



Virulência e multiplicação de isolados de *Toxoplasma gondii* da região central do Rio Grande do Sul¹

Gustavo C. Cadore², Giovana Camillo², Luis A. Sangioni² e Fernanda S.F. Vogel^{2*}

ABSTRACT.- Cadore G.C., Camillo G., Sangioni L.A. & Vogel F.S.F. 2018. [Virulence and multiplication of *Toxoplasma gondii* isolates from the central region of Rio Grande do Sul, Brazil.] Virulência e multiplicação de isolados de *Toxoplasma gondii* da região central do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(6):1026-1029. Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: fefevogel@gmail.com

The protozoan *Toxoplasma gondii* has the ability to infect several animal species, usually causing reproductive disorders. Four different isolates of *T. gondii* - Pains #1 (P1), Pains #2 (P2), Santa Flora #1 (SF1) and Santa Flora #306 (SF306) were evaluated with prior genotyping. Their virulence and multiplication capacity were analyzed *in vitro* (Vero cells) and *in vivo* (mice). For each isolate, three passages were performed with dose inoculation 1×10^4 tachyzoites at each passage. The mice were daily observed to verify of clinical signs and occurrence of mortality after tachyzoites inoculation. The SF1 isolate and SF306 isolate, presented the highest multiplication of the total tachyzoites number in each of the 3 different passages performed *in vitro* and *in vivo*. The initial clinical signs in mice were observed between 5 and 11 days, and occurring mortality between 6 and 15 days, after inoculation. Thus, the parasitic multiplication of these isolates is similar *in vitro* and *in vivo*; different isolates within the same genotype have a similar virulence and the SF1 isolate is the most virulent for mice.

INDEX TERMS: Virulence, *Toxoplasma gondii*, Rio Grande do Sul, toxoplasmosis, Vero cells, tachyzoites, protozoa, genotypes, parasitoses.

RESUMO.- O protozoário *Toxoplasma gondii* possui a capacidade de infectar diversas espécies animais, geralmente causando distúrbios reprodutivos. Quatro diferentes isolados de *T. gondii* - Pains #1 (P1), Pains #2 (P2), Santa Flora #1 (SF1) e Santa Flora #306 (SF306) - foram avaliados, após prévia genotipagem. A capacidade de multiplicação e virulência destes isolados foi analisada *in vitro* (células Vero) e *in vivo* (camundongos), sendo realizadas 3 passagens para cada isolado em cada modo avaliado, sendo sempre inoculada a dose de 1×10^4 taquizoítos em todas as passagens. Os camundongos eram observados diariamente, quanto à presença de sinais clínicos e ocorrência de mortalidade após inoculação dos taquizoítos. Os isolados SF1 e SF306, foram os que apresentaram maior multiplicação média do número total de taquizoítos em

cada uma das 3 diferentes passagens realizadas para cada um dos isolados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os primeiros sinais clínicos observados nos camundongos ocorreram entre os dias 5 a 11, após inoculação, com mortalidade acontecendo entre os dias 6 a 15, após inoculação. Assim, a multiplicação parasitária *in vitro* é semelhante à multiplicação *in vivo* destes isolados de *T. gondii*; diferentes isolados com o mesmo genótipo apresentam comportamento de virulência semelhante, caracterizando o isolado SF1 como mais virulento para camundongos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: células Vero, taquizoítos, Virulência, *Toxoplasma gondii*, protozoário, genótipos, parasitoses, Rio Grande do Sul, toxoplasmose.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, zoonótico, capaz de infectar mamíferos e aves (Tenter et al. 2000). Nos animais, a doença é caracterizada por distúrbios reprodutivos, gerando perdas econômicas significativas nos

¹ Recebido em 12 de junho de 2017.

Aceito para publicação em 26 de junho de 2017.

² Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Camobi, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: fefevogel@gmail.com

animais de produção (Garcia et al. 1999, Silva et al. 2003, Pescador et al. 2007, Millar et al. 2008). Felídeos são os únicos hospedeiros definitivos de *T. gondii*, podendo excretar oocistos no meio ambiente, que servem como fonte de infecção para outros animais (Dubey 2002). Diversas espécies de aves são infectadas pelo parasito, entretanto, na maioria das vezes, a infecção geralmente é assintomática (Dubey 2002, Dubey et al. 2010), porém já foram descritos sinais clínicos nervosos em galinhas caipiras, com posterior identificação de cistos teciduais e taquizoítos no tecido nervoso destes animais (Dubey et al. 2007). Galinhas (*Gallus gallus*) são aves cosmopolitas e são consideradas importantes hospedeiros intermediários para *T. gondii*, podendo servir como indicadores de contaminação ambiental, devido a grande exposição aos oocistos (Dubey 2002, 2010) e também devido a significativa detecção de cistos e taquizoítos em tecidos de aves soropositivas (Silva et al. 2003, Lehmann et al. 2006).

Para o diagnóstico de *T. gondii*, pode ser realizado o bioensaio em camundongos a partir de tecidos de animais com suspeita de infecção (Dubey 2009). Amostras virulentas de *T. gondii* são letais aos camundongos, induzindo infecção aguda, com possível identificação de taquizoítos nos pulmões, líquido peritoneal e cérebro nos primeiros dias pós-infecção. As amostras avirulentas produzem infecção crônica, com observação de cistos no cérebro e produção e anticorpos específicos (Dubey 2009). Estudos de polimorfismos demonstraram que isolados de *T. gondii* no Brasil, apresentam uma alta diversidade genética (Ferreira et al. 2001, 2006, Pena et al. 2008) e que este parasito, isolado de tecidos de galinhas no Rio Grande do Sul, apresenta sete genótipos diferentes (Dubey et al. 2007). Com isso, na busca de novas informações sobre a distribuição de *T. gondii* e da sua diversidade no Brasil, o objetivo deste estudo foi caracterizar a capacidade de multiplicação e a virulência *in vitro* e *in vivo* de 4 diferentes isolados de *T. gondii* de galinhas naturalmente infectadas em área rural da região central do Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro diferentes isolados de *Toxoplasma gondii* - Pains #1 (P1), Pains #2 (P2), Santa Flora #1 (SF1) e Santa Flora #306 (SF306) - obtidos na região central do Rio Grande do Sul, foram avaliados neste estudo. Estas amostras foram obtidas de cérebro e coração de galinhas de vida livre, provenientes da região central do Rio Grande do Sul. A genotipagem destes isolados foi realizada e classificada anteriormente (Camillo 2015).

A avaliação da capacidade de multiplicação *in vitro* de cada isolado, foi realizada em células Vero (*African Green monkey kidney*), que são linhagens celulares geralmente utilizadas para manutenção de cultivos de *T. gondii* (De Meerschman et al. 2002, Saadatnia et al. 2010). As células foram mantidas em frascos para cultivo celular de 25cm² (Nunclon Roskilde, Denmark) em meio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, New York, NY, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Life Technologies, New York, NY, USA), incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Para cada um dos 4 diferentes isolados e em cada passagem celular, as células foram inoculadas sempre com um título final de 1x10⁴ taquizoítos, quando o tapete celular apresentava uma confluência de aproximadamente 85% (Saadatnia et al. 2010). Foram realizadas 3 passagens celulares distintas em cada isolado, sendo os cultivos examinados periodicamente através de microscópio invertido. Quando ocorria

destruição máxima do tapete celular (3-5 dias após inoculação), o sobrenadante da cultura era coletado para contagem total de taquizoítos em câmara de Neubauer. Cada experimento foi repetido em triplicata (três cultivos independentes, com três contagens de taquizoítos cada).

Para avaliar a virulência *in vivo* dos 4 isolados, foram utilizados um total de 48 camundongos Swiss, com 3 semanas de idade. Foram realizadas 3 passagens para cada isolado, com utilização de 4 animais em cada uma delas. Avaliação diária dos sinais clínicos e letalidade nos animais inoculados com os isolados de *T. gondii* foi realizada, totalizando o uso de 12 camundongos para cada um dos 4 isolados testados. Em cada animal foi inoculado a dose de 1x10⁴ taquizoítos, suspenso em 0,2mL de meio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, New York, NY, USA), injetado pela via intraperitoneal. Após a morte dos animais, os parasitas eram coletados da cavidade peritoneal através de lavagem com 5mL de meio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, New York, NY, USA), para contagem em câmara de Neubauer.

