

MAURO JOSÉ GONÇALVES BEZERRA

DETECÇÃO DO DNA DE *Toxoplasma gondii* EM ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTIVO, FETOS, ANEXOS FETAIS E SÊMEN DE OVINOS E EM LEITE DE CABRAS

RECIFE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

MAURO JOSÉ GONÇALVES BEZERRA

DETECÇÃO DO DNA DE *Toxoplasma gondii* EM ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTIVO, FETOS, ANEXOS FETAIS E SÊMEN DE OVINOS E EM LEITE DE CABRAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador:
Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

RECIFE

2014

Ficha Catalográfica

B574d Bezerra, Mauro José Gonçalves
Detecção do DNA de *Toxoplasma Gondii* em órgãos do sistema reprodutivo, fetos, anexos fetais e sêmen de ovinos e em leite de cabras / Mauro José Gonçalves Bezerra. -- Recife, 2014.
77 f.: il.

Orientador (a): Rinaldo Aparecido Mota.
Tese (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
Referências.

1. Ovino 2. *Toxoplasma Gondii* 3. Sêmen 4. Caprino
5. Leite 6. PCR I. Mota, Rinaldo Aparecido, orientador II. Título

CDD 591.4

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

DETECÇÃO DO DNA DE *Toxoplasma gondii* EM ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTIVO, FETOS, ANEXOS FETAIS E SÊMEN DE OVINOS E EM LEITE DE CABRAS

Tese de Doutorado elaborada por
MAURO JOSÉ GONÇALVES BEZERRA

Aprovada em 24/02/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota - Orientador
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Tomoe Noda Saukas
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Flaviana Santos Wanderley
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto
Campus Arapiraca – Unidade Educacional de Viçosa - UFAL

Prof. Dr. Leucio Camara Alves
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Dedico aos meus pais *in memoriam* Maria de Lourdes Gonçalves Bezerra e José Campos Bezerra instrumentos de Deus para me dar a vida, e a Maria José Carneiro da Cunha e Guiomar Amélia da Conceição mães do coração. Juntos e com amor incondicional, foram os instrumentos do criador para me ensinar os valores morais de Deus, a amar a vida e a respeitar ao meu próximo como a mim mesmo. Ao meu filho Anthony Alef Gonçalves Bezerra, meu presente de DEUS, que veio trazendo alegria, luz e amor para a minha vida.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pai de infinita bondade e criador supremo, pela nova oportunidade nessa encarnação, de crescimento, aprendizado e evolução e, principalmente, por fortalecer o meu coração nos momentos mais difíceis da vida.

Agradeço ao meu grande amigo e irmão de alma Rinaldo Aparecido Mota, que em todos os momentos me apoiou, estimulou, servindo de exemplo de determinação e de compromisso com o trabalho. Sem o mesmo o meu Doutorado não existiria.

A todos de minha família em especial as minhas mães do coração Maria José Carneiro da Cunha e Guiomar Amélia da Conceição que, com seu carinho e amor incondicional contribuíram para minha educação e formação profissional e com seus exemplos de amor ao próximo me tornaram uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos Marlos Eduardo, Mônica e Miguel Gustavo, por sua torcida e apoio e a todos os meus sobrinhos pela paciência, respeito, carinho e estímulo.

Aos amigos e irmãos de alma Carol Costa e Márcio Prando pela amizade, carinho, respeito, torcida, compreensão e estímulo.

Ao Prof. Dr. Leucio Camara Alves, meu padrinho e amigo, pela sua torcida e por sempre aparecer em meu caminho criando oportunidades que me levam ao crescimento intelectual, profissional e como ser humano, pois foi assim no Mestrado e também no Doutorado.

A Prof^ª. Dr^ª. Tomoe Noda Saukas, que no início da minha vida profissional me apoiou, orientou e principalmente acreditou no meu esforço, capacidade e perseverança, além de ter sido exemplo de ética e profissionalismo.

A toda a equipe do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFRPE, meus queridos amigos Érica Moraes, Annelise, Mércia, Orestes, Pedro, Jéferson, Eugênio, André Santos, Renata, Givanildo, Bruno, Sylvio, Pomy, Ana Lisa, Erica Samico, André Mota, Débora, Adriano, Marcela, Luana, Marcos, Sandra, Cecília e Guiomar pela colaboração, apoio e ajuda em todos os momentos dessa trajetória.

A todos os colegas e amigos da SUDENE, por sua torcida, respeito, carinho e compreensão, representados aqui por Ilena, Carlos Teixeira, Petrus, Wagner, Nireide, Mauro Póvoas, Cássia, Francisco, Ângela, Fernando Queiroz, Josué, Gilvete, Fernando Araujo, Inaldo e Edmundo.

Ao trio de amigos inseparáveis, Prof. Leonildo Galiza por sua amizade, carinho e apoio, a Prof^a. Andréa Alice sempre com uma palavra de carinho e de amizade e ao Prof. José Wilton por sua amizade, respeito e sempre estando disponível e disposto a ajudar em todas as ocasiões.

Aos amigos Flaviana, Elizabeth e Wagner, três queridos irmãos, que em todos os momentos torceram e me brindaram com sua amizade, gentileza, carinho e respeito.

A todos do programa de Pós-graduação em Biociência Animal, em especial a nossa secretária e minha grande amiga Edna Chérias, sempre amável e pronta para ajudar em todos os momentos e, a Professora Ana Porto por sua torcida e apoio.

A todos os colegas do curso, em especial a Fabiana América pela sua amizade.

Aos animais que contribuíram para a ciência.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para execução do Doutorado, muito obrigado.

Senhor fazei-me instrumento de vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor;

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;

Onde houver discórdia, que eu leve a união;

Onde houver dúvida, que eu leve a fé;

Onde houver erro, que eu leve a verdade;

Onde houver desespero, que eu leve a esperança;

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, Fazei que eu procure mais

Consolar, que ser consolado;

compreender, que ser compreendido;

amar, que ser amado.

Pois, é dando que se recebe,

é perdoando que se é perdoado,

e é morrendo que se vive para a vida eterna...

Oração de São Francisco de Assis

Resumo

Objetivou-se neste estudo detectar a presença de DNA de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) em órgãos do sistema reprodutor, fetos e placentas, sêmen fresco e congelado da espécie ovina e em leite de cabras. No primeiro estudo foram coletadas 50 amostras de soro sanguíneo e 50 amostras de testículos e epidídimos de carneiros abatidos em matadouros no estado de Pernambuco. Para a triagem dos animais positivos para *T. gondii* foi utilizada a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e posteriormente empregou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos órgãos dos animais positivos na sorologia. Observou-se 24% (12/50) de animais positivos na RIFI e o DNA genômico de *T. gondii* foi detectado em 8,3% (1/12) das amostras de epidídimo dos animais positivos na RIFI. No segundo experimento coletaram-se 50 amostras de soro sanguíneo, 50 amostras de útero, trompas e ovários, além de 15 fetos e placentas de matrizes abatidas em matadouros no estado de Pernambuco. Também foi utilizada a RIFI para a triagem dos animais positivos para *T. gondii* e, posteriormente realizou-se a PCR nos órgãos dos animais positivos na sorologia e em todos os fetos e anexos fetais. Na sorologia, 26% (13/50) amostras foram positivas e o DNA genômico de *T. gondii* foi detectado em 7,7% (1/13) das amostras de útero, trompas e ovários das fêmeas positivas na sorologia. O DNA genômico de *T. gondii* também foi detectado em um dos 15 fetos pesquisados 6,7% (1/15) nas amostras de coração, cérebro e cordão umbilical e na placenta. Para o terceiro estudo foram utilizadas 217 amostras de sêmen, sendo 108 adquiridas em centrais de inseminação artificial e 109 coletadas de reprodutores ovinos em fazendas da Região Nordeste. Detectou-se o DNA genômico do *T. gondii* em 24/108 (22,2%) no sêmen de centrais de inseminação e em 10/109 (9,2%) das amostras de sêmen fresco. No quarto experimento foram coletadas 248 amostras de soro sanguíneo de cabras em lactação, que inicialmente foram submetidas à pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* utilizando-se a RIFI. Das mesmas cabras foram coletadas e processadas 248 amostras de leite para a pesquisa do DNA de *T. gondii* por meio da PCR. Das amostras de soro analisadas, 56/248 (22,6%) foram positivas na RIFI e o DNA do parasito foi detectado em 15/248 (6,1%) das amostras de leite. A identidade molecular dos produtos amplificados, nos quatro estudos foi confirmada por sequenciamento. Baseado na presença do DNA de *T. gondii* nas amostras biológicas analisadas evidencia-se a necessidade de novos estudos para determinar possíveis alterações andrológicas e reprodutivas e, outras possíveis vias de transmissão nesta espécie, bem como outros aspectos relacionados à infecção natural. Também é importante determinar a viabilidade deste parasito e a sua capacidade de transmissão através das técnicas de reprodução assistida e monta natural. Ressalta-se que a técnica da PCR pode ser empregada

no controle sanitário das amostras de sêmen fresco e nas centrais de inseminação artificial. A eliminação de *T. gondii* no leite de cabras naturalmente infectadas na Região Nordeste do Brasil, mostra que o consumo do leite *in natura* desta espécie constitui-se em potencial risco para a saúde dos consumidores, principalmente gestantes, na região estudada.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Ovinos; Sêmen; Caprinos; Leite; PCR.

Abstract

The aim of the present study was to detect the presence of the DNA of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) in the reproductive organs, fetuses, placenta, fresh and frozen semen of sheep and in goat's milk. In the first study, 50 blood samples and 50 testicle and epididymis samples were collected from rams killed in slaughterhouses in the state of Pernambuco. The Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) was used during the screening of the animals that were positive for *T. Gondii*. The Polymerase Chain Reaction (PCR) was later used with the organs of the animals that were positive in the serology. In total 24% (12/50) of the animals were positive in the IFA and genomic DNA of *T. gondii* was detected in 8.3% (1/12) of the epididymis samples of the animals that were positive in the IFA. In the second experiment, 50 blood sera samples and 50 samples of uterus, tubes and ovaries, as well as 15 fetuses and placentas were collected from females killed in slaughter houses in Pernambuco. The IFA was again used to screen the animals that were positive for *T. gondii* and PCR was used afterwards with the organs of the animals that were positive in the serology, as well as all of the fetuses and fetal attachments. In the serology, 26% (13/50) of the samples were positive and genomic DNA of *T. gondii* was detected in 7.7% (1/13) of the uterus, tube and ovary samples from the females that were positive in the serology. Genomic DNA of *T. gondii* was also detected in the heart, brain, umbilical cord and placenta of one of the 15 fetuses studied (6.7%). In the third study, 217 semen samples were used, 108 of which were acquired from artificial insemination centers and 109 of which were collected from breeding sheep in the Northeast region. Genomic DNA of *T. gondii* was recorded in 24/108 (22.2%) of the semen samples from the insemination centers and in 10/109 (9.2%) of the fresh semen samples. In the fourth experiment, 248 blood sera samples from lactating goats were used. They were initially studied for antibodies anti-*T. gondii* using the IFA. From the same goats, 248 milk samples were collected and processed to investigate the presence of *T. gondii* DNA in the PCR. Of the sera samples analyzed, 56/248 (22.6%) were positive in the IFA and the DNA of the parasite was detected in 15/248 (6.1%) of the milk samples. The molecular identity of the products amplified in the four studies was confirmed by sequencing. Based on the presence of *T. gondii* DNA in the biological samples analyzed, it is clear that further studies are required to determine possible andrological and reproductive abnormalities and other possible transmission routes in these species, as well as aspects associated with natural infection. It is also important to determine the viability of this parasite and its transmission capacity through assisted reproduction techniques and natural breeding. The PCR technique can be used in the

sanitary control of the fresh semen samples, as well as those from artificial insemination centers. The elimination of *T. gondii* in the milk of goats naturally infected in the Northeast region has shown that in natura goat milk consumption is a potential health risk for consumers, particularly pregnant women, in the studied region.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Sheep; Semen; Goats, Milk, PCR.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 16 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 18 |
| 2.1 Etiologia | 18 |
| 2.2 Ciclo biológico | 18 |
| 2.3 Epidemiologia | 20 |
| 2.4 Aspectos reprodutivos da toxoplasmose | 22 |
| 2.5 Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose | 24 |
| 2.6 Controle e profilaxia da toxoplasmose | 26 |
| 2.7 Aspectos da toxoplasmose humana | 27 |
| 3. Objetivos | 30 |
| 3.1 Geral | 30 |
| 3.2 Específicos | 30 |
| 4. Referências | 31 |
| Capítulo 1 | 44 |
| Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros naturalmente infectados no Brasil | |
| Capítulo 2 | 49 |
| Occurrence of <i>Toxoplasma gondii</i> DNA in sheep naturally infected and slaughtered in slaughterhouses in Pernambuco, Brazil | |
| Capítulo 3 | 58 |
| Detection of <i>Toxoplasma gondii</i> DNA in fresh and frozen semen from rams in Brazil | |

Capítulo 4

68

Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the northeast of Brazil

5. Considerações Finais

77

Lista de Figuras

- Figura 1** - Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii* 19
- Figura 2** - Consequências da primoinfecção por *Toxoplasma gondii* em ovelhas. 23

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

| | |
|--------|--|
| °C | Graus Celsius |
| ® | Marca Registrada |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| % | Porcentagem |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| et al. | Autores colaboradores (Original do latim; “e os outros”) |
| FC | Fixação de Complemento |
| FR | Frequência Relativa |
| Gy | Gray (Quantidade de energia de radiação absorvida) |
| HA | Hemaglutinação |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IIF | Indirect Imunofluorescence |
| IgG | Imunoglobulina da classe G |
| IgM | Imunoglobulina da classe M |
| ISAGA | Immunosorbent Agglutination Assay |
| ml | Mililitro |

| | |
|------------------|---|
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| OIE | World Animal Health Organisation |
| pb | Pares de Bases |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| RIFI | Reação de Imunofluorescência indireta |
| SUDENE | Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste |
| <i>T. gondii</i> | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| UFRPE | Universidade Federal Rural de Pernambuco |

1 - Introdução

Os rebanhos ovino e caprino do Brasil estão entre os maiores do mundo com um efetivo de 17,6 milhões de cabeças de ovinos e 9,3 milhões de caprinos. Na Região Nordeste concentra-se aproximadamente 9,0 milhões do rebanho ovino nacional, sendo a região de maior produção, com destaque para o sistema produtivo de carne para consumo humano. Em relação ao rebanho caprino, a produção de leite possui grande destaque, principalmente na Região Nordeste que possui 90,8% do rebanho nacional, sendo o estado de Pernambuco detentor de 20,5% desse rebanho (IBGE, 2011). Contudo, nesta região a produtividade ainda é baixa e inúmeras são as doenças infecciosas e parasitárias que afetam o desempenho reprodutivo dos pequenos ruminantes, destacando-se dentre elas a toxoplasmose (UNDERWOOD & ROOK, 1992; SIMPLÍCIO et al., 2001).

