos em 2016) foi verificada em 7 animais. Esta evidência não é um relato comum neste tipo de trabalhos, sendo que, num estudo realizado na Escócia, com recurso a sangue de dadores humanos, também foi verificada serorreversão dos indivíduos (Burrells et al., 2016). Esta situação poderá estar relacionada com um abaixamento dos títulos de anticorpos da ovelha para valores incapazes de serem medidos pelo cut-off do teste ELISA realizado.

A nível Europeu, o relatório anual de zoonoses, elaborado conjuntamente pela EFSA e ECDC, que compila dados dos diferentes estados-membros e não membros da União Europeia, reportou que, a toxoplasmose dos pequenos ruminantes, apresentou uma tendência de decréscimo de 38,8% para 18,7% no ano de 2015 para 2016, respetivamente (EFSA & ECDC, 2021). A seroprevalência de *T. gondii* encontrada no presente estudo foi consideravelmente superior à estimada pelo relatório destas organizações europeias, para estes anos. Isto pode significar uma circulação atípica de *T. gondii* na região centro de Portugal. Ressalva-se que, Portugal não participa no report de informação sobre *T. gondii*,

e que, o número de estados a contribuir para estes dados é relativamente baixo. Acrescenta-se também que a EFSA e o ECDC reconhecem que existe bastante dificuldade na compilação da informação reportada pelos diferentes estados, devido ao défice de padronização (método de testagem, dados colhidos das explorações) nos trabalhos realizados pelos diferentes países, no que toca à pesquisa de *T. gondii*. Estas entidades consideram assim, *T.gondii* como um dos agentes zoonótico da Categoria III. Esta categorização espelha esta mesma dificuldade, exigindo muita cautela aquando da comparação de resultados entre os diferentes estados-membros. Portanto, assumir os dados deste relatório como verdadeiros para todo o território europeu pode ser imprudente.

Assim, e com as limitações já abordadas, a seroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* encontrada por nós parece ser mais elevada do que aquela estimada por países vizinhos da zona Mediterrânea, em que as prevalências observadas variaram entre os 28,6% e os 46,5% em ovinos (Gazzonis et al., 2020; Jiménez-Martín et al., 2020; Liassides et al., 2016).

Na região Norte do nosso país, a seroprevalência estimada pelos estudos anteriormente referidos foi de 17,1% e 33,6% em ovelhas, nos anos de 2009 e 2013, respetivamente. Estas evidências foram obtidas por testagem de soro através do método serológico MAT (Lopes et al., 2013; Sousa et al., 2009). Estas seroprevalências são substancialmente inferiores às encontradas por nós em ovelhas da zona da Serra da Estrela. No entanto, a comparação entre estes valores deve ser cuidadosa, já que diferentes metodologias laboratoriais foram utilizadas, MAT e ELISA indireto, que apresentam diferentes sensibilidades e especificidades (ainda assim, os resultados das duas técnicas apresentam uma boa correlação). Assim, e de forma especulativa, estas diferenças tão acentuadas podem dever-se aos diferentes métodos de criação dos animais, sendo estes tipicamente intensivos (fator de proteção) a norte do país e maioritariamente extensivos (fator de risco) nas ovelhas Serra da Estrela. A produção extensiva é considerada como fator de risco já que é difícil controlar os animais selvagens e domésticos que circulam por áreas tão vastas podendo as pastagens e água disponíveis ser contaminadas por oocistos de fezes destes animais. A biossegurança da exploração é outro fator importante e que pode ser fator de proteção quando a sua existência é completa e robusta, ou fator de risco quando a sua existência é mínima ou pouco aplicada. Relativamente à biossegurança interna, a ausência de planos anti-roedores e a utilização de água de poços não tratada são alguns fatores de risco. No que toca à biossegurança externa, a existência de hospedeiros definitivos na exploração e suas imediações, a fraca proteção dos limites das pastagens, deslocação do rebanho para pastos fora da exploração

e aquisição de pasto para os animais provenientes de explorações pouco controladas que produzem alimento, são fatores de risco importantes. Más condições de biossegurança em explorações intensivas podem ser tão relevantes como fator de risco como a criação em regime extensivo (Tzanidakis et al., 2012).