Todos os procedimentos de manejo e experimentação animais foram realizados de acordo com as recomendações do Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea; Lei nº 6.638 de 8 de Maio, 1979) e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), registrado no número CEUA-UFSM 049/2012.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número médio de taquizoítos coletados em cada uma das diferentes passagens em células Vero, entre os diferentes isolados de *Toxoplasma gondii*, está apresentado no Quadro 1. Os isolados SF1 e SF306, foram os que apresentaram maior crescimento médio do número total de taquizoítos em cada uma das 3 diferentes passagens realizadas para cada um dos isolados. A avaliação da capacidade de replicação *in vitro* e a quantificação do crescimento no número total de taquizoítos é importante tanto para produção e manutenção de estoques (Evans et al. 1999, Mavin et al. 2004), quanto para desenvolvimento ou realização de testes laboratoriais

Quadro 1. Média da produção *in vitro* de taquizoítos, de quatro diferentes isolados de *Toxoplasma gondii* inoculados em células da linhagem Vero

Isolado (genótipo)	Passagem	Taquizoítos ^a	
		Média coletada	Índice de multiplicação
Pains #1 (ToxoDB #11)	1 ^a	1,3 x 10 ⁴	1,3 x
	2 ^a	1,6 x 10 ⁴	1,6 x
	3 ^a	2,3 x 10 ⁴	2,3 x
Pains #2 (ToxoDB #11)	1 ^a	1,3 x 10 ⁴	1,3 x
	2 ^a	1,7 x 10 ⁴	1,7 x
	3 ^a	2,5 x 10 ⁴	2,5 x
Santa Flora #1 (ToxoDB #64)	1 ^a	1,7 x 10 ⁶	170 x
	2 ^a	4,5 x 10 ⁵	45 x
	3 ^a	3,7 x 10 ⁵	37 x
Santa Flora #306 (ToxoDB #55)	1 ^a	1,4 x 10 ⁶	140 x
	2 ^a	5,6 x 10 ⁵	56 x
	3 ^a	3,7 x 10 ⁵	37 x

^a Inoculação inicial na dose de 1x10⁴, em todas as passagens.

(Joss et al. 1989, Ashburn et al. 2000). Outras finalidades e vantagens da manutenção *in vitro* de estoques viáveis de taquizoítos de *T. gondii*, é a redução dos custos de manutenção (Ashburn et al. 2000), bem como evitar ou diminuir o uso de cobaias, por questões éticas, quanto a redução do risco de infecção humana acidental no momento da manipulação ou inoculação de animais.

Os isolados P1 e P2, que possuem genótipo ToxoDB #11 (Camillo 2015), apresentaram níveis de multiplicação *in vitro* semelhante, entre cada uma de suas passagens, com ambos possuindo maiores índices de multiplicação na sua terceira passagem (Quadro 1). Já os isolados SF1 possui genótipo ToxoDB #64; e SF306 com genótipo ToxoDB #55 (Camillo 2015), mostraram elevados índices de multiplicação de taquizoítos *in vitro* na primeira passagem. Porém, nas duas passagens subsequentes, ocorreu redução no número médio de taquizoítos viáveis recuperados (Quadro 1). As células de linhagem Vero, são comumente utilizadas para multiplicação e manutenção laboratorial de *T. gondii* (De Meerschman et al. 2002, Saadatnia et al. 2010), sendo o tipo celular escolhido para avaliação deste trabalho. Taquizoítos de *T. gondii*, conhecidamente possuem a capacidade de invadir diversos tipos de células nucleadas, em diferentes espécies animais (Miller et al. 1972, Canfield et al. 1990, Inskeep 2nd et al. 1990, Hartley & Dubey 1991, Dubey et al. 1998, Evans et al. 1999, Chatterton et al. 2002, Lei et al. 2005) e o comportamento referente a quantidade de multiplicação pode estar ligado a uma maior adaptação do tipo de isolado ou tipo celular utilizado para sua manutenção (Diab & El-Bahy 2008).