O parasito responsável por essa doença, *T. gondii* é um protozoário com reprodução intracelular obrigatória, podendo ser encontrado nos diferentes exsudatos dos animais infectados (DUBEY et al., 1995). Embora seu ciclo de vida seja conhecido desde o final da década de 1960, muitos aspectos relacionados à infecção por *T. gondii* ainda precisam ser esclarecidos (BASTIEN, 2002).

A toxoplasmose é considerada a maior causa de problemas reprodutivos em caprinos e ovinos em muitos países do mundo (TENTER et al., 2000; BORDE et al., 2006; DUBEY, 2009; DUBEY, 2010; ASGARI et al., 2011). Segundo Dubey e Adams, (1990), a parasitose é uma das principais causas de aborto em cabras e ovelhas no mundo e a ocorrência de distúrbios reprodutivos nessas espécies está relacionada ao período ou a fase da gestação em que ocorre a infecção (DUBEY, 1981; DUBEY, 2009).

A infecção experimental com oocistos em cabras gestantes negativas para *T. gondii* no primeiro terço da gestação determina a ocorrência de reabsorção fetal e no segundo e terceiro terços da gestação ocorrem abortamentos, natimortos ou nascimento de cabritos infectados (DUBEY & BEATTIE, 1988; DUBEY, 1989; OBENDORF et al., 1990; DUBEY, 2009). Moraes et al. (2010a) demonstraram em ovinos que é possível a transmissão de *T. gondii* via sêmen experimentalmente contaminado com taquizoítos. Observaram soroconversão de 33.3% no G1 (infectado com menor dose do parasito) e 100% no G2 (infectado com maior dose do parasito) e na PCR nested detectaram o DNA do parasito em 93.3% das amostras analisadas. Também foi observada elevada taxa de reabsorção embrionária nos animais do G2 (100%).

O hábito dos seres humanos ingerirem produtos de origem animal, crus ou mal cozidos, tem fundamental importância na epidemiologia da toxoplasmose e o leite é considerado um veículo importante na transmissão do *T. gondii* ao homem (DUBEY, 1980; DUBEY, 2009). Em seus estudos Powell et al. (2001) demonstraram que o leite de animais infectados contém taquizoítos viáveis, possibilitando a transmissão para sua prole. Riemann et al. (1975) relataram um caso de infecção por *T. gondii* em crianças, nos Estados Unidos da América, onde suspeitou-se da infecção pela ingestão de leite não pasteurizado de cabras. A literatura relata a presença de taquizoítos no leite em inúmeras espécies domésticas e já foram identificados casos da transmissão do parasito para humanos por meio do consumo de leite não pasteurizado da espécie caprina (CHIARI et al., 1987; SKINNER et al., 1990).

Estudos epidemiológicos realizados em Pernambuco por Peixoto et al. (2006), demonstraram que a infecção por *T. gondii* encontra-se disseminada nos rebanhos de ovinos e caprinos, estando diretamente relacionada com falhas reprodutivas. Além disso, a toxoplasmose é uma das zoonoses mais difundidas em todo o mundo e diante dos prejuízos econômicos causados nas cadeias produtivas de caprinos e ovinos (FREYRE et al., 1997) e das doenças relacionadas aos seres humanos, o estudo das possíveis vias de transmissão deste parasito é um aspecto de grande relevância na epidemiologia desta doença.

O isolamento de *T. gondii* no sêmen fresco e congelado e em órgãos sexuais de reprodutores ovinos na infecção natural gera muita expectativa, principalmente sobre a possibilidade de sua transmissão venérea, devendo ser exaustivamente estudada, bem como, a possibilidade da transmissão por ingestão do leite caprino, alimento ainda consumido “*in natura*” em algumas regiões do Nordeste do Brasil. Desta forma evidencia-se a necessidade de se intensificar os estudos sobre a importância da transmissão horizontal e vertical do parasito, contribuindo com as investigações epidemiológicas e reprodutivas na infecção por *T. gondii*, além de promover uma maior consciência coletiva da sua importância enquanto zoonose.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Etiologia

Toxoplasma gondii é um protozoário de ciclo de vida heteroxeno, cuja infecção é de caráter cosmopolita e infecta todas as espécies de animais homeotérmicos, incluindo mamíferos, aves e o homem (LUZON et al., 1997a; TENTER et al., 2000). Pertence ao REINO Protista, SUBREINO Protozoa, FILO Apicomplexa, CLASSE Sporozoea, SUBCLASSE Coccidia, ORDEM Eucoccidiida, SUBORDEM Eimeriina, FAMÍLIA Sarcocystidae, SUBFAMÍLIA Toxoplasmatinae, GÊNERO *Toxoplasma*, ESPÉCIE (única) *gondii* (FORTES, 1997).

Foi primeiramente descrito por Nicole & Manceaux em 1908, em um roedor na África do Sul e inicialmente denominado de *Leishmania gondii*, recebendo posteriormente a nomenclatura atual. No Brasil, Splendore também em 1908 isolou o parasito em um coelho no estado de São Paulo. Apesar do isolamento do agente no início do século, apenas na década de 70 foram descritas a sua natureza coccidiana, bem como seus hospedeiros definitivos e intermediários (FRENKEL et al., 1970).

Em ovinos, a primeira descrição do agente ocorreu em 1942 por Olafson e Monlux, nos Estados Unidos, e desde então, trabalhos demonstram a importância econômica da infecção como causa de abortos, natimortos e perdas econômicas nesta espécie (FREYRE et al., 1997).

A primeira evidência da toxoplasmose em cabras foi feita por Feldman & Miller (1956) nos Estados Unidos da América. Munday & Mason (1979) foram os primeiros a descreverem a toxoplasmose como importante causa de prejuízos reprodutivos em caprinos na Austrália. Dubey et al. (1986); Dubey et al. (1987); Dubey (1989) e Dubey (2010) sugeriram que os caprinos são mais suscetíveis ao *T. gondii* do que outros animais, acarretando grandes perdas econômicas em rebanhos em todo o mundo.

2.2 - Ciclo Biológico

O ciclo biológico (Figura 1) é constituído pelas fases enteroepitelial (fase sexual) e extraintestinal (fase assexuada). O ciclo enteroepitelial se desenvolve exclusivamente no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo (felídeos), produzindo oocistos que são excretados nas fezes e esporulam no ambiente (esporozoítos infectantes). O ciclo extraintestinal ocorre

em todas as espécies de sangue quente, incluindo o gato (DUBEY, 1994; LUZON et al., 1997a).

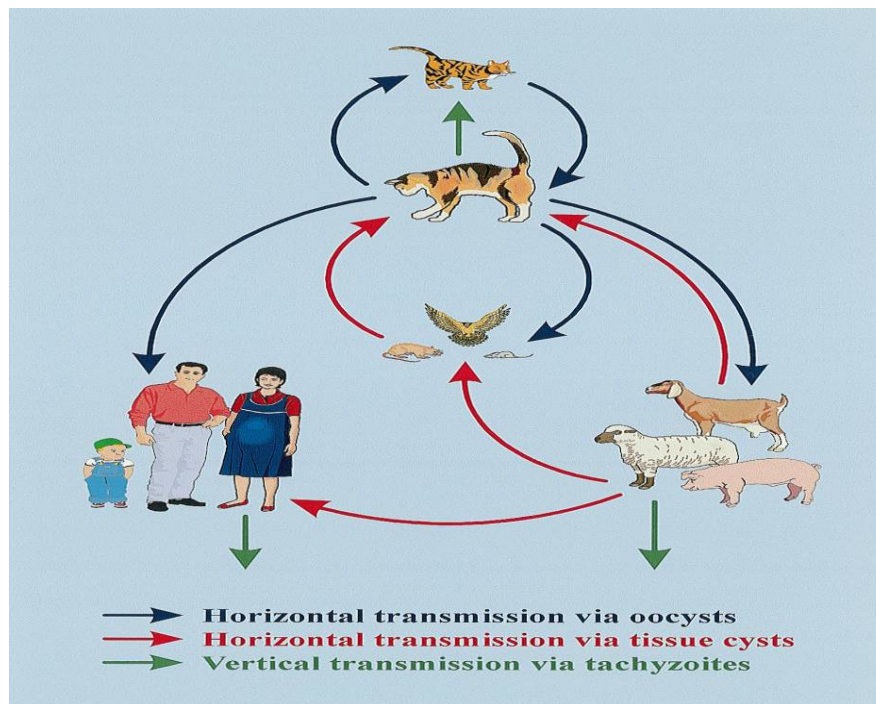


Figura 1 - Ciclo de transmissão do *Toxoplasma gondii*.
 Fonte: TENTER et al. (2000).

O parasito não apresenta especificidade por determinado órgão ou tecido e por ser um organismo obrigatoriamente intracelular e móvel, invade células nucleadas e multiplica-se por divisão binária simples e endodiogenia sob as formas de taquizoítos (forma de multiplicação rápida) e bradizoítos (forma de multiplicação lenta), estes últimos no interior dos cistos tissulares (LUZON et al., 1997a; MEIRELES, 2001).

Os taquizoítos, através da circulação sanguínea e linfática, atingem todos os tecidos do hospedeiro (WONG & REMINGTON, 1993). Também conhecido como forma livre ou proliferativa, é encontrado na fase aguda da infecção no interior das células infectadas, sendo responsável pela sintomatologia. Apresenta forma de arco com uma extremidade afilada e outra arredondada. Constitui a forma menos resistente do parasita, sendo facilmente destruída pelas condições ambientais adversas, pelo suco gástrico, desidratação ou variações osmóticas (NEVES, 1985).

Os bradizoítos estão presentes nos cistos teciduais principalmente durante a fase crônica da infecção. Os cistos possuem membrana dupla, sendo resistentes às enzimas proteolíticas e ao resfriamento a 4°C por 30 dias. Entretanto, são mortos após congelamento a

- 20°C ou aquecimento a + 65°C e sob radiação ionizante de 200 gy (NEVES, 1985; DUBEY et al., 1986; DINIZ et al., 1991; KOTULA et al., 1991; AMATO NETO et al., 1995).

2.3 - Epidemiologia

Segundo Chiari et al. (1987), os gatos domésticos eliminam oocistos no ambiente e por este motivo são importantes na cadeia epidemiológica de transmissão do parasito para os animais de produção. Contudo, Machado & Lima (1987) e Skjerve et al. (1998) não encontraram associação significativa entre a presença do gato e a infecção por este parasita nos rebanhos estudados. Manair et al. (1996) e Stachissini (2005) relataram que a presença de gatos nas propriedades em contato direto com os animais é um importante fator de risco para a infecção por *T. gondii*.

No trabalho realizado por Pinheiro Jr. et al. (2009) no estado de Alagoas, Brasil, os fatores de risco descritos foram a idade dos animais, tamanho da propriedade e o sistema de produção. Os autores observaram que os ovinos com idade entre 12 e 24 meses tem aproximadamente 2,7 mais chances de se infectarem que os animais com idade menor e, que os animais maiores de 24 meses têm aproximadamente quatro vezes mais chances que os animais com idade menor que 12 meses. Também observaram que os animais criados em propriedades com menos de 30 ha têm aproximadamente 3,2 vezes mais chances de se infectarem quando comparado com os animais de propriedades entre 30 e 200 ha. Informaram ainda, que no sistema de criação extensivo, os animais têm aproximadamente 2,3 vezes mais chance de se infectarem do que os animais que vivem em sistema de criação intensivo e que os animais que vivem em propriedades com sistema de criação semi-intensivo têm aproximadamente 3,2 vezes mais chance em relação aos que são criados em sistema de criação intensivo.

A infecção ocorre principalmente pela ingestão de oocistos presentes nos alimentos (pastos e rações) e solos contaminados (NAVARRO et al., 1992; OGAWA et al., 2003; SAWADOGO et al., 2005). Escopelli (2004) e Pugh (2004) afirmaram que a principal forma de infecção para os pequenos ruminantes é a ingestão de água e alimentos contaminados com fezes de gato contendo oocistos. Buxton et al. (2006) sugeriram que a contaminação ambiental por oocistos é relativamente menos importante como fonte de infecção na toxoplasmose ovina, sendo a transmissão vertical em ovelhas com infecção permanente, mais importante na cadeia epidemiológica do que se pensava.

Diversos autores descreveram duas formas de transmissão do parasito: adquirida e congênita. No primeiro caso, o animal se infecta por via oral pela ingestão do oocisto esporulado e através da ingestão de carne contaminada com cistos contendo os bradizoítos. Já na transmissão congênita, as fêmeas se infectam durante a gestação e transmitem o parasito via transplacentária aos fetos. Esta forma é a mais patogênica e os taquizoítos atravessam a barreira transplacentária durante a fase de parasitemia materna causando transtornos reprodutivos que variam de intensidade conforme a fase gestacional, o desenvolvimento placentário, a carga parasitária e a virulência do *T. gondii* (DUBEY, 1986; DUBEY, 1988; BARBERAN & MARCO, 1997; LUZON et al., 1997a; DUBEY, 1998; KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).