O fabrico artesanal do queijo de Denominação de Origem Protegida “Queijo de Ovelha Serra da Estrela” requer a utilização de leite cru que é conhecido como potencial veículo para a transmissão de taquizoítos de *T. gondii* (Gazzonis et al., 2019; Iacobucci et al., 2019; Mancianti et al., 2013), o que pode representar um risco para quem manuseia o leite na ordenha e aquando da produção do queijo (ordenhadores e queijeiras). Um bioensaio realizado em gatos, demonstrou que, quando estes animais consumiram queijo fresco de leite cru de cabras infetadas experimentalmente com *T.gondii*, existiu excreção de oocistos nas fezes do hospedeiro definitivo. Isto demonstra que *T.gondii* pode manter viabilidade nestes produtos (Dubey et al., 2014).

A amostragem deste trabalho é heterogénea, uma vez que existiam largas diferenças entre as 42 explorações amostradas. Algumas delas trabalhavam claramente em regime extensivo, já outras utilizavam o regime semi-intensivo. Existiam explorações onde a biossegurança era comparativamente melhor do que noutras. Apesar de ser uma falha, é impossível conseguirmos reunir informação apenas de um tipo ou outro de exploração, pois desta forma a amostra não seria representativa. Poderíamos ter optado por um estudo mais aprofundado, recolhendo mais informações, como por exemplo, presença de gatos, origem do alimento animal, origem das águas, tipo de exploração, entre outros, organizando o estudo em clusters e avaliando de forma mais precisa os fatores de risco. Como isto não foi realizado, não podemos apontar de forma clara qual dos fatores de risco abordados ao longo do trabalho é mais impactante nesta região.

A testagem serológica indireta (anticorpo) foi privilegiada dada a sua facilidade de execução, quer em termos de material, quer em termos de procedimento (EFSA & ECDC, 2021).

PARTE 3- Conclusão

A Toxoplasmose é considerada uma das zoonoses parasitárias mais importante a nível mundial, com elevado valor de DALYs, e afeta de forma relevante a produção pecuária, especialmente os ovinos.

A vigilância deste agente em termos nacionais, europeus e mundiais é extremamente precária, uma vez que não existem guidelines pelas quais os diferentes países se possam guiar no que toca à dimensão da amostragem, teste a utilizar nas diferentes situações e informações importantes que devem ser obrigatoriamente colhidas no terreno. Isto impede uma padronização dos dados obtidos, e, consequentemente, uma incerteza sempre que resultados são comparados. Apesar da incerteza acompanhar lado a lado o cientista, é importante reduzir o viés que surge por défice de padronização. Este estudo, com todas as suas limitações, acaba por acrescentar mais informação acerca da seroepidemiologia da Toxoplasmose em ovelhas, em Portugal, dando a perceber que este agente vai ganhando posição no nosso país e que é mandatório que, pelo menos a nível nacional, se perceba o verdadeiro peso de *T. gondii*.

Toxoplasma gondii é, portanto, um ótimo exemplo de um agente de pertinência para a One Health (saúde da tríade: Homem, animais e ambiente), sendo que, apenas com a ajuda conjunta dos diferentes atores deste conceito conseguiremos atuar de forma eficaz para reduzir a exposição a este perigo, atenuando os seus fatores de risco. Faz parte da responsabilidade dos médicos veterinários transmitir informação fidedigna e fundamentada de forma clara quer aos produtores, quer aos tutores, independentemente da área de intervenção.