Os camundongos inoculados com os 4 diferentes isolados de *T. gondii* (P1, P2, SF1 e SF306) foram observados diariamente quanto a apresentação dos sinais clínicos de infecção. Os primeiros sinais clínicos foram observados entre 5 a 10 dias após a inoculação (dados não mostrados). Entre os principais sinais clínicos da doença, foram observados: pelos eriçados, lacrimajamento, emagrecimento, diarreia e distensão abdominal. Dependendo da gravidade dos sinais clínicos ou quando os camundongos apresentavam uma condição clínica de doença avançada, estes eram submetidos à eutanásia para coleta de líquido peritoneal. A presença de taquizoítos viáveis de *T. gondii* obtidos no lavado intraperitoneal, após a morte dos camundongos, foi observado em todos os animais. A média de produção de taquizoítos viáveis encontrados nos camundongos inoculados, em cada uma das três passagens, está demonstrada no Quadro 2.

A mortalidade dos camundongos ocorreu entre o dia 6 (dois animais inoculados com o isolado SF1, na primeira passagem) e o dia 15 (um animal inoculado com o isolado P1, na primeira passagem), após inoculação dos taquizoítos. Os animais inoculados com os isolados P1 e P2 apresentaram os primeiros sinais clínicos de infecção entre os dias 9 a 11 após serem inoculados, com mortalidade ocorrendo entre os dias 12 a 15 após inoculação. Camundongos inoculados com o isolado SF1, demonstraram os primeiros sinais clínicos nos dias 5 e 6 pós-inoculação, com mortalidade sendo observada entre os dias 6 a 9 pós-inoculação. Por fim, os animais inoculados com o isolado SF306, começaram a apresentar sinais clínicos entre os dias 7 a 11 após inoculação e mortalidade de todos os camundongos nos dias 11 e 12 após inoculação. A virulência de *T. gondii* é bastante variável, sendo que entre

Quadro 2. Média da produção *in vivo* de taquizoítos, de quatro diferentes isolados de *Toxoplasma gondii* inoculados em camundongos

Isolado (genótipo)	Passagem	Taquizoítos ^a	
		Média coletada	Índice de multiplicação
Pains #1 (ToxoDB #11)	1 ^a	1 x 10 ⁴	1 x
	2 ^a	1,4 x 10 ⁴	1,4 x
	3 ^a	1 x 10 ⁵	10 x
Pains #2 (ToxoDB #11)	1 ^a	1 x 10 ⁵	10 x
	2 ^a	5 x 10 ⁵	50 x
	3 ^a	1 x 10 ⁵	10 x
Santa Flora #1 (ToxoDB #64)	1 ^a	1,5 x 10 ⁶	150 x
	2 ^a	3,7 x 10 ⁵	37 x
	3 ^a	1,6 x 10 ⁵	16 x
Santa Flora #306 (ToxoDB #55)	1 ^a	1,1 x 10 ⁵	110 x
	2 ^a	3,7 x 10 ⁵	37 x
	3 ^a	1,7 x 10 ⁵	17 x

^a Inoculação inicial na dose de 1x10⁴ taquizoítos, em todas as passagens.

estes fatores podem estar relacionados à cepa ou genótipo do isolado, ao estágio evolutivo que se encontra o parasita e também quanto à dose que foi inoculada (Dubey et al. 2004). Neste estudo, como as doses inoculadas (1x10⁴) e os estágios evolutivos (taquizoítos), eram os mesmos em todas as passagens, sugere-se que os isolados SF1 e SF306 são os mais virulentos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, apesar destes aparentemente perderem sua capacidade infectante de forma gradativa (Quadros 1 e 2).