A ocorrência de formas infectantes de *T. gondii* (taquizoítos) foi demonstrada em secreções e/ou excreções de vários hospedeiros como urina de cães (JACOBS et al., 1966) e de camundongos (ROCHA et al., 1993), saliva de coelho (TERRAGNA et al., 1981) e humana (AMENDOEIRA & COUTINHO, 1982), sêmen humano (MARTINEZ-GARCIA et al., 1996) e bovino (SCARPELLI et al., 2001), sêmen de caprinos (DUBEY & SHARMA, 1980; DUBEY et al., 1980), sêmen de ovinos (SPENCE et al., 1978; BLEWETT et al., 1982; TEALE et al., 1982; MORAES et al., 2011). Recentemente Camossi et al. (2011) relataram que o comprometimento da imunidade no período periparto de ovelhas pode favorecer a reativação de formas císticas de *T. gondii*, e desta forma o taquizoíto poderia ser eliminado no leite.

Taquizoítos de *T. gondii* foram isolados na mucosa vaginal, saliva, secreção nasal e urina de caprinos infectados experimentalmente (DUBEY, 1980) e a eliminação desta forma parasitária no leite de cabras naturalmente infectadas também foi relatada por Chiari & Neves (1984). A presença de *T. gondii* no sêmen de caprinos experimentalmente infectados também foi relatada na literatura (DUBEY & SHARMA, 1980; SANTANA et al., 2010).

Tenter (2000) descreve que os estudos sobre a frequência de anticorpos anti-*T. gondii* comprovaram a disseminação do *T. gondii* em ovinos no mundo, com porcentagens de animais sororreagentes que variam de 3% a 92%. Segundo Dubey & Hamir (2002) a alta prevalência da toxoplasmose em ovinos pode estar relacionada a pouca resistência desta espécie ao parasito e às próprias condições de exploração da ovinocultura que expõe estes animais a uma maior probabilidade de contato com os oocistos eliminados pelos gatos. As taxas de infecção em ovinos no Brasil também são bem variadas, tendo sido observado no

estado do Rio Grande do Sul 8,0% por Nishikawa et al. (1984), no estado de São Paulo 55,0% por Langoni et al. (1999), Figliuolo et al. (2004) também no estado de São Paulo, encontraram 34,0% e Lopes et al. (2006) ainda em São Paulo detectaram 56,0% de animais reagentes. No estado de Santa Catarina Clementino et al. (2007) descrevem 29,4%, Ogawa et al. (2003) no estado do Paraná obtiveram uma frequência de 54,%, em Pernambuco 35,3% segundo Silva et al. (2003) e em Alagoas Pinheiro Jr. et al (2009) descrevem uma prevalência que varia de 0,7% a 9,2% nos municípios estudados. Esses autores consideram que o alto percentual de ovinos sororeagentes para *T. gondii*, pode estar relacionado com a contaminação do meio ambiente.

Segundo Dubey (1985) a prevalência de anticorpos contra *T. gondii* em caprinos nos Estados Unidos foi de 22,7% e na Venezuela, também em caprinos, Nieto & Melendez, (1998) encontraram uma positividade de 17,8%. No Brasil, levantamentos realizados para a espécie caprina em vários estados, utilizando diferentes técnicas de diagnóstico, demonstraram uma frequência variando entre 8,0 a 47,6% de positividade na infecção por *T. gondii*. No estado de São Paulo Silva et al. (2002) encontraram uma frequência de 8,0%, na Bahia Uzêda (2004) encontrou uma frequência de 16,4%, no Rio Grande do Sul Maciel & Araújo (2004) descrevem frequência de 19,4%, Faria et al. (2007) frequência de 24,5% na Paraíba, no estado do Ceará Cavalcanti et al. (2008) 25,1%, Luciano et al. (2011) uma frequência de 29,1% no estado do Rio de Janeiro, Neto et al. (2008) no estado do Rio Grande do Norte, relatam frequência de 30,6%, no Maranhão Soares et al. (2010) frequência de 37,0% e Bispo et al (2011) relatam frequência de 47,6% no estado de Pernambuco. Dubey (1990) descreve que a variação na prevalência em ovinos e caprinos pode ser influenciada pelo tipo de teste sorológico utilizado, pela região estudada e pela idade dos animais.

2.4 - Aspectos reprodutivos da toxoplasmose

Dentre as falhas reprodutivas causadas pela toxoplasmose ovina, o aborto é uma das mais importantes causas de perda econômica (BUXTON, 1990; LUZON et al., 1997b; SILVA & LANGONI, 2001; WEISSMANN, 2003; PEREIRA-BUENO et al., 2004; PEIXOTO et al., 2006). Conforme demonstrado na figura 2, os transtornos ocorrem quando a fêmea se infecta durante a gestação, podendo ocorrer desde reabsorções embrionárias iniciais e abortos até fetos mal formados e crias debilitadas e fracas, variando a intensidade de acordo

com a fase gestacional em que a fêmea se encontre (DUBEY, 1986; UNDERWOOD & ROOK, 1992; WEISSMANN, 2003).

A infecção na primeira metade da gestação causa maiores prejuízos, ocorrendo reabsorção embrionária e morte fetal, seguida de aborto (figura 2). Porém, ainda há risco da transmissão em fases mais tardias, onde pode ocorrer mumificação, malformação fetal, natimorto ou recém-nascido debilitado (DUBEY, 1988; VITOR et al., 1991; BARBERAN & MARCO, 1997; WEISSMANN, 2003).

Moraes et al. (2010a) e Moraes et al. (2010b) inseminaram ovelhas com diferentes doses de sêmen contaminado por taquizoítos de *T. gondii* e confirmaram a infecção utilizando as técnicas da PCR e a RIFI. Observaram por exames de ultrasonografia transtornos reprodutivos, principalmente, reabsorções embrionárias. Os estudos experimentais demonstraram a possibilidade de transmissão via sêmen do *Toxoplasma gondii* em ovelhas experimentalmente infectadas.

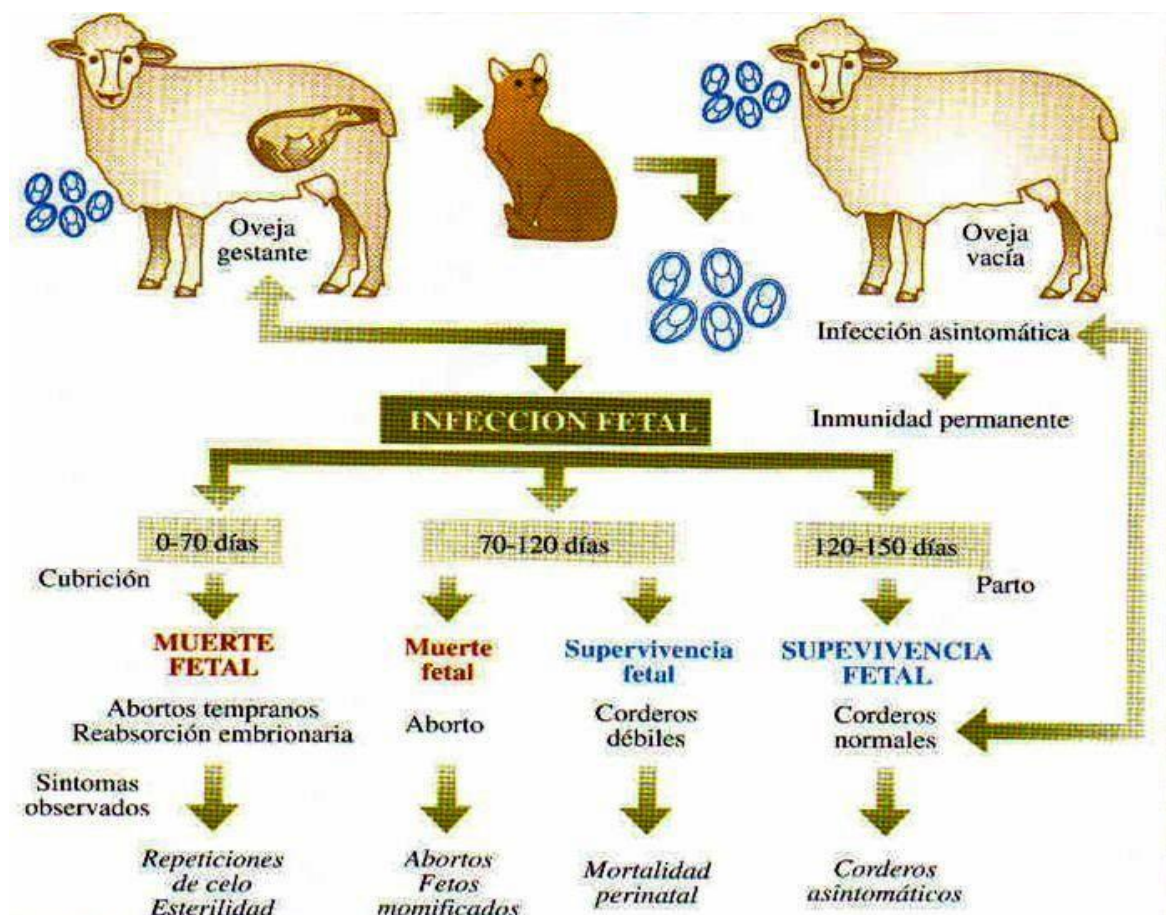


Figura 2 - Consequências da primoinfecção por *T. gondii* em ovelhas.
Fonte: BARBERAN e MARCO (1997).

2.5 - Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é de grande importância uma vez que os sinais clínicos e as lesões macroscópicas podem ser facilmente confundidas com outras enfermidades e também pelo fato das falhas reprodutivas serem consequências de diversas doenças (VIDOTTO, 1992; INNES & ESTEBAN-REDONDO, 1997; AMATO NETO et al., 1995). Segundo Dubey (2010), os sinais clínicos da toxoplasmose são inespecíficos e não podem ser utilizados no diagnóstico definitivo.

Dentre as técnicas sorológicas empregadas no diagnóstico da toxoplasmose pode-se citar: a técnica de Sabin-Feldman, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a Hemaglutinação (HA), a Fixação do Complemento (FC), o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e o Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA) (UCHOA et al., 1999).

A RIFI é considerada uma das melhores técnicas de diagnóstico sorológico da toxoplasmose, sendo sensível, segura e pode ser usada tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção. A produção de anticorpos da classe IgM ocorre na fase aguda da infecção, seguida pela elevação de anticorpos da classe IgG que aparece na fase crônica. Os títulos de IgG se mantêm constantes ou ascendentes durante o curso da infecção, posteriormente decrescendo e podendo desaparecer em poucos meses no caso da transmissão passiva de anticorpos pelo colostro (DUBEY et al., 1987; CAMARGO, 2001). Análises sorológicas usando a RIFI têm sido amplamente empregadas em diversas espécies animais infectadas por *T. gondii* (VAN DER PUIJE et al., 2000; CONDE et al., 2001; NISHI et al., 2008; GARCIA et al., 2012).

Toxoplasma gondii pode ser isolado a partir da bioprova em amostras de tecidos infectados como sangue, fluido cerebroespinhal, tecidos fetais e/ou placentários mediante a inoculação intraperitoneal em camundongos, porém requer de três a seis semanas e a manutenção de animais em biotérios (MONTROYA & LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010).

O exame histopatológico não é uma técnica conclusiva para o diagnóstico da infecção por *T. gondii*, pois o parasito pode ser confundido com núcleos ou fragmentos nucleares que se coram de forma semelhante devido à ausência de características tintoriais próprias (FARREL et al., 1952; TSUNEMATSU et al., 1964; BARBOSA, 1988). Entretanto foi utilizada por diversos autores que relataram a observação frequente de taquizoítos e lesões macro e microscópicas na placenta, membranas fetais e tecidos fetais (MCSPORRAN et al.,

1985; DUBEY et al., 1986; UGGLA et al., 1987; DUBEY, 1988). A técnica da imunohistoquímica é específica e confirma o diagnóstico em algumas horas, sendo capaz de detectar pequenas quantidades de antígeno, pela observação de taquizoítos ou cistos com bradizoítos nos tecidos (DUBEY & LIN, 1994; VON WASIELEWSKI et al., 1997; DUBEY, 2010).

O diagnóstico ainda pode ser realizado por amplificação específica do DNA parasitário a partir de tecidos infectados utilizando a técnica da Hibridação e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MACEDO, 1994; INNES & ESTEBAN-REDONDO, 1997; MONTOYA & LIESENFELD, 2004; KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).

Avanços no conhecimento do genoma do *T. gondii* tornaram possível a utilização da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do parasito. Esta técnica se fundamenta na amplificação específica de determinados genes ou fragmentos de genes, detectando com segurança, rapidez e sensibilidade o parasito em qualquer amostra do animal infectado (WONG & REMINGTON, 1993; BASTIEN, 2002).

A PCR é uma técnica muito sensível, sendo capaz de detectar infecções por um único taquizoíto, além de ser rápida (WONG & REMINGTON, 1994; BASTIEN, 2002). Segundo Dehkordi et al., 2013 a PCR é um método de diagnóstico preciso, seguro, sensível, específico e rápido que pode ser utilizado para monitorar o parasito no leite. A parasitemia tem sido detectada com maior sensibilidade por meio dos métodos de biologia molecular, em especial a PCR, com a vantagem de demonstrar maior sensibilidade quando comparado ao isolamento do parasito em culturas de tecido (MEIRELES, 2001).