Referências

- Aguirre, A. A., Longcore, T., Barbieri, M., Dabritz, H., Hill, D., Klein, P. N., Lepczyk, C., Lilly, E. L., McLeod, R., Milcarsky, J., Murphy, C. E., Su, C., VanWormer, E., Yolken, R., & Sizemore, G. C. (2019). The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *EcoHealth* (Vol. 16, Issue 2, pp. 378–390). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>
- Almeida, D., Quirino, J., Barradas, P. F., da Silva, P. G., Pereira, M., Cruz, R., Santos, C., Mega, A. C., Esteves, F., Nóbrega, C., Vala, H., Gärtner, F., Amorim, I., & Mesquita, J. R. (2021). A 2-year longitudinal seroepidemiological evaluation of toxoplasma gondii antibodies in a cohort of autochthonous sheep from central Portugal. *Pathogens*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010040>
- Almería, S., Cabezón, O., Paniagua, J., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Arenas-Montes, A., Dubey, J. P., & García-Bocanegra, I. (2018). Toxoplasma gondii in sympatric domestic and wild ungulates in the Mediterranean ecosystem. *Parasitology Research*, 117(3), 665–671. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5705-6>
- Anca CUCOȘ, C., Ionașcu, I., Mocanu, J., & Militaru, M. (2015). *NEUROLOGICAL AND OCULAR FORM OF TOXOPLASMOSIS IN CATS*.
- AniDoP- Animais Domésticos de Portugal. (2017). *Ovinos- Serra da Estrela*. Visitado a 10/05/2021em: <https://anidop.inia.pt/index.php/racas/racas-autoctones/ovinos/serra-da-estrela>
- Bastan, I., & Bas, B. (2018). Clinical and Some Laboratory Findings in Cats with Toxoplasmosis. *TURKISH JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH TJVR* (Vol. 2, Issue 1). www.dergipark.gov.tr/tjvr
- Benavides, J., Fernández, M., Castaño, P., Ferreras, M. C., Ortega-Mora, L., & Pérez, V. (2017). Ovine Toxoplasmosis: A New Look at its Pathogenesis. *Journal of Comparative Pathology*, 157(1), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.04.003>
- Burrells, A., Opsteegh, M., Pollock, K. G., Alexander, C. L., Chatterton, J., Evans, R., Walker, R., McKenzie, C. A., Hill, D., Innes, E. A., & Katzer, F. (2016). The prevalence and genotypic analysis of Toxoplasma gondii from individuals in Scotland, 2006-2012. *Parasites and Vectors*, 9(1), 324. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1610-6>
- Buxton, D., Maley, S. W., Wright, S. E., Rodger, S., Bartley, P., & Innes, E. A. (2007). Toxoplasma gondii and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. *Veterinary*

Parasitology, 149(1–2), 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.003>

- Calero-Berna, R., & Gennari, S. M. (2019). Clinical toxoplasmosis in dogs and cats: An update. **Frontiers in Veterinary Science** (Vol. 6, Issue FEB, p. 54). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00054>
- Castañó, P., Fernández, M., Regidor-Cerrillo, J., Fuertes, M., Horcajo, P., Ferre, I., Ferreras, M. C., Ortega-Mora, L. M., Pérez, V., & Benavides, J. (2019). Peripheral and placental immune responses in sheep after experimental infection with *Toxoplasma gondii* at the three terms of gestation. **Veterinary Research**, 50(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0681-8>
- CISE-Seia (Centro de Interpretação da Serra da Estrela). (2012). *Clima- Serra da Estrela*. Visitado a 10/05/2021, em: <http://www.cise.pt/pt/index.php/serra-da-estrela/clima>
- Cornelissen, J. B. W. J., van der Giessen, J. W. B., Takumi, K., Teunis, P. F. M., & Wisselink, H. J. (2014). An Experimental *Toxoplasma gondii* Dose Response Challenge Model to Study Therapeutic or Vaccine Efficacy in Cats. **PLoS ONE**, 9(9), e104740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104740>
- Dardé, M. L. (2008). *Toxoplasma gondii* , “new” genotypes and virulence. **Parasite**, 15(3), 366–371. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153366>
- Dhakal, R., Gajurel, K., Pomares, C., Talucod, J., Press, C. J., & Montoya, J. G. (2015). Significance of a positive toxoplasma immunoglobulin M test result in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, 53(11), 3601–3605. <https://doi.org/10.1128/JCM.01663-15>
- Dubey, J. P. (2009a). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology** (Vol. 39, Issue 8, pp. 877–882). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>
- Dubey, J. P. (2009b). Toxoplasmosis in pigs-The last 20 years. **Veterinary Parasitology** (Vol. 164, Issues 2–4, pp. 89–103). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.018>
- Dubey, J. P., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H. A., Kwok, O. C. H., Yang, Y. R., & Su, C. (2020). All about toxoplasmosis in cats: the last decade. **Veterinary Parasitology** (Vol. 283, p. 109145). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109145>
- Dubey, J. P., Verma, S. K., Ferreira, L. R., Oliveira, S., Cassinelli, A. B., Ying, Y., Kwok, O. C. H., Tuo, W., Chiesa, O. A., & Jones, J. L. (2014). Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. **Journal of**