O genótipo ToxoDB #11, que foi encontrado nos isolados P1 e P2, apresentaram características de virulência semelhante tanto *in vivo* quanto *in vitro*, já havia sido descrito causando infecção em gatos e galinhas no Brasil (Dubey et al. 2004, 2008) e em galinhas na Argentina (Rajendran et al. 2012). O genótipo ToxoDB #55, observado no isolado SF306, também foi anteriormente descrito em gatos no Brasil (Pena et al. 2006), tendo demonstrado uma elevada virulência quando inoculado em camundongos, com altos índices de mortalidade (Pena et al. 2008), igualmente como descrito neste estudo. O isolado SF1, que possui genótipo ToxoDB #64, também já foi descrito anteriormente em galinhas no Brasil (Dubey et al. 2008). O SF1 foi o isolado de *T. gondii* que apresentou maior virulência entre os demais testados neste estudo, pois apresentou elevados índices de produção de taquizoítos, com mortalidade dos camundongos inoculados ocorrendo logo aos 6 dias após receberem o inóculo inicial.

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos foi verificado um comportamento de multiplicação parasitária *in vitro* semelhante com a multiplicação *in vivo* entre os isolados de *Toxoplasma gondii* testados.

Também ficou demonstrado que diferentes isolados, mas que possuem o mesmo genótipo, apresentam comportamento de virulência semelhante, sendo que o genótipo ToxoDB #64 encontrado no isolado SF1, foi o mais virulento para camundongos, quando comparado entre os demais testados.