A sensibilidade e a especificidade da PCR dependem não só da sequência alvo no DNA do parasito, mas também dos pares de iniciadores de amplificação desenhados. Em geral, o gene B1 que se encontra repetido em 35 cópias no genoma é o mais utilizado. Outro gene amplamente utilizado é o gene P30, que se encontra representado como cópia única, codificando o principal antígeno de superfície do protozoário. Devido a sua elevada sensibilidade, as amostras devem ser processadas com precaução para se evitar contaminações de ácidos nucleicos do parasito por outras fontes (BURG et al., 1988; BURG et al., 1989; INNES & ESTEBAN-REDONDO, 1997).

Diversos estudos demonstraram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de diferentes fluidos corporais. Em humanos são utilizadas em

amostras de sangue de gestantes, recém-nascidos e pacientes imunodeprimidos (FILICE et al., 1993; DUPON et al., 1995; BERGSTRÖM et al., 1998; BOU et al., 1999; SPALDING et al., 2002), em líquido amniótico (GROVER et al., 1990; PELLOUX et al., 1996; CASTRO et al., 2001), placenta (SPALDING et al., 2002), lavado bronco-pulmonar (BRETAGNE et al., 1990), humor aquoso (AOUIZERATE et al., 1993; BOU et al., 1999), líquido (PARMLEY et al., 1992; DUPON et al., 1995) e urina (FACHADO et al., 1990; FUENTES et al., 1996).

A técnica da PCR tem sido bastante utilizada na Medicina Veterinária, especificamente em ovinos, principalmente em amostras de sangue (ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1998; DA SILVA & LANGONI, 2001), tecidos de fetos abortados (DUNCANSON et al., 2001; TERRY et al., 2001; MASALA et al., 2003; PEREIRA-BUENO et al., 2004), placentas (DUNCANSON et al., 2001; TERRY et al., 2001; MASALA et al., 2003) e sêmen (LOPES et al., 2009).

Hurtado et al. (2001) ao diagnosticar abortos ovinos utilizando a PCR nested demonstraram resultados altamente sensíveis e específicos, ressaltando que esta técnica pode ser utilizada para confirmar casos duvidosos. A utilização do método complementar PCR nested, como uma segunda amplificação a partir do produto gerado da primeira amplificação tem demonstrado resultados superiores aos alcançados quando se usa apenas em uma única PCR (SPALDING et al., 2002). Moraes et al. (2011) utilizaram a PCR nested para o estudo da toxoplasmose em órgãos de fetos abortados, de natimortos e em placentas de ovinos no estado de Pernambuco e constataram que a técnica demonstrou ser bastante eficiente no diagnóstico da toxoplasmose. A PCR em tempo real vem sendo bastante utilizada no diagnóstico da toxoplasmose humana e nesta metodologia são combinados os tempos de amplificação e a detecção numa mesma fase (COSTA et al., 2000; REMINGTON et al., 2004).

2.6 - Controle e profilaxia da toxoplasmose

A adoção de medidas de controle da toxoplasmose na criação de ovinos e caprinos é de grande importância, pois a presença da infecção resulta em altos prejuízos econômicos em toda a cadeia produtiva dos pequenos ruminantes, aumento do custo de produção, queda na comercialização da carne e leite e, principalmente, um constante risco para a saúde coletiva (PEREIRA, 2007). Pinheiro Jr. et al. (2009) concluíram que medidas de controle e profilaxia precisam ser adotadas, visando a melhoria do sistema de criação, além da implantação de

programas de educação sanitária junto aos produtores que esclareçam sobre as formas de transmissão da toxoplasmose.

O controle da população de gatos e roedores nas áreas de convívio dos animais, a eliminação de fêmeas sorologicamente positivas e o isolamento das suspeitas, a incineração de carcaças de animais infectados, fetos abortados e de anexos fetais constituem medidas relevantes no controle da doença em rebanhos ovinos (CAVALCANTE & XIMENES, 1999). Segundo Dubey (2010), os gatos devem ser castrados para possibilitar o controle da população de felinos nas propriedades rurais e não devem ser alimentados com carne crua, vísceras ou ossos. Descreve ainda que as membranas fetais e fetos abortados devem ser enterrados ou incinerados para prevenir a infecção dos felinos e outros animais da fazenda.

Segundo Buxton & Innes (1995), a vacina Toxovax® (Schering-Plough Animal Health Ltda.) produzida para espécie ovina a partir da cepa atenuada S48 de *T. gondii* reduz o aborto e a mortalidade neonatal, contudo segundo Stanley et al. (2004) ela não impede a infecção fetal após o desafio com uma cepa virulenta. A vacina ainda não está amplamente disponível, entretanto, não pode ser utilizada em animais imunodeprimidos e fêmeas prenhes (OIE, 2006).

Garcia et al. (2007) estudaram uma vacina administrada via nasal em gatos e verificaram uma proteção 65% a mais que no grupo controle, entretanto, o controle realizado através da vacinação ainda não vem sendo utilizado devido ao alto custo e a falta de interesse por parte dos proprietários de gatos (FRENKEL et al., 1991; FREYRE et al., 1993; GIRALDI et al., 1996).

2.7 - Aspectos da toxoplasmose humana

Segundo Amendoeira et al. (1999), a primeira descrição de um caso de toxoplasmose em humanos foi realizada por um pediatra de Praga, no ano de 1923, que encontrou um cisto do parasito na retina de uma criança de onze meses com hidrocefalia e microftalmia congênitas. O primeiro relato de um surto de toxoplasmose humana no Brasil foi feito por Magaldi et al. (1967) na cidade de Bragança Paulista, São Paulo. Os autores não chegaram a uma conclusão sobre a fonte de infecção ou vias de transmissão.

O hábito de ingerir carne e produtos de origem animal crus ou mal cozidos tem grande importância na epidemiologia da toxoplasmose, fato este, ressaltado por Bonametti et al. (1997) quando relataram um surto de toxoplasmose aguda transmitida pela ingestão de carne crua de carneiro. Barioni et al. (2009), estudando a toxoplasmose em Vitória, estado do Espírito Santo, concluíram que os ovinos podem ser considerados fontes de infecção do parasito para humanos por meio da ingestão de carne contaminada.

O primeiro surto de toxoplasmose, comprovadamente causado pela água no Brasil, ocorreu na cidade de Santa Isabel do Ivaí no estado do Paraná. Foram verificados sete casos em gestantes, sendo que uma apresentou aborto espontâneo e seis tiveram filhos infectados, um deles com anomalia congênita grave (DIAS et al., 2005).

Riemann et al. (1975) relataram um caso de infecção por *T. gondii* em crianças, onde suspeitou-se da infecção pela ingestão de leite de cabras não pasteurizado no estado da Califórnia, Estados Unidos da América. Segundo Dubey, (1980) o leite também é considerado um veículo importante do *T. gondii* ao homem. Estudos experimentais em gatas lactantes demonstraram que o leite de animais infectados possibilita a transmissão para a prole (POWELL et al., 2001).

Diversos autores afirmaram que taquizoítos já foram isolados na secreção láctea de caprinos, demonstrando em algumas regiões do mundo a importância do leite como fonte de infecção para o homem (CHIARI & NEVES, 1984; DUBEY et al., 1998; VITOR et al., 1991; SKINNER et al., 1990; POWELL et al., 2001; VERONESI et al., 2005; DEHKORDI et al., 2013). A literatura relata a presença de taquizoítos no leite em inúmeras espécies e já foram identificados casos da transmissão do parasito para humanos por meio do consumo de leite, não pasteurizado, da espécie caprina (CHIARI et al., 1987; SKINNER et al., 1990). Dubey et al. (1998) e Veronesi et al. (2005) relataram que a infecção pela ingestão de taquizoítos em produtos lácteos não pasteurizados é possível.

Sacks et al. (1982) relataram um surto ocorrido em dez membros de uma família composta por 24 pessoas. Os positivos apresentaram anticorpos da classe IgM e um indivíduo apresentou quadro compatível com retinocoroidite. Os autores não encontraram nenhum outro fator de risco que apontasse associação com a soroconversão, além do consumo de leite. Chiari & Neves (1984) relataram casos de toxoplasmose aguda em membros de uma mesma família que consumiam leite de cabras positivas para toxoplasmose. Em uma criança com

sinais da toxoplasmose aguda, Skinner et al. (1990) descreveram o hábito de consumo de leite de cabras positivas para toxoplasmose.

Paul (1998) identificou fatores de risco associados à infecção primária em mulheres em idade fértil e concluiu que o consumo de leite é um fator de risco potencial para transmissão de *T. gondii* para humanos. Tenter et al. (2000) também relataram a soroconversão para *T. gondii* em crianças que tinham o leite caprino como base da sua alimentação.

Segundo Cook et al., (2000); Tenter (2009); Camossi et al., (2011) a toxoplasmose possui um papel de grande relevância para a saúde pública mundial, principalmente, nas áreas rurais que não empregam métodos de pasteurização do leite. Dehkordi et al., 2013 recomendam a inspeção e pasteurização do leite de caprinos. Cordeiro (2006) afirmou que quase a totalidade do leite caprino produzido em países em desenvolvimento destina-se ao consumo de subsistência, principalmente por famílias das regiões subdesenvolvidas, sendo consumido próximo aos locais de produção. Na Região Nordeste do Brasil, maior produtora de caprinos do país (IBGE, 2011) ainda é comum o hábito de ingestão de leite *in natura* de cabras, principalmente por crianças alérgicas ao leite de vacas e crianças carentes. Considerando estes aspectos e a possibilidade de alguns indivíduos apresentarem enfermidades imunodepressoras, o leite de cabra pode representar uma real fonte de infecção.

3 - Objetivos

3.1 - Geral

* Detectar a presença do DNA de *T. gondii* em órgãos do sistema reprodutivo, fetos, anexos fetais e sêmen de ovinos e em leite de cabras.

3.2 - Específicos

* Estudar a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* e detectar a presença do DNA de *T. gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de reprodutores ovinos abatidos no estado de Pernambuco;

* Estudar a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* e detectar a presença do DNA de *T. gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de matrizes ovinas abatidas no estado de Pernambuco;

* Detectar a presença do DNA de *T. gondii* em fetos, embriões e placenta de matrizes ovinas abatidas no estado de Pernambuco;

* Detectar a presença do DNA de *T. gondii* no sêmen fresco de reprodutores ovinos da Região Nordeste;

* Detectar a presença do DNA de *T. gondii* no sêmen congelado de reprodutores ovinos adquiridos em Centrais de Inseminação Artificial do Brasil;

* Detectar a presença do DNA de *T. gondii* no leite de cabras da Região Nordeste do Brasil;

* Contribuir com a epidemiologia da toxoplasmose em ovinos e caprinos

4 - Referências

- AMATO NETO, V. et al. **Toxoplasmose**. 4. ed. São Paulo: Editora Salvier, 1995. 154 p.
- AMENDOEIRA, M. R.; COUTINHO, S. G. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the saliva and tonsils of a three-year-old child. **The Journal of Infectious Diseases**. Chicago, v. 145, n. 4, p. 587, 1982.
- AMENDOEIRA, M. R.; DA COSTA, T.; SPALDING, S. M. *Toxoplasma gondii* Nicole & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcosistidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**, v. 1, n. 1, p. 15-35, 1999.
- AOUIZERATE, F. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor by the polymerase chain reaction. **British Journal of Ophthalmology**, v. 77, p. 107-109, 1993.
- ASGARI, Q. et al. Molecular survey of *Toxoplasma* infection in sheep and goat from Fars province, Southern Iran. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 43, n. 2, p. 389-392, 2011.
- BARBERAN, M.; MARCO, J. C. Patogenia, cuadro clinico y lesional-toxoplasmosis. **Revista Ovis: Tratado de patologia y produccion ovina**, Madrid, n. 52, p. 35-49, 1997.
- BARBOSA, A. J. A. As técnicas de imunoperoxidase no estudo da etiologia das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 1-6, 1988.
- BARIONI, G. et al. Soroprevalência da toxoplasmose em ovinos da raça Santa Inês nos municípios da Grande Vitória – ES. **Ciência Animal Brasileira**, p. 714-719, 2009.
- BASTIEN, P. Diagnosis molecular: diagnosis of toxoplasmosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, supl. 1, p. 205-215, 2002.
- BERGSTRÖM, T. et al. Congenital *Toxoplasma gondii* infection diagnosed by PCR amplification of peripheral mononuclear blood cells from a child and mother. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 30, p. 202-204, 1998.
- BISPO, M. S. et al. Frequência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em propriedades de criação de caprinos e ovinos no estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia v.12, n.2, p. 291-297, 2011.
- BLEWETT, D. A. et al. Toxoplasmosis in rams: possible significance of venereal transmission. **The Veterinary Record**, London, v. 24, n. 111, p. 73-75, 1982.
- BONAMETTI, A. M. et al. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 30, n. 1, p. 21-25, 1997.

BORDE, G.; LOWHAR, G.; ADESIYUN, A. *Toxoplasma gondii* and *Chlamydomphila abortus* in caprine abortions in Tobago: a sero-epidemiological study. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 53, n. 4, p. 188-194, 2006.

BOU, G. et al. Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 11, p. 3465-3468, 1999.

BRETAGNE, S. et al. Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 1451-1457, 1990.

BURG, J. L. et al. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *T. gondii*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 141, p. 3584-3591, 1988.

BURG, J. L. et al. Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan. *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, p. 1787-1792, 1989.

BUXTON, D. Ovine toxoplasmosis: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, v. 83, p. 509-511, 1990.

BUXTON, D.; INNES, E. A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, Cambridge, v. 110: p. 11-16, 1995.

BUXTON, D. et al. Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. **Small Ruminant Research**, v.62, p.43-46, 2006.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. (Ed.) **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 278-286.

CAMOSSI L. G. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 256-261, 2011.

CASTRO, F. C. et al. Comparação dos métodos para diagnóstico da toxoplasmose congênita. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, p. 277-282, 2001.

CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES L. J. F. Toxoplasmose caprina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 17, p. 34-36, 1999.