- Food Protection**, 77(10), 1747–1753. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-167>
- Dubey, J.P. (2005). Toxoplasmosis in Cats and Dogs. *World Small Animal Association World Congress Proceedings*. Visitado a 05/05/2021 em: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?meta=&pId=11196&id=3854170>
- Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. ***Veterinary Parasitology***, 163(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.026>
- Dubey, J.P. (2011). Toxoplasmosis of Animals and Humans (Boca Raton (ed.); 2nd ed.). FL: CRC Press.
- Dubey, Jitender P. (2008). The history of Toxoplasma gondii - The first 100 years. ***Journal of Eukaryotic Microbiology*** (Vol. 55, Issue 6, pp. 467–475). J Eukaryot Microbiol. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>
- ECDC. (2018). Congenital toxoplasmosis Annual Epidemiological Report for 2018 Key facts.
- EFSA and ECDC. (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. ***EFSA Journal***, 19(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- Elsheikha, H. M., Naveed, &, Khan, A., & Khan, N. A. (2010). Protozoa traversal of the blood-brain barrier to invade the central nervous system. ***FEMS Microbiology Reviews***, 34, 532–553. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00215.x>
- Esteves, A. (2019). Genetic study of Toxoplasma gondii strains isolated from humans and animals “Documento Definitivo” Doutoramento em Biologia Especialidade de Microbiologia. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa
- Esteves, F., Mesquita, J. R., Vala, H., Abreu-Silva, J., van der Poel, W. H. M., & Nascimento, M. S. J. (2016). Serological Evidence for Schmallenberg Virus Infection in Sheep of Portugal, 2014. ***Vector-Borne and Zoonotic Diseases***, 16(1), 63–65. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1859>
- Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M., & Israili, Z. H. (2014). Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. ***PLoS ONE***, 9(3), e90203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>
- Furtado, J. M., Smith, J. R., Belfort, R., Gattley, D., & Winthrop, K. L. (2011). Toxoplasmosis: A global threat. ***Journal of Global Infectious Diseases***, 3(3), 281–284. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.83536>