REFERÊNCIAS

- Ashburn D., Evans R., Chatterton J.M., Joss A.W. & Ho-Yen D.O. 2000. Toxoplasma dye test using cell culture derived tachyzoites. *J. Clin. Pathol.* 53(8):630-633. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.53.8.630>. PMID:11002769.
- Camillo G. 2015. *Toxoplasma gondii* em galinhas domésticas: epidemiologia, isolamento e caracterização molecular. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, RS. 88p.
- Canfield P.J., Hartley W.J. & Dubey J.P. 1990. Lesions of toxoplasmosis in Australian marsupials. *J. Comp. Pathol.* 103(2):159-167. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80172-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80172-7). PMID:2246391.
- Chatterton J.M., Evans R., Ashburn D., Joss A.W. & Ho-Yen D.O. 2002. *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. *J. Microbiol. Methods* 51(3):331-335. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00101-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00101-X). PMID:12223293.
- De Meerschman F., Rettigner C., Focant C., Boreux R., Pinset C., Leclipteux T. & Losson B. 2002. Use of a serum-free medium to produce in vitro *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites on Vero cells. *Vet. Res.* 33(2):159-168. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2002004>. PMID:11944805.
- Diab M.R. & El-Bahy M.M. 2008. *Toxoplasma gondii*: virulence of tachyzoites in serum free media at different temperatures. *Exp. Parasitol.* 118(1):75-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2007.06.009>. PMID:17904554.
- Dubey J.P. 2002. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet. Parasitol.* 106(2):121-153. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00034-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00034-1). PMID:12031816.
- Dubey J.P. 2009. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, p.1-318. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420092370>.
- Dubey J.P. 2010. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health* 57(1):60-73. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x>. PMID:19744305.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. & Speer C.A. 1998. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(2):267-299. PMID:9564564.
- Dubey J.P., Navarro I.T., Sreekumar C., Dahl E., Freire R.L., Kawabata H.H., Vianna M.C.B., Kwok O.C.H., Shen S.K., Thulliez P. & Lehmann T. 2004. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.* 90(4):721-726. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-382R>. PMID:15359466.
- Dubey J.P., Sundar N., Gennari S.M., Minervino A.H., Farias N.A., Ruas J.L., Santos T.R., Cavalcante G.T., Kwok O.C. & Su C. 2007. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Paraná state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.* 143(2):182-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.024>. PMID:16982151.
- Dubey J.P., Velmurugan G.V., Chockalingam A., Pena H.F.J., Oliveira L.N., Leifer C.A., Gennari S.M., Oliveira L.M.G.B. & Su C. 2008. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet. Parasitol.* 157(3/4):299-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.036>. PMID:18804329.
- Dubey J.P., Rajendran C., Costa D.G., Ferreira L.R., Kwok O.C., Qu D., Su C., Marvulo M.F., Alves L.C., Mota R.A. & Silva J.C. 2010. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *J. Parasitol.* 96(4):709-712. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2425.1>. PMID:20486738.
- Evans R., Chatterton J.M., Ashburn D., Joss A.W. & Ho-Yen D.O. 1999. Cell culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18(12):879-884. <http://dx.doi.org/10.1007/s100960050423>. PMID:10691199.
- Ferreira A.M., Martins M.S. & Vitor R.W.A. 2001. Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil. *Parasite* 8(2):99-105. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2001082099>. PMID:11474987.
- Ferreira A.M., Vitor R.W.A., Gazzinelli R.T. & Melo M.N. 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.* 6(1):22-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2004.12.004>. PMID:16376837.
- Garcia J.L., Navarro I.T., Ogawa L. & Oliveira R.C. 1999. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural* 29(1):91-97. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781999000100017>.
- Hartley W.J. & Dubey J.P. 1991. Fatal toxoplasmosis in some native Australian birds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3(2):167-169. <http://dx.doi.org/10.1177/104063879100300213>. PMID:1892936.
- Inskeep 2nd W., Gardiner C.H., Harris R.K., Dubey J.P. & Goldston R.T. 1990. Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Wildl. Dis.* 26(3):377-382. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-26.3.377>. PMID:2388360.
- Joss A.W., Skinner L.J., Chatterton J.M., Cubie H.A., Pryde J.F. & Campbell J.D. 1989. Toxoplasmosis: effectiveness of enzyme immunoassay screening. *Med. Lab. Sci.* 46(2):107-112. PMID:2593770.
- Lehmann T., Marcet P.L., Graham D.H., Dahl E.R. & Dubey J.P. 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 103(30):11423-11428. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0601438103>. PMID:16849431.
- Lei Y., Davey M. & Ellis J.T. 2005. Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines in vitro. *Parasitology* 131(5):583-590. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182005008310>. PMID:16255816.
- Mavin S., Joss A.W., Ball J. & Ho-Yen D.O. 2004. Do *Toxoplasma gondii* RH strain tachyzoites evolve during continuous passage? *J. Clin. Pathol.* 57(6):609-611. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2003.013763>. PMID:15166265.
- Millar P.R., Daguier H., Vicente R.T., Costa T., Sobreiro L.G. & Amendoeira M.R.R. 2008. *Toxoplasma gondii*: estudo soro-epidemiológico de suínos da região Sudoeste do Estado do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.* 28(1):15-18. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000100002>.
- Miller N.L., Frenkel J.K. & Dubey J.P. 1972. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J. Parasitol.* 58(5):928-937. <http://dx.doi.org/10.2307/3286588>. PMID:5078599.
- Pena H.F.J., Soares R.M., Amaku M., Dubey J.P. & Gennari S.M. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res. Vet. Sci.* 81(1):58-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.09.007>. PMID:16289158.
- Pena H.F.J., Gennari S.M., Dubey J.P. & Su C. 2008. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38(5):561-569. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>. PMID:17963770.
- Pescador C.A., Oliveira E.C., Pedroso P.M.O., Bandarra P.M., Okuda L.H., Corbellini L.G. & Driemeier D. 2007. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 27(4):167-171. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007000400007>.
- Rajendran C., Su C. & Dubey J.P. 2012. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect. Genet. Evol.* 12(2):359-368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.010>. PMID:22226702.
- Saadatnia G., Haj Ghani H., Khoo B.Y., Maimunah A. & Rahmah N. 2010. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Trop. Biomed.* 27(1):125-130. PMID:20562822.
- Silva D.S., Bahia-Oliveira L.M.G., Shen S.K., Kwok O.C.H., Lehman T. & Dubey J.P. 2003. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. *J. Parasitol.* 89(2):394-396. [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0394:POTGIC\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0394:POTGIC]2.0.CO;2). PMID:12760664.
- Tenter A.M., Heckeroth A.R. & Weiss L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30(12/13):1217-1258. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7). PMID:11113252.