CAVALCANTE, A. C. R. et al. Risk factors for infection by *Toxoplasma gondii* in herds of goats in Ceará, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 36-41, 2008.

CHIARI, C. A.; NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 3, p. 337-340, 1984.

CHIARI C. A. et al. Soroepidemiologia da Toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, p. 587-609, 1987.

CLEMENTINO, M. M. et al. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 146, n. 3/4, p. 199-203, 2007.

CONDE, M. et al. Analysis of IgG response to experimental infection with RH *Toxoplasma gondii* in goats. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Oxford, v. 24, n.3, p. 197-206, 2001.

COOK, A. J. C. et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 15, p. 142-147, 2000.

CORDEIRO P. R. C. Mercado de leite de cabras e seus derivados. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, p. 1-8, 2006.

COSTA, J. M. et al. Real time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 8, p. 2929-2932, 2000.

DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v.97, n.3, p.191-198, 2001.

DEHKORDI, F. S. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in Raw Caprine, Ovine, Buffalo, Bovine, and Camel Milk Using Cell Cultivation, Cat Bioassay, Capture ELISA, and PCR Methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 120 – 125, 2013,

DIAS, R. A.; FREIRE, R. L. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. **Semina. Ciências agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 239-248, 2005.

DINIZ, E. M. A.; CAMARGO, M. E.; COSTA VAZ, F. A. Toxoplasmose congênita. In: DINIZ, E. M. A.; COSTA VAZ, F. A. **Infecções congênitas e perinatais**. São Paulo: Atheneu, 1991. p. 31-72.

DUBEY J. P.; ADAMS, D. S. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dairy goats from 1982 to 1984. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 196, p. 295-296, 1990.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988.

DUBEY, J. P. et al. Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical, signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, p. 1072-1076, 1980.

- DUBEY, J. P. et al. Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii* induced abortions. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 188, p. 155, 1986.
- DUBEY, J. P. et al. Serodiagnosis of postnatally and prenatally induced toxoplasmosis in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 48, p. 1239-1243, 1987.
- DUBEY, J. P. et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **The Journal Parasitology**, Kansas, v. 81, n. 5, p. 723-729, 1995.
- DUBEY, J. P. et al. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 267-299, 1998.
- DUBEY, J. P.; HAMIR, A. N. Experimental toxoplasmosis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 3, p. 514-519, 2002.
- DUBEY, J. P. Lesions in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 32, n. 2-3, p. 133-144, 1989.
- DUBEY, J. P. Lesions in transplacentally induced toxoplasmosis in goats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 905-909, 1988.
- DUBEY, J. P.; LIN, T. L. Acute toxoplasmosis in a gray fox (*Urycion cenreargenteus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 51, n. 3/4, p. 321-325, 1994.
- DUBEY, J. P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 15, p. 1203-1207, 1980.
- DUBEY, J. P. Protective immunity against clinical toxoplasmosis in dairy goats vaccinated with *Hammondia hammondi* and *Hammondia heydorni*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 42, p. 2068-2070, 1981.
- DUBEY, J. P. A Review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 22, p. 177-202, 1986.
- DUBEY, J. P. Serologic prevalence of Toxoplasmosis in cattle, sheep, goats, pigs, bison and elk in Montana. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 186, n. 9, p. 969-970, 1985.
- DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, n. 5, p. 794-795, 1980.
- DUBEY, J. P. Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 196, p. 259-262, 1990.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep – the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, p. 1-14, 2009.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 220.

DUNCANSON, P. et al. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, p. 1699-1703, 2001.

DUPON, M. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2421-2426, 1995.

ESCOPELLI, K. S. Avaliação sorológica de anticorpos da classe de IgG para *Toxoplasma gondii* em soros de ovinos da região da Grande Porto Alegre-RS, através das técnicas de Hemaglutinação Indireta (HAI) e Imunofluorescência Indireta (IFI). 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 1459-1466, 1998.

FACHADO, A. et al. Technique for detection of *Toxoplasma gondii* antigens in mouse urine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 65-68, 1990.

FARIA, E. B. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 1-2, p. 126-129, 2007.

FARREL, R. L. et al. Toxoplasmosis. *Toxoplasma* isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 13, p. 181-185, 1952.

FELDMAN, H.; MILLER, L. Serological study of toxoplasmosis prevalence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 64, p. 320-335, 1956.

FIGLIUOLO, L. P. C. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 123, p. 161-166, 2004.

FILICE, G. A. et al. Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 9, p. 2327-2331, 1993.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ícone, 1997. p. 139-143.

FRENKEL, J. K. et al. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 52, p. 759-763, 1991.

FRENKEL, J. K. et al. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidia oocysts. **Science**, Washington, v. 167, p. 893-896, 1970.

FREYRE, A. et al. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 13-15, 1997.

FREYRE, A. L. et al. Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, Oxford, v. 79, p. 716-719, 1993.

FUENTES, I. et al. Urine samples used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 10, p. 2368-2371, 1996.

GARCIA, G. et al. *Toxoplasma gondii* in goats from Curitiba, Paraná, Brazil: risks factors and epidemiology. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 42-47, 2012.

GARCIA, J. L. et al. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, p. 197-206, 2007.

GIRALDI, N. et al. Estudo da toxoplasmose congênita natural em granjas de suínos em Londrina, PR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, p. 83-90, 1996.

GROVER, C. M. et al. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 10, p. 2297-2301, 1990.

HURTADO, A. et al. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 102, 17-27, 2001.

IBGE. **Produção da pecuária municipal, Brasil**. Rio de Janeiro, 2011. v. 35, p. 1-62.

INNES, E. A.; ESTEBAN-REDONDO, M. I. Diagnostico - Toxoplasmosis. **Revista Ovis: Tratado de patologia y produccion ovina**, Madrid, n. 52, p. 51-56, 1997.

JACOBS, L.; MELTON, M. L.; COOK, M. K. Observations on toxoplasmosis in dogs. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 41, p. 353-361, 1966.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da Toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 229-235, 2005.

KOTULA, A. W. et al. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 54, n. 9, p. 687-690, 1991.

LANGONI, H. et al. Inquérito soropidemiológico para a toxoplasmose em ovinos no Estado de São Paulo, Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v. 61, n. 1, p. 35-39, 1999.

LOPES W. D. Z. et al. Pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1909) em ovinos do município de Jaboticabal, SP. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIQUETSIOSES, 12., Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: 2006.

- LOPES, W. D. Z. et al. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 111, n. 3, p. 312-319, 2009.
- LUCIANO, D. M. et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose em caprinos e ovinos de três municípios do estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 7, 2011.
- LUZON, M.; ALONSO, A.; QUINTANILLA GOZALO, A. Etiologia y biología - Toxoplasmosis. **Revista Ovis: Tratado de Patología y Produccion Ovina**, Madrid, n. 52, p. 11-17, 1997a.
- LUZON, M.; MIRÓ, G., A.; QUINTANILLA GOZALO, A. Epidemiologia - Toxoplasmosis. **Revista Ovis: Tratado de Patología y Produccion Ovina**, Madrid, n. 52, p. 19-33, 1997b.
- MACEDO, O. M. Toxoplasmose. In: CASTRO, L. P.; CUNHA, A. S.; REZENDE, J. M. **Protozooses humanas**. São Paulo: BYK, 1994, p. 153-170.
- MACHADO, T. M. M.; LIMA, J. D. Frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em caprinos criados sob diferentes formas de exploração no estado de Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 39, n. 2, p. 255-264, 1987.
- MACIEL, B. K. P.; ARAUJO, F. A. P. Sorological inquiry for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in goats (*Capra hircus*) raised in gravataí and viamão counties, Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 3, n. 2, p. 121-125, 2004.
- MAGALDI, C. et al. Surto de toxoplasmose em seminário de Bragança Paulista (Estado de São Paulo). Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, v. 1, n. 2, p. 141-171, 1967.
- MANAIR, R. C. et al. Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madrid Region, Spain, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. **Veterinary Research Communications**, v. 20, n. 2, p. 153-159, 1996.
- MARTINEZ-GARCIA, F. et al. Protozoan infections in the male genital tract. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 156, p. 340-349, 1996.
- MASALA, G. et al. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 1-2, p. 15-21, 2003.
- MCSPORRAN, K. D. et al. Toxoplasmosis in goats. **New Zealand Veterinary Journal**, New Zealand, v. 33, n. 3, p. 39-40, 1985.
- MEIRELES, L. R. **Estudo das fontes de infecção da Toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo**. 2001. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MORAES, E. P. B. X. et al. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, p. 318-322, 2010a.

MORAES, E. P. B. X. et al. Characterization of reproductive disorders in ewes given an intrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during the intrauterine insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, p. 36-41, 2010b.

MORAES, E. P. B. X. et al. *Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetuses and stillborns in the State of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, p. 152-155, 2011.

MUNDAY, B. L.; MASON, R. W. Toxoplasmosis as a cause of perinatal death in goats. **Australian Veterinary Journal**, Artarmon, v. 55, n. 10, p. 485-487, 1979.

NAVARRO, I. T. et al. *Toxoplasma gondii*: isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, PR. **Semina. Ciências agrárias**, Londrina, PR, v. 13, p. 15-18, 1992.

NETO, J. O. et al. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 156, n. 3-4, p. 329-332, 2008.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 6. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1985. p. 141-52.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. **Clinical Reviews of Academic Science**, Paris, v. 147, p. 763-766, 1908.

NIETO, S. O.; MELENDEZ, R. D. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in goats from arid zones of Venezuela. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 84, p. 190-191, 1998.

NISHIKAWA, H. et al. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic animals in Rio Grande do Sul State, Brazil. In: I ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 1984. 62p.

NISHI, M. et al. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, London, v. 121, p. 1559-1568, 2008.

OBENDORF, D. L.; STATHAM, P.; MUNDAY, B. L. Resistance to toxoplasma abortion in female goats previously exposed to *Toxoplasma* infection. **Australian Veterinary Journal**, n. 67, p. 233-234, 1990.

OGAWA, I. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos da microrregião de Londrina no Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, PR, v. 24, n. 1, p. 57-62, 2003.

OIE. **Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis)**: manual of Standards for diagnostic tests and vaccines. 4. Ed., 2006.

OLAFSON, P.; MONLUX, W. S. *Toxoplasma* infection in animals. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 32, n. 2, p. 176-190, 1942.

PARMLEY, S. F.; GOEBEL, F. D.; REMINGTON, J. S. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 11, p. 3000-3002, 1992.

PAUL, M. Potential risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cases with recently acquired toxoplasmosis. **Przegląd Epidemiologiczny**, v. 52, p. 447-454, 1998.

PEIXOTO, R. M.; PEREIRA, M. F.; MOTA, R. A. Participação do *Toxoplasma gondii* em falhas reprodutivas nas espécies ovina e caprina no Estado de Pernambuco. In: ALBUQUERQUE, U. P. de et al. (Org.). **Caminhos da ciência**. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2006. v. 1, p. 93-104.

PELLOUX, H. et al. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 138, n. 1, p. 11-15, 1996.

PEREIRA-BUENO, J. et al. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 121, n. 3-4, p. 353, 2004.

PEREIRA, M. F. **Aborto infeccioso em pequenos ruminantes no estado de Pernambuco**: aspectos epidemiológicos, sorológicos, moleculares e anátomo-histopatológicos. 2007. 147 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

PINHEIRO JÚNIOR, J. W. et al. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 105, p. 709-715, 2009.

POWELL, C. C.; BREWER, M.; LAPPIN, M. R. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 29-33, 2001.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 3, p. 941-945, 2004.

RIEMANN, H. P. et al. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. **The Journal of Pediatrics**, v. 87, p. 573-576, 1975.

ROCHA, R. J.; TAFURI, W. I.; CHIARI, C. A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* pela urina de camundongos durante a fase aguda da infecção experimental. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 307-313, 1993.

SACKS J. J.; ROBERTO, R. R.; BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **Journal of the American Medical Association**, Schaumburg, v. 248, p. 1728-1732, 1982.

SANTANA, L. F. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 179-182, jul./set. 2010.

SAWADOGO, P. et al. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 130, p. 89-92, 2005.

SCARPELLI, L. C. et al. Venereal transmission viability of *Toxoplasma gondii* in bovines. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 18, 2001, Stresa, Italy, 2001. v. B, p. 26-30.

SILVA, A. V. et al. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 7-11, 2002.

SILVA, A. V. et al. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v. 33, n. 1, p.115-119, 2003.

SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 191-198, 2001.

SIMPLÍCIO, A. A. et al. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos de corte em Regiões Tropicais. Sobral: **Embrapa Caprinos**, 2001. 47 p. (Embrapa Caprinos. Documento, 35).

SKINNER, L. J. A. C. et al. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goat owner's family. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, London, v. 22, p. 359-361, 1990.

SKJERVE, E. et al. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 219-227, 1998.

SOARES J. G. et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos do município de São Luís, MA. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 660-668, 2010.

SPALDING, S. M. et al. Otimização da reação de Polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 105-110, 2002.

SPENCE, J. B. et al. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. **The Veterinary Record**, London, v. 14, n. 102, p. 38-39, 1978.

SPLENDORE, A. Um nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. **Sociedade Científica de São Paulo**, São Paulo, v. 3, p. 109-112, 1908.

STACHISSINI, A. V. M. *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em caprinos do estado de São Paulo: perfis soro-epidemiológicos e co-infecção com o vírus da artrite-encefalite caprina. 2005. 105 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu.

STANLEY, A.C. et al. Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. **Vaccine**, Kidlington, Inglaterra, v. 22, p. 3929-3941, 2004.

TEALE, A. J. et al. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: the clinical syndrome and semen secretion of *Toxoplasma*. **The Veterinary Record**, London, v. 17, n. 111, p. 53-55, 1982.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TENTER A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 364-369, 2009.