- Galat, M., Must, K., Rissanen, K., & Jokelainen, P. (2019). Comparison of a commercial modified direct agglutination test and a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for screening for antibodies against *Toxoplasma gondii* in naturally exposed domestic cats. ***Parasitology Research***, 118(8), 2437–2441. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06368-w>
- Gargaté, M. J., Ferreira, I., Vilares, A., Martins, S., Cardoso, C., Silva, S., Nunes, B., & Gomes, J. P. (2016). *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the Portuguese population: comparison of three cross-sectional studies spanning three decades. ***BMJ Open***, 6(10), e011648. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011648>
- Gazzonis, A. L., Zanzani, S. A., Villa, L., & Manfredi, M. T. (2019). *Toxoplasma gondii* in naturally infected goats: Monitoring of specific IgG levels in serum and milk during lactation and parasitic DNA detection in milk. ***Preventive Veterinary Medicine***, 170, 104738. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104738>
- Gazzonis, A. L., Zanzani, S. A., Villa, L., & Manfredi, M. T. (2020). *Toxoplasma gondii* infection in meat-producing small ruminants: Meat juice serology and genotyping. ***Parasitology International***, 76. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102060>
- Guo, M., Mishra, A., Buchanan, R. L., Dubey, J. P., Hill, D. E., Gamble, H. R., Jones, J. L., & Pradhan, A. K. (2016). A Systematic Meta-Analysis of *Toxoplasma gondii* Prevalence in Food Animals in the United States. ***Foodborne Pathogens and Disease***, 13(3), 109–118. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2070>
- Hill, D. E., & Dubey, J. (2014). Toxoplasmosis. ***Circular***. <https://doi.org/10.3133/CIR1389>
- Iacobucci, E., Taus, N. S., Ueti, M. W., Sukhbaatar, L., Bastsukh, Z., Papageorgiou, S., & Fritz, H. (2019). Detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* DNA within the milk of Mongolian livestock. ***Parasitology Research***, 118(6), 2005–2008. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06306-w>
- IPMA- Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2015a). Boletim Climatológico Sazonal-Inverno 2014/2015. Visitado a 11/05/2021 em: https://www.ipma.pt/resources/www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20150414/NJqhrquhQSvRKDqQYmpn/cli_20150101_20150228_pcl_sz_co_pt.pdf
- IPMA- Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2015b). Boletim Climatológico Sazonal-Primavera de 2015. Visitado a 11/05/2021 no sitio da Internet: https://www.ipma.pt/resources/www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20150611/XjUpvSyUYPeMGdMzLqqo/cli_20150301_20150531_pcl_sz_co_pt.pdf

- IPMA- Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2016). Boletim Climatológico Sazonal-Inverno 2015/2016. Visitado a 11/05/2021 no sitio da Internet: https://www.ipma.pt/resources/www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20160311/ivUKweaTdofvnChSIGfT/cli_20160101_20160228_pcl_sz_co_pt.pdf
- Jiménez-Martín, D., García-Bocanegra, I., Almería, S., Castro-Scholten, S., Dubey, J. P., Amaro-López, M. A., & Cano-Terriza, D. (2020). Epidemiological surveillance of *Toxoplasma gondii* in small ruminants in southern Spain. ***Preventive Veterinary Medicine***, 183. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105137>
- Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Rivera, H. N., Price, C., & Wilkins, P. P. (2014). *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the United States 2009-2010 and comparison with the past two decades. ***American Journal of Tropical Medicine and Hygiene***, 90(6), 1135–1139. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0013>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cacciò, S., Chalmers, R. Robertson, L. (2018). Public health risks associated with food-borne parasites. ***EFSA Journal*** (Vol. 16, Issue 12). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5495>
- Lafrance-Girard, C., Arsenault, J., Thibodeau, A., Opsteegh, M., Avery, B., & Quessy, S. (2018). *Toxoplasma gondii* in Retail Beef, Lamb, and Pork in Canada: Prevalence, Quantification, and Risk Factors from a Public Health Perspective. ***Foodborne Pathogens and Disease***, 15(12), 798–808. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2479>
- Liassides, M., Christodoulou, V., Moschandreas, J., Karagiannis, C., Mitis, G., Koliou, M., & Antoniou, M. (2016). Toxoplasmosis in female high school students, pregnant women and ruminants in Cyprus. ***Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene***, 110(6), 359–366. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw038>
- Lopes, A. P., Dubey, J. P., Neto, F., Rodrigues, A., Martins, T., Rodrigues, M., & Cardoso, L. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. ***Veterinary Parasitology***, 193(1–3), 266–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.001>
- Lopes, A. P., Sargo, R., Rodrigues, M., & Cardoso, L. (2011). High seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild animals from Portugal. ***Parasitology Research***, 108(5), 1163–1169. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2158-6>

- Mancianti, F., Nardoni, S., D'Ascenzi, C., Pedonese, F., Mugnaini, L., Franco, F., & Papini, R. (2013). Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/905326>
- Montazeri, M., Mikaeili Galeh, T., Moosazadeh, M., Sarvi, S., Dodangeh, S., Javidnia, J., Sharif, M., & Daryani, A. (2020). The global serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967-2017): A systematic review and meta-analysis. *Parasites and Vectors* (Vol. 13, Issue 1, p. 82). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3954-1>
- Monteiro, A., Costa, J., Esteves, F., & Santos, S. (2021). Sheep Grazing Management in the Mountain Region: Serra da Estrela, Portugal. *Sheep Farming - An Approach to Feed, Growth and Health*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92649>
- MSD Animal Health. (2021). *Toxovax - MSD Animal Health Republic of Ireland*. Visitado a 07/05/2021 no sitio da Internet: <https://www.msd-animal-health.ie/products/toxovax/>
- OIE. (2019). Toxoplasmosis. *OIE Terrestrial Manual 2019: Vol. 1,2 e 3* (oitava edi, pp. 1753–1764).
- Opsteegh, M., Kortbeek, T. M., Havelaar, A. H., & van der Giessen, J. W. B. (2015). Intervention Strategies to Reduce Human *Toxoplasma gondii* Disease Burden. *Clinical Infectious Diseases*, 60(1), 101–107. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu721>
- Peyron, F., L'ollivier, C., Mandelbrot, L., Wallon, M., Piarroux, R., Kieffer, F., Hadjadj, E., Paris, L., & Garcia -Meric, P. (2019). Maternal and Congenital Toxoplasmosis: Diagnosis and Treatment Recommendations of a French Multidisciplinary Working Group. *Pathogens*. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010024>
- Rodrigues, J., Veigas, S., Rocha, H., & Mateus Letra, T. (2018). *Toxoplasma gondii* na Europa e em Portugal. Instituto Nacional de Saude Doutor Ricardo Jorge. Visitado a 05/05/2021 em: https://www.researchgate.net/publication/331825057_Toxoplasma_gondii_na_Europa_e_em_Portugal
- S. Al-Malki, E. (2021). Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 28, Issue 1, pp. 962–969). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.007>
- Santoro, F., Afchain, D., Pierce, R., Cesbron, J. Y., & Ovlaque, G. (1985). Serodiagnosis of

- toxoplasma infection using a purified parasite protein (P30). ***Clin. exp. Immunol*** (Vol. 62).
- Saraei, M., Shojaee, S., Esmaeli, A., Jahani-Hashemi, H., & Keshavarz, H. (2010). Evaluation of confounders in toxoplasmosis indirect fluorescent antibody assay. ***Iranian Journal of Parasitology***, 5(4), 55–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347267>
- Sousa, S., Thompson, G., Silva, E., Freire, L., Lopes, D., Correia Da Costa, J. M., Castro, A., Carvalheira, J., & Canada, N. (2009). Determination of the more adequate modified agglutination test cut-off for serodiagnosis of toxoplasma gondii Infection in Sheep. ***Zoonoses and Public Health***, 56(5), 252–256. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01187.x>
- Stelzer, S., Basso, W., Benavides Silván, J., Ortega-Mora, L. M., Maksimov, P., Gethmann, J., Conraths, F. J., & Schares, G. (2019). Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. ***Food and Waterborne Parasitology*** (Vol. 15, p. e00037). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037>
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). Toxoplasma gondii: From animals to humans. ***International Journal for Parasitology***, 30(12–13), 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- Tzanidakis, N., Maksimov, P., Conraths, F. J., Kiossis, E., Brozos, C., Sotiraki, S., & Schares, G. (2012). Toxoplasma gondii in sheep and goats: Seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. ***Veterinary Parasitology***, 190(3–4), 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.020>
- Weiss, L. M., & Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. ***International Journal for Parasitology*** (Vol. 39, Issue 8, pp. 895–901). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>
- Wolf, A., Cowen, D., & Paige, B. (1939). Human toxoplasmosis: Occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. ***Science***, 89(2306), 226–227. <https://doi.org/10.1126/science.89.2306.226>

Anexos

Tabela IA: Síntese das atividades realizadas na vertente de Grandes Animais na Clínica Veterinária do Dão/Serravet