TERRAGNA, A. et al. Isolation of "*Toxoplasma gondii*" from saliva of rabbits. **Annali Scavo; Rivista di Microbiologia e di Immunologia**, Siena, Italia, v. 23, n. 4, p. 477-485, 1981.

TERRY, R. S. et al. MGE-PCR: a novel approach to the analysis of *Toxoplasma gondii* strain differentiation using mobile genetic elements. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 155-161, 2001.

TSUNEMATSU, Y. et al. Three cases of lymphadenopathy toxoplasmic with reference to the application of fluorescent antibody technique for detection of *Toxoplasma* in tissue. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 34, n. 4, p. 217-230, 1964.

UCHOA, C. M. A. et al. Pradonização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 661-669, 1999.

UGGLA, A. et al. Immunohistochemical diagnosis to toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 48, n. 3, p. 348-351, 1987.

UNDERWOOD, W. J.; ROOK, J. S. Toxoplasmosis infection in sheep. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, North American Edition, v. 14, p. 1543-1549, 1992.

UZEDA, R. S. et al. Fatores relacionados à presença de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros do estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 5, p. 1-8, 2004.

VAN DER PUIJE, W. N. et al. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 76, p. 21-26, 2000.

VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina: Clínica agrária**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 69-75, 1992.

VITOR, R. W. A.; PINTO, J. L.; CHIARI, C. A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 42, n. 2, p.147-154, 1991.

VON WASIELEWSKI, R. et al. Tyramine amplification technique in routine immunohistochemistry. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 45, n. 11, p. 1455-1459, 1997.

WEISSMANN, J. Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. **The Canadian Veterinary Journal**. Guelph, v. 44, p. 322-324, 2003.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. **Biology of *Toxoplasma gondii***. **AIDS**, v. 7, n. 3, p. 299-316, 1993.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 18, p. 853-861, 1994.

CAPÍTULO 1

**DETECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* EM ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTIVO
DE CARNEIROS NO BRASIL**

(Artigo aceito na revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

Detecção de *Toxoplasma gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros naturalmente infectados no Brasil¹

Mauro José Gonçalves Bezerra², Jefferson Ayrton Leite de Oliveira Cruz³, Eugênio de Souza Kung³, Renata Pimentel Bandeira de Melo³, Ana Lisa do Vale Gomes³, Érica Paes Barreto Xavier de Moraes⁴, José Wilton Pinheiro Junior⁴ e Rinaldo Aparecido Mota^{3*}

ABSTRACT.- Bezerra M.J.G., Cruz J.A.L.O., Kung E.S., Melo R.P.B., Gomes A.L.V., Moraes E.P.B.X., Pinheiro Junior J.W. & Mota R.A. 2013. [**Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive organs of rams in Brazil.**] Detecção de *Toxoplasma gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(8):989-991. Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

The aim of the study was to detect genomic DNA of *Toxoplasma gondii* in testicle and epididymis samples from rams sold in abattoirs in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. Fifty (50) blood serum samples were collected, as well as 50 testicle and epididymis samples. Indirect Immunofluorescence (IIF) was used during screening of the rams. The Polymerase Chain Reaction (PCR) was used with animals that were positive in serology. Our results confirmed that 24% (12/50) of the rams were positive in IIF. Genomic DNA was detected in the epididymis at 8.3% (1/12) of the animals. The molecular identity of the amplified products was confirmed through sequencing. This paper reports the first occurrence of *T. gondii* DNA in the reproductive organs of naturally infected rams in Brazil.

INDEX TERMS: Toxoplasmosis, reproductive organs, rams, sheep, Polymerase Chain Reaction (PCR).

RESUMO.- Objetivou-se com esse estudo detectar o DNA genômico de *T. gondii* em amostras de testículo e epidídimo de ovinos comercializados em abatedouros do Estado de Pernambuco Região Nordeste do Brasil. Foram coletadas 50 amostras de soro sanguíneo, 50 amostras de testículos e 50 de epidídimos. Para a triagem dos animais foi utilizada a técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e posteriormente empregou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos animais positivos na sorologia. Observou-se 24% (12/50) dos animais positivos na RIFI e o DNA genômico foi detectado no epidídimo em 8,3% (1/12) das amostras. A identidade molecular dos produtos amplificados foi confirmada por sequenciamento. Relata-se a primeira ocorrência da presença do DNA de *T. gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros naturalmente infectados no Brasil.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Toxoplasmose, órgãos de reprodutivos, carneiros, ovinos, PCR.

INTRODUÇÃO

O rebanho ovino no Brasil está entre os dez maiores do mundo com um efetivo de mais de 17,4 milhões de cabeças e na Região Nordeste concentram-se aproximadamente 56,7% do rebanho nacional, ocupando o Estado de Pernambuco o quarto lugar do ranking nacional (IBGE 2010). Contudo, na maioria das explorações no Nordeste Brasileiro, a produtividade ainda é baixa sendo causada principalmente devido aos problemas de sanidade animal (Simplício et al. 2001).

A toxoplasmose é uma importante zoonose de distribuição mundial que causa diversos transtornos reprodutivos em vários hospedeiros intermediários. O parasito responsável por essa doença é *Toxoplasma gondii*, um protozoário com reprodução intracelular obrigatória, podendo ser encontrado nos diferentes exsudatos dos animais infectados

¹ Recebido em 17 de maio de 2013.

Aceito para publicação em 8 de julho de 2013.

² Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE), Praça Ministro João Gonçalves de Souza s/n, Engenho do Meio, Recife, PE 50670- 500, Brasil.

³ Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900. *Autor para correspondência: rinaldo.mota@hotmail.com Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE 55292-270, Brasil.

990

Mauro José Gonçalves Bezerra et al.

Pesq. Vet. Bras. 33(8):989-991, agosto 2013

(Nicolle & Manceaux 1908, Dubey et al. 1980, 1995, Dubey & Sharma 1980, Uggla 1986, Underwood & Rook 1992, Luzon et al. 1997a, Tenter et al. 2000, Kompalic-Cristo et al. 2005).

Em ovinos, a primeira descrição do agente ocorreu por Olafson & Monlux (1942) nos Estados Unidos, e desde então, inúmeros trabalhos demonstram a importância econômica da infecção nesta espécie como causa de abortos e natimortos, além de servirem de fonte de infecção para o homem e embora seu ciclo de vida seja conhecido desde o final da década de 1960, muitos aspectos relacionados à infecção por *T. gondii* ainda precisam ser esclarecidos (Freyre et al. 1997, Bastien 2002).

Estudos epidemiológicos recentes realizados em Pernambuco por Peixoto et al. (2006), demonstraram que a infecção por *T. gondii* encontra-se disseminada nos rebanhos de ovinos, estando diretamente relacionada com falhas reprodutivas, demonstrando a necessidade de se intensificar os estudos sobre a importância da transmissão horizontal do parasito para contribuir com as investigações epidemiológicas, clínicas e reprodutivas na infecção pelo *T. gondii* nesta espécie.

Moraes et al. (2010a) estudaram a infecção natural por *T. gondii* em carneiros e observaram 9,2% de positivos na sorologia e na PCR nested, 66,6% das amostras de sêmen foram positivas. Concluíram que a detecção da forma proliferativa de *T. gondii* no sêmen de carneiros naturalmente infectados reforça a necessidade de se pesquisar a possibilidade da transmissão horizontal do parasito na espécie ovina.

Objetivou-se com esse estudo detectar o DNA genômico de *T. gondii* em amostras de testículo e epidídimo de carneiros naturalmente infectados e abatidos em matadouros no Estado de Pernambuco, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de soro sanguíneo e de órgãos do sistema reprodutivo. Nos anos de 2010 e 2011 foram coletadas 50 amostras de soro sanguíneo, 50 amostras de epidídimo e 50 de testículo de reprodutores ovinos de diferentes raças e idades em matadouros no Estado de Pernambuco, Brasil. Os ovinos eram procedentes de criações comerciais situadas na região Agreste do estado de Pernambuco.

Sorologia. Utilizou-se a RIFI como triagem para detectar os animais positivos que foram posteriormente utilizados para a realização da PCR. Para a detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* foi empregada a RIFI de acordo com o protocolo preconizado por Camargo (1964), utilizando-se anticorpos anti-IgG-ovino (Sigma®) conjugado ao isotiocianato de fluoresceína, com ponto de corte 64, utilizando-se como antígeno, taquizoítos da cepa RH. Em todas as reações foram incluídos controle positivo e negativo, previamente conhecidos.

Exame molecular para detecção de DNA de *Toxoplasma gondii*. As amostras de testículo e epidídimo foram submetidas à extração de DNA, utilizando-se Kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®), seguindo o protocolo do fabricante. Os pares iniciadores utilizados foram TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) segundo Homan et al. (2000), amplificando uma região de 529 pares de base (pb). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12,5mL contendo: 2,5µL de DNA genômico; 0,5µL de cada primer (TOX4 e TOX5) à 10µM; 2,5µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de Top Taq Master Mix (Quiagen®), de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foi feito em um termociclador XP Thermal Cycler (Bioer Technology Co. Ltda), consistindo de uma desnaturação do DNA inicial a 94°C (7min) e seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 60°C por 1 minuto para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Blue Green (LGC®), visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. O controle positivo utilizado na reação foi obtido por meio de suspensão de lavados intraperitoneais de camundongos previamente infectados com a cepa RH.

Para o sequenciamento, os produtos amplificados foram purificados empregando kit comercial GFX™ PCR DNA e kit de purificação de bandas em gel de agarose GE Healthcare. Utilizou-se o sequenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems), as reações foram realizadas em ambas as cadeias utilizando iniciadores (TOX4 e TOX5) de acordo com o Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e as condições de polimerização foram realizadas em placas de 96 poços de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram analisadas através BIOEDIT e MEGA 5 software e comparadas com o banco de dados do NCBI usando BLAST.

RESULTADOS

Na sorologia, foram detectados 12/50 (24%) amostras positivas. Na PCR realizada nas amostras de testículo e epidídimo dos doze animais positivos na sorologia, detectou-se o DNA de *T. gondii* em uma amostra de epidídimo (01/12), correspondendo a 8,33%. A identidade molecular foi confirmada através do sequenciamento de fita dupla direta que indicou 99,9% de similaridade com as sequências de DNA de *T. gondii* armazenados no GENBANK (DQ779196.1).

DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro no que se refere à detecção de DNA de *Toxoplasma gondii* em órgão reprodutivo (epidídimo) de carneiro naturalmente infectado. Outros estudos realizados anteriormente utilizaram carneiros experimentalmente infectados e demonstraram a presença do parasito em amostras seminais. Spence et al. (1978) realizaram o primeiro isolamento de *T. gondii* e mais tarde, Aganga et al. (1988) recuperaram *T. gondii* em amostras de sêmen de 100% dos carneiros infectados com a cepa TS-1. Teale et al. (1982) também observaram o parasito em amostras de sêmen. Apesar desta observação, até o momento ainda não se comprovou a transmissão do parasito via sêmen na infecção natural.

A busca do parasito em órgãos reprodutivos de carneiros naturalmente infectados realizado neste estudo foi estimulada, em parte, pelos resultados obtidos na infecção experimental realizada por Moraes et al. (2010b) e Moraes et al. (2010c) que infectaram ovelhas com sêmen contaminado com diferentes doses de *T. gondii* e observaram, através de exames ultrassonográficos, transtornos reprodutivos como reabsorções embrionárias, morte fetal e aborto. O estudo comprovou a transmissão do parasito via sêmen experimentalmente contaminado em ovelhas e uma elevada frequência de absorção embrionária, indicando a colonização

991

Detecção de *Toxoplasma gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros naturalmente infectados no Brasil

Pesq. Vet. Bras. 33(8):989-991, agosto 2013

precoce da placenta e embrião no início da gestação, o que demonstrou que este aspecto deveria ser melhor investigado na infecção natural. A presença do DNA de *T. gondii* em órgãos reprodutivos é um resultado relevante e demonstra a necessidade de outras investigações sobre a repercussão deste achado na infecção natural.

A detecção do DNA de *T. gondii* no presente estudo não indica necessariamente que este parasito está viável para infectar ovelhas durante a cópula. Para comprovar esta hipótese e sua real importância na reprodução desta espécie é necessário avaliar a quantidade do parasito presente neste órgão e no sêmen e sua viabilidade por meio de bioprova. Neste estudo isso não foi possível, pois os órgãos foram colhidos em matadouros o que dificultou a realização de coletas de amostras de sêmen para a inoculação em camundongos. Em caprinos experimentalmente infectados, Santana et al. (2010) isolaram *T. gondii* em amostras de sêmen e em amostras de tecido do sistema reprodutivo, utilizando a técnica da PCR e bioprova e sugeriram a possibilidade de transmissão venérea deste coccídeo nesta espécie. O isolamento (estudo da viabilidade) e quantificação de *T. gondii* no sistema reprodutor de ovinos (epidídimo e sêmen) naturalmente infectados poderá sugerir a participação desta via na transmissão do parasito nos rebanhos.

A presença do DNA de *T. gondii* neste órgão reprodutivo na infecção natural de ovinos ainda necessita de estudos mais detalhados para determinar possíveis alterações andrológicas e reprodutivas. Sobre este aspecto, Terpsidis et al. (2009) em estudos experimentais afirmaram que a infecção experimental por *T. gondii* pode causar alterações andrológicas e reprodutivas em camundongos. Lopes et al. (2009) também identificaram patologias espermáticas em carneiros experimentalmente infectados, contudo concluíram que estas poderiam não estar relacionadas à infecção por *T. gondii*.

Neste estudo não foi possível estimar a fase da infecção e se os animais estavam eliminando o parasito no sêmen. A detecção de *T. gondii* em amostra de epidídimo em ovino naturalmente infectado estimula a realização de estudos sobre outras vias de transmissão nesta espécie.