Casuística de Pequenos Ruminantes	Nº de casos
Prolapso Uterino em Ovinos	4 animais
Cesariana em Ovinos	7 animais
Peeria em Ovinos	2 explorações
Aborto em Ovinos (<i>Chlamydomphila abortus</i>)	1 exploração
Fratura de Fémur (caprino)	1 animal
Diarreias em Cabritos	1 exploração
Sanidade e Profilaxia de Pequenos Ruminantes (Realizada pela Própria)	Nº de casos
Sanidade Brucelose (ovinos e caprinos)	45 a 50 explorações
Desparasitação Oral (ovinos e caprinos)	45 a 50 explorações
Desparasitação Sistémica (ovinos e caprinos)	45 a 50 explorações
Identificação (Brinco e Chip intra-ruminal)	20 a 25 explorações
Vacinação	20 explorações
Casuística de Bovinos de Carne e Suínos	Nº de casos
Complexo respiratório em vitelos	6 animais (1 exploração)
Abcesso tábua do pescoço (vitelo)	1 animal
Inseminação Artificial Suíno	1 animal
Sanidade e Profilaxia de Bovinos de Carne (Realizada pela Própria)	Nº de casos
Desparasitação Sistémica	28 animais
Vacinação	28 animais
Provas de Tuberculinização	16 animais

Tabela IB: Síntese das atividades na vertente de Pequenos Animais e Exóticos na Clínica Veterinária do Dão/Serravet

Casuística de Pequenos Animais e Exóticos	Nº de casos
Otite Externa (Cão)	+ de 15 casos
Insuficiência Renal (Gato)	+ de 10 casos
Leishmaniose canina	11 casos
Fecaloma Canino	4 casos
Ingestão de Ossos (Cão)	3 casos
Hiperplasia Mamaria Benigna (Gata)	1 caso
Tromboembolismo Aórtico Felino	1 caso
Sarna Demodécica Canina	1 caso
Dermatofitose Felina	1 caso
Fratura de Pénis (Cão)	1 caso
Otites Felinos	1 caso
Abcesso Oral Hámster	1 caso
Doença de Newcastle (suspeita) Papagaio	1 caso
Pneumonia Porquinho da Índia	1 caso
Cirurgia de Pequenos Animais Assistida	Nº de casos
Piometra (Cadela)	4 casos
Cesariana (Cadela)	4 casos
Amputação de membro torácico (cão)	2 casos
Enucleação	1 casos
Cirurgia de Pequenos Animais Realizada pela Própria	Nº de casos
Amputação de cauda (Felídeo)	1 caso
OVH completas	1 Gata, 1 Cadela
Orquiectomia Gato	11 animais
Orquiectomia Cão	2 animais
Remoção de Corpo Estranho junto à região da escápula (Gato)	1 caso

Tabela II: Síntese das atividades realizadas no UPVET (Pequenos animais)

Casuística de Pequenos Animais	Nº de casos
Insuficiência Renal (Gato)	+ de 20 casos
Pancreatite (Gato)	+ de 15 casos
Hiperadrenocorticism (Cão)	8 casos
Lipidose Hepática Gato	7 casos
Triadite (Gato)	7 caso
Parvovirose cão	4 casos
Diabetes Cetoacidótica	3 caso
Linfoma Canino	2 casos
Paraplegia Cão	2 casos
Síndrome Vestibular Periférico (cão)	1 caso
Hérnia Diafragmática (Gato)	1 caso
PIF (com sinais neurológicos)	1 caso
Hipoadrenocorticism (Cão)	1 caso
Cirurgia de Pequenos Animais (Com participação)	Nº de casos
Esplenectomia (Cão)	1 caso
Remoção de corpo estranho (duodeno)	1 caso
OVH Gata	2 animais
Orquiectomia Cão	1 animal
Procedimentos de Urgência (Realizados pela própria)	Nº de casos
Colocação de Sonda esofágica (Gato)	2 casos
Colocação de Pleurocan (Gato)	1 caso
Reanimação (1 cão, 2 gatos)	3 casos
Ecografia abdominal de urgência (Ecofast)	+ 10 casos
Ecocardiografia de urgência (Ecocardiofast)	3 casos
Transusão de Plasma	1 caso
Algaliação de gato obstruído	2 casos