REFERÊNCIAS

- Aganga A.A., Alabi O. & Momoh M. 1988. Effect of water deprivation on nutrient digestibility, nitrogen retention, and water excretion in Yankasa sheep and Maradi goats. Nigerian J. Anim. Prod. 15:139-143.
- Bastien P. 2002. Diagnosis molecular: diagnosis of toxoplasmosis. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hygiene 96(1):205-215.

- Camargo M.E. 1964. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Revta Bras. Patol. Clín.* 10:143-71.
- Dubey J.P. & Sharma S.P. 1980. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. *Am. J. Vet. Res.* 41(5):794-795.
- Dubey J.P., Sharma S.P., Lopes C.W.G., Williams J.F., Williaors C.S.F. & Weisbrode S.E. 1980. Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.* 41:1072-1076.
- Freyre A., Bonino J., Falcon J., Castells D., Correa O. & Casaretto A. 1997. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet. Parasitol.* 73(1/2):13-15.
- Homan W.L., Vercammen M., De Braekeleer J. & Verschueren H. 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30(1):69-75.
- IBGE 2010. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 38, Tabela 17.
- Kompalic-Cristo A., Britto C. & Fernandes O. 2005. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de J.*, 41(4):229- 235.
- Lopes W.D.Z., Costa A.J., Souza F.A., Rodrigues J.D.F., Costa G.H.N., Soares V.E. & Silva G.S. 2009. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Anim. Reprod. Sci.* 111:312-319.
- Luzon M., Alonso A. & Quintanilla-Gozalo A. 1997. Etiologia y biología: toxoplasmosis. *Revta Ovis, Tratado de Patología y Produccion Ovina, Madrid*, 52:11-17.
- Moraes, E.P.B.X., Faria E.B., Batista A.M., Freitas A.C., Silva J.C.R., Albuquerque P.P.F. & Mota R.A. 2010a. *Toxoplasma gondii* detection in the semen of naturally infected sheep. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):915-917.
- Moraes E.P.B.X., Batista A.M., Faria E.B., Freire R.L., Freitas A.C., Silva M.A.R., Braga V.A. & Mota R.A. 2010b. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Vet. Parasitol.* 170:318-322.
- Moraes E.P.B.X., Freitas A.C., Gomes-Filho M.A., Guerra M.M.P., Silva M.A.R., Pereira M.F., Braga V.A. & Mota R.A. 2010c. Characterization of reproductive disorders in ewes given anintrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during the intrauterine insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 122:36-41.
- Nicolle C. & Manceaux L. 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. *Clin. Rev. Acad. Sci., Paris*, 147:763-766.
- Olafson P. & Monlux W.S. 1942. *Toxoplasma* infection in animals. *Cornell Vet., Ithaca*, 32(2):176-190.
- Peixoto R.M., Pereira M.F. & Mota R.A. 2006. Participação de *Toxoplasma gondii* em falhas reprodutivas nas espécies ovina e caprina no Estado de Pernambuco, p.93-104. In: Albuquerque U.P., Vêras A.S.C., Freire F.J. & Lira Júnior M.A. (Eds), *Caminhos da Ciência. Vol.1. Editora Universitária, UFRPE, Recife.*
- Santana L.F., Costa A.J., Pieroni J., Lopes W D.Z., Santos R.S., Oliveira G.P., Mendonça R.P. & Sakamoto C.A.M. 2010. Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 19(3):179-182.
- Simplício A.A., Salles H.O., Santos D.O. & Azevedo H.C. 2001. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos de corte em regiões tropicais. *Doc.35, Embrapa Caprinos. Sobral*, p.47.
- Spence J.B., Beattie C.P., Faulkner J., Henry L. & Watson W.A. 1978. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. *Vet. Rec.* 14(102):38-39.
- Teale A.J., Blewett D.A., Miller J.K. & Buxton D. 1982. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: the clinical syndrome and semen secretion of *Toxoplasma*. *Vet. Rec.* 17(111):53-55.
- Tenter A.M., Heckeroth A.R. & Weiss L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30(12/13):1217-1258.
- Terpsidis K.I., Papazahariadou M.G., Taitzoglou I.A., Papaioannou N.G., Georgiadis M.P. & Theodoridis I.T. 2009. *Toxoplasma gondii*: reproductive parameters in experimentally infected male rats. *Exp. Parasitol.* 121:238-241.
- Uggla A. 1986. *Toxoplasma gondii* in farm animals: some immunodiagnostic methods and their potential use. *Merkantil-Tryckeriet, Uppsala*, p.1-56.
- Underwood W.J. & Rook J.S. 1992. Toxoplasmosis infection in sheep. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 14:1543-1549.49.

CAPÍTULO 2

OCCURRENCE OF *Toxoplasma gondii* DNA IN SHEEP NATURALLY INFECTED AND SLAUGHTERED IN SLAUGHTERHOUSES IN PERNAMBUCO, BRAZIL

(Artigo aceito na revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

OCCURRENCE OF *Toxoplasma gondii* DNA IN SHEEP NATURALLY INFECTED AND SLAUGHTERED IN SLAUGHTERHOUSES IN PERNAMBUCO, BRAZIL

Mauro José Gonçalves Bezerra¹, Jefferson Ayrton Leite de Oliveira Cruz², Eugênio de Souza Kung², José Givanildo da Silva², André de Souza Santos², Érica Paes Barreto Xavier de Moraes³, José Wilton Pinheiro Junior³, Rinaldo Aparecido Mota².

¹Veterinarian at the *Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste* (SUDENE), Praça Ministro João Gonçalves de Sousa, s/n, Engenho do Meio, 50.670-900 Recife - PE, Brazil;

²Laboratory of Infectious Contagious Diseases in Domestic Animals, *Universidade Federal Rural de Pernambuco*, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brazil.

³*Unidade Acadêmica de Garanhuns - Universidade Federal Rural de Pernambuco*, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista - CEP: 55292-270 - Garanhuns/PE, Brazil.

Abstract: The aim of the present study was to assess the occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and to detect genomic DNA of the parasite in the reproductive organs, fetuses and fetal membranes of sheep in slaughterhouses in the state of Pernambuco, Brazil. Samples were collected from the blood, uterus, tubes, ovaries, fetuses and placenta of the sheep. The Indirect Immunofluorescence technique (IFA) was used for screening. The Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to detect DNA of *T. Gondii* in the animals that were positive in the serology, as well as with all of the fetuses and fetal membranes. In the serology, 13/50 samples were positive and genomic DNA of *T. gondii* was detected in one uterus, tube, ovary, placenta and fetus (heart, brain and umbilical cord) sample from a sheep that was positive in the serology. The molecular identity of the amplified products was confirmed by sequencing. The present study provides evidence of the occurrence of *T. gondii* DNA in the organs of the reproductive system, placenta and fetus of a naturally infected sheep.

Keywords: Toxoplasmosis; sheep; Polymerase Chain Reaction (PCR)

1. Introduction

Toxoplasmosis is a significant zoonosis with a worldwide distribution and is considered to be one of the main causes of reproductive disorders in sheep worldwide (DUBEY &

SCHMITZ, 1981; DUBEY, 1986; DUBEY et al., 1986; DUBEY, 1988; UNDERWOOD & ROOK, 1992).

Barberan & Marco (1997) studied the reproductive aspects of ovine toxoplasmosis and reported the following possible results: embryo resorption; abortion; malformed fetuses and weak, debilitated offspring. Sheep are usually infected by ingesting oocysts with food and water, although congenital transmission is also considered to be significant in this species (BLEWETT et al., 1982; DUNCANSON et al., 2001; WILLIAMS et al., 2005; BUXTON et al., 2006).

In Denmark, Thamsborg et al. (1994) reported abortions related to toxoplasmosis in naturally infected sheep using techniques of histopathology and bioassays with mice. In Spain, Pereira & Bueno (2004) also demonstrated the presence of *T. gondii* DNA in aborted fetuses from naturally infected sheep. Masala et al. (2007) detected *T. gondii* DNA in the tissues of aborted fetuses in Italy. In Brazil, Moraes et al. (2011) found *T. gondii* in aborted and stillborn sheep fetuses in nested PCR, thereby demonstrating the significance of this disease in sheep reproduction.

Among naturally infected animals, there are no records of the occurrence of this parasite in the reproductive organs, fetuses or embryos of sheep that were slaughtered for consumption. Since the distribution of *T. gondii* in tissues from slaughtered animals has already been studied extensively in farm animals, the present study aimed to investigate the presence of this parasite in organs that have not yet been studied, associated with reproductive aspects. The sexual transmission of this parasite was recently proven in association with the experimental infection of sheep (Moraes et al., 2010a and Moraes et al., 2010b). This result inspired the performance of the present study, which aimed to detect genomic DNA of *T. gondii* in the uterus, tubes, ovaries, fetuses and placenta of sheep that were serologically positive and slaughtered in slaughterhouses in the state of Pernambuco, Brazil.

2. Materials and Methods

2.2. Blood serum samples, organs of the reproductive system, fetus and placenta

Fifty blood serum samples, 50 uterus, tube and ovary samples, 15 fetuses and 15 placentas were collected from sheep of different breeds in slaughterhouses in the state of Pernambuco, Brasil.

2.3 Serology

Indirect Immunofluorescence (IFA) was used to detect IgG antibodies to *T. Gondii*, as described by Camargo (1964): anti-sheep IgG (Sigma®); conjugated to fluorescein isothiocyanate; a cut-off point of 64; using tachyzoites of the RH strain as an antigen; previously known positive and negative control reactions were included in all groups.

2.4 Molecular examination to detect *T. Gondii* DNA

Tissue samples from the sheep that were positive in the serology were sent for a molecular examination. Tissue samples from the females (uterus, tubes and ovaries) and the fetuses (brain, heart, placenta and umbilical cord) were used for DNA extraction. The DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification (Promega®) commercial kit, following the manufacturer's instructions.

The primer pairs used in the PCR were TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) and TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT), as described by Homan et al. (2000), amplifying a region of 529 base pairs (bp). The amplification reactions were conducted at a final volume of 12.5µL containing: 2.5µL of genomic DNA; 0.5µL of each primer (TOX4 and TOX5) at 10µM; 2.5µL of ultra-pure Milli-Q water and 6.25µL of Top Taq Master Mix (Quiagen®), following the manufacturer's instructions. The thermal profile of the stages of the reaction was conducted in an XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO. LTDA). This process consisted of an initial DNA denaturation at 94°C (7minutes), followed by 35 cycles at 94°C for 1 minute for denaturation, 60°C for 1 minute for annealing, 72°C for 1 minute for extension and a final extension of 10 minutes at 72°C. The products amplified were detected by electrophoresis in agarose gel 2%, stained with Blue Green (LGC®), visualized in ultraviolet light and photodocumented. The positive control used in the reaction was obtained by suspending the washed intraperitoneal of mice that were previously infected with the RH strain.

For the sequencing, the products amplified were purified using commercial GFX™ PCR DNA and a Gel Band Purification kit (GE Healthcare). Using the sequencer ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems), reactions were carried out in both strands using the primers (TOX4 and TOX5), according to the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The polymerization was performed in 96-well plates, following the manufacturer's instructions. Sequences were analyzed through Bioedit and MEGA 5 software and compared with the NCBI database using Blast.

3. Results

In the serology, 13/50 samples tested were positive. Of the 50 sheep studied, 09 were pregnant and 05 were positive in the IFA.

In the PCR, one pregnant sheep was positive for *T. gondii* (uterus, tubes and ovaries). The placenta and fetus were also positive (heart and brain). The other 14 fetuses and placentas were negative.

The molecular identity was confirmed through direct double-stranded sequencing which indicated 99.9% similarity with the DNA sequences of *T. gondii* stored in the GENBANK (DQ779196.1).

4. Discussion

In the present study, the frequency of 26% of positive sheep obtained in the IFA is close to the results obtained by Silva et al. (2003) in the same region: 35.3% of seropositive sheep. Other studies in several regions of Brazil have recorded values ranging from 7% to 55%, which may reflect the different temperatures and humidity levels of the regions studied, as well as the age of the animals, the breeding system, the serological test and the cut-off point used. Serological studies in several countries worldwide have investigated the prevalence of antibodies to *T. gondii* in sheep, and the results range from 3% to 92% (DUBEY, 1990; DUBEY, 2009).

The positive sheep found in the present study was destined for consumption by the local population, which is worrying from a public health point of view, since muscles with viable cysts could be a source of infection among humans. In the present study, the parasite was not investigated in the organs of choice for the formation of cysts. There have already been numerous studies of the significance of human consumption of muscles and viscera contaminated with *T. Gondii*. However, no previous studies have investigated toxoplasmosis in humans in this region of Brazil, associated with the consumption of the meat and viscera of ruminants. The results of the present study could serve to stimulate other epidemiological studies in this area.

With regards to the implications for the health of the animals, particularly in terms of sheep reproduction, Duncanson et al. (2001) reported congenital transmission of *T. gondii* among sheep, with 94% of lambs positive and aborted in Australia. The authors also found the parasite in placental tissue of successful pregnancies. They suggested that congenital transmission occurred in a high percentage of the lambs that were born alive, and that the

transplacental transmission route could explain the persistence of the parasite in herds, without the need for new infections through oocysts excreted by cats.

In Brazil, abortion as a result of *T. gondii* has previously been reported in a number of regions. However, a study of the presence of this parasite in the reproductive organs of slaughtered sheep has not yet been conducted. The presence of *T. gondii* DNA in the placenta, heart and brain of the fetus of a sheep that was positive in the serology confirmed the vertical transmission of the parasite in naturally infected sheep in Brazil. The following data, related to spontaneous abortions caused by *T. gondii*, are recorded in the literature: 10.6% in Germany (Steuber et al., 1995); 11.1% and 18.1% in Italy (Masala et al., 2003 and 2007); 14.3% in Brazil (Moraes et al., 2011); 16.9% and 23.2% in Spain (Hurtado et al., 2001; Pereira-Bueno et al., 2004) and 17.5% in the USA (Dubey & Kirkbride, 1990).

The sheep that was positive in the serology was also positive in the PCR of the uterus, ovaries and tubes. These findings are significant in the epidemiology of ovine toxoplasmosis since they have not been seen before in cases of natural infection. However, it is too early to discuss with any certainty the meaning of the presence of this parasite in the reproductive organs of naturally infected sheep. In cases of congenital transmission, it is known that the parasite arrives in the placenta and fetus through the blood. However, Rodriguez et al. (2013) recently inoculated lambs with *T. gondii* and confirmed the infection of females through natural mating, finding the parasite in the sheep and their lambs using PCR. These results demonstrated the sexual transmission of *T. gondii* among sheep with a consequent vertical transmission to the offspring. Moraes et al. (2010a and 2010b) confirmed venereal transmission of the parasite during insemination with semen that had been experimentally infected with *T. gondii* and reported reproductive disorders including fetal death, abortion, hydrometra, mucometra, follicular cysts, anestrus and high rates of embryo resorption.

It was not possible in the present study to detect the phase of infection or the transmission route of the parasite. Despite the fact that the life cycle of *T. gondii* is well known, the presence of genomic DNA of the parasite in samples of the reproductive system of naturally infected sheep demonstrates that certain aspects of this infection require further investigation.

This is the first report of the occurrence of *T. gondii* DNA in samples of uterus, tubes and ovaries from naturally infected sheep that were slaughtered in Pernambuco, Brazil.

5. References

- Barberan, M. & Marco, J. C. Patogenia, cuadro clinico y lesional-Toxoplasmosis. Revista Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina, Madrid 52, 35–49, 1997.
- Blewett, D. A.; Teale, A. J.; Miller, J. K.; Scott, G. R.; Buxton, D. Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission. The Veterinary Record, London, v. 24, n.111, p.73-75, 1982.
- Buxton, D.; Rodger S. M.; Maley, S. W.; Wright S. E. Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. Small Ruminant Research, v.62, p.43–46, 2006.
- Camargo, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Revista Brasileira de Patologia Clínica, v.10, p.143-71, 1964.
- Dubey, J. P. & Schmitz, J. A. Abortion associated with Toxoplasmosis in sheep in Oregon. Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 178, n.7, p. 675-678, 1981.
- Dubey, J. P. A review of toxoplasmosis in cattle. Veterinary Parasitology, Amsterdam, 22: 177-202, 1986.
- Dubey, J. P.; Milles, S.; Powell, C. C.; Anderson, W. R. Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii* induced abortions. Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 188, p.155, 1986.
- Dubey, J. P. Lesions in transplacentally induced toxoplasmosis in goats. American Journal of Veterinary Research, v.49, n.6, p. 905-909, 1988.
- Dubey, J. P. Status of toxoplasmosis in sheep and goats en the United Station. Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, v. 196, p. 259-262, 1990.
- Dubey, J. P. & Kirkbride, C. A. Toxoplasmosis and other causes of abortions in sheep from the north central United States. Journal of the American Veterinary Medical Association. Jan 196 (2), 287–290, 1990.
- Dubey, J. P. Toxoplasmosis in sheep-The last 20 years. Veterinary Parasitology, v. 163, p 1-14, 2009.

- Duncanson, P.; Terry, R. S.; Smith, J. E.; Hide, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *International Journal for Parasitology*, V. 31, P. 1699–1703, 2001.
- Homan, W. L.; Vercammen, M.; De Braekeleer, J.; Verschueren, H. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal of Parasitology*, v.30, n.1, p.69-75, 2000.
- Hurtado, A.; Aduriz, G.; Moreno, B.; Barandika, J.; García-Pérez, A. L. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary Parasitology*, v. 102, p. 17-27, 2001.
- Masala, G.; Porcu, R.; Madau, L.; Tanda, A.; Ibba, B.; Satta, G.; Tola, S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 117, n. 1-2, p.15-21, 2003.
- Masala, G.; Porcu, R.; Daga, C.; Denti, S.; Canu, G.; Patta, C.; Tola, S. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Jan, 19 (1), p. 96-98, 2007.
- Moraes, E. P. B. X.; Batista, A. M.; Faria, E. B.; Freire, R. L.; Freitas, A. C.; Silva, M. A. R.; Braga, V. A.; Mota, R. A. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Veterinary Parasitology*, v.170, p.318–322, 2010a.
- Moraes, E. P. B. X.; Freitas, A. C.; Gomes-Filho, M. A.; Guerra, M. M. P.; Silva, M. A. R.; Pereira, M. F.; Braga, V. A.; Mota, R. A. Characterization of reproductive disorders in ewes given anintrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during the intrauterine insemination. *Animal Reproduction Science*, 122, 36–41, 2010b.
- Moraes, E. P. B. X.; Costa, M. M.; Dantas, A. F. M.; Silva, J. C. R.; Mota, R. A. *Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetuses and stillborns in the State of Pernambuco, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.183, p.152– 155, 2011.
- Pereira-Bueno, J.; Quintanilla-Gozalo, A.; Perez-Perez, V.; Alvarez-Garcia, G.; Collantes-Fernandez, E.; Ortega-Mora, L. M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, May 121 (1-2), 33–43, 2004.

- Rodrigues, J. D.; Souza, F. A.; Santos, T. R.; Santos, R. S.; Rosanese, W. M.; Lopes, W. R. Z.; Sakamoto, C. A.; Costa, A. J. Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, 2013, "In Press".
- Silva, A. V.; Cunha, E. L. P.; Meireles, L. R.; Gottschalk, S.; Mota, R. A.; Langoni, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões no Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência Rural*, v.33, n.1, p.115–119, 2003.
- Steuber, S.; Niu, A.; Bauer, C.; Reetz, J.; Roth, A.; Janitschke, K. Der Nachweis von *Toxoplasma gondii* in Abortgeweben vom Schaf mittels der Polymerase-Kettenreaktion. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 102, 91–93, 1995.
- Thamsborg, S. M.; Ilsoe, B.; Henriksen, S. A.; Lind, P. Toxoplasma-abort hos far. *Dansk Veterinaertidsskrift.* 77, 925–930, 1994.
- Underwood, W. J. & Rook, J. S. Toxoplasmosis infection in sheep. *The Compendium on Continued Education in Veterinary Practice*, New York, n. 8, v. 14, p. 1543-1549, 1992.
- Williams, R. H.; Morley, E. K.; Hughes, J. M.; Duncanson, P.; Terry, R. S.; Smith, J. E.; Hide, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitology*, Mar; 130 (3), 301–307, 2005.

CAPÍTULO 3**DETECTION OF *Toxoplasma gondii* DNA IN FRESH AND FROZEN SEMEN FROM
RAMS IN BRAZIL****(Artigo submetido à revista *Reproduction in Domestic Animals*)**

Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in fresh and frozen semen from rams in Brazil

Detection of *Toxoplasma gondii* in semen from rams in Brazil

MJG Bezerra¹, JALO Cruz², ES Kung², PPF Albuquerque², PCP Kim², EPBX Moraes³, JW Pinheiro Júnior³, RA Mota².

¹*Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste – SUDENE, Recife, PE, Brazil.*

²*Laboratory of Infectious Contagious Diseases in Domestic Animals, Recife/PE, Brazil.*

³*Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns/PE, Brazil.*

Abstract: The aim of the present study was to estimate the prevalence of genomic DNA of *T. gondii* in semen samples from commercial rams in artificial insemination centers in Brazil, as well as in fresh semen from rams in the Northeast of Brazil. In total, 108 semen samples were obtained from artificial insemination centers and genomic DNA of *T. gondii* was detected in 24/108 (22.2%). The prevalence of antibodies anti-*Toxoplasma gondii* among sheep on rural properties was 9.2% (10/109) and 100% of the semen samples of these animals were positive in the PCR for *T. gondii* DNA. The molecular identity was confirmed through sequencing, which indicated 99.9% similarity with the *T. gondii* DNA sequences stored in the GenBank. The present study reports the first occurrence of *T. gondii* DNA in the semen of rams which came from artificial insemination centers in Brazil, as well as the occurrence of *T. gondii* DNA in the fresh semen of naturally infected rams in the Northeast of Brazil.

Keywords: Polymerase Chain Reaction (PCR); semen; sheep; *Toxoplasma gondii*

Introduction

Toxoplasmosis is a parasitosis of cosmopolitan distribution which causes several reproductive disorders in a number of intermediary hosts (Luzon et al. 1997). The parasite responsible for this disease is *Toxoplasma gondii*, which is important in terms of public health (Tenter et al., 2000), and causes significant economic and reproductive losses in the productive chain of sheep (Dubey, 2009).

T. gondii transmission occurs horizontally and vertically. In the former, the animal is infected orally by ingesting sporulated oocysts or meat containing tissue cysts. Vertical transmission involves the females transmitting the parasite to the fetus. This type of transmission causes reproductive disorders that vary in intensity depending on the phase of the pregnancy, the development of the placenta, the parasite load and the virulence of *T. gondii* (Dubey, 1988; Luzon et al., 1997; Dubey, 1998). The infective form of *T. gondii* has been previously described in the semen of sheep (Spence et al., 1978; Teale et al., 1982; Moraes et al., 2010a).

Moraes et al. (2010a) studied natural *T. gondii* infection in fresh ram semen using the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) for screening and reported 9.2% as positive (6/65). In the PCR of these positive rams, 4/6 semen samples were positive. Another study confirmed *T. gondii* transmission in sheep through semen samples known to be contaminated with the parasite (Moraes et al., 2010b; Moraes et al., 2010c).

The aim of the present study was to estimate the prevalence of genomic DNA of *T. gondii* in semen samples from rams commercialized in artificial insemination centers in Brazil and in fresh semen samples collected from rams on farms in the Northeast of Brazil.

Materials and Methods

Origin of the animals and semen samples

In total, 108 semen samples were obtained from Santa Inês and Dorper rams, aged between 2 and 4 years old, from artificial insemination centers in different regions of Brazil between 2011 and 2012. The samples were stored in canisters of liquid nitrogen until the time of their processing.

Furthermore, 109 fresh semen samples were collected from rams of different breeds (Santa Inês and Dorper), aged between 2 and 4 years old on farms in the Northeast of Brazil. The semen was collected through natural mating with a sheep and the aid of an artificial vagina (CBRA, 1998). Once collected, these samples were immediately processed. Sampling of the fresh and frozen semen used was based on convenience.

Fifteen minutes after semen collection, blood samples were collected by venipuncture of the jugular vein with vacutainer tubes (BD – Becton, Dickinson Co., USA) and shipped (refrigerated) to the laboratory. Serum was recovered by centrifuging the blood at 3000 g for 15 min and stored at – 20 °C until processing.

Serology

The Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) was used to detect IgG antibodies to *T. gondii* in the rams on rural properties, as described by Camargo (1964): anti-sheep IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) conjugated to fluorescein isothiocyanate; a cut-off point of 64; using tachyzoites of the RH strain as an antigen. Positive and negative control sera were included in the reactions.

Molecular examination to detect *T. gondii* DNA

The DNA extraction of the fresh and frozen semen samples was performed using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, USA), following the manufacturer's instructions. The primers TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) and TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) were used for the Polymerase Chain Reaction, as described by Homan et al. (2000), amplifying a region of 529 base pairs (bp). The amplification reactions were conducted at a final volume of 12.5µL containing: 2.5µL of genomic DNA; 0.5µL of each primer (TOX4 and TOX5) at 10µM; 2.5µL of ultra-pure Milli-Q water and 6.25µL of Top Taq Master Mix (Quiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. The thermal profile of the stages of the reaction was conducted in an XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO. LTDA, Hangzhou, China). This process consisted of an initial DNA denaturation at 94°C (7min), followed by 35 cycles at 94°C for 1 minute for denaturation, 60°C for 1 minute for annealing, 72°C for 1 minute for extension and a final extension of 10 minutes at 72°C. The products amplified were detected by electrophoresis in agarose gel 2%, stained with Blue Green (LGC, Middlesex, UK), visualized in ultraviolet light and photodocumented. The positive control used in the reaction was obtained by suspending the intraperitoneal fluid of mice that were previously infected with the RH strain (permit number 007/2010 from the UFRPE Ethics Committee).

Amplicons were purified using commercial GFX™ PCR DNA and a Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Pittsburgh, USA). Using the sequencer ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster, USA), reactions were carried out in both strands using the primers (TOX4 and TOX5), according to the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster, USA). The polymerization conditions were performed in 96-well plates, following the manufacturer's instructions. The sequences were analyzed using

Bioedit and MEGA 5 software (Hall, 1999) and compared with the NCBI database using Blast (Tamura et al., 2011).

Results

The prevalence of antibodies anti-*Toxoplasma gondii* among sheep on rural properties was 9.2% (10/109) (C.I. 4.5 – 16.2%) and 100% of the semen samples of these animals were positive in the PCR for *T. gondii* DNA. Of the 108 ram semen samples acquired in artificial insemination samples, genomic DNA of *T. gondii* was detected in 24/108 (22.2%) (C.I. 14.8 – 31.2%). The molecular amplicon identities were confirmed through direct double-strand sequencing, which indicated 99.9% similarity with the *T. gondii* DNA sequences stored in GenBank (DQ779196.1).

Discussion

The IFAT results for breeders on rural properties are in accordance with the prevalence of antibodies reported in previous studies conducted in the same region of Brazil (Pinheiro Jr. et al., 2009; Moraes et al., 2010a). The fresh semen samples were collected from sheep that were positive in the serology and there was an agreement of 100.0% between the serology and the PCR of semen.

The results obtained in the present study, which include the detection of a high frequency of the DNA of the parasite in fresh semen of naturally infected rams, as well as in frozen semen from Brazilian artificial insemination centers, highlight the need for further studies to determine possible reproductive abnormalities related to natural infection. The first isolation of *T. gondii* from ram semen samples was carried out by Spence et al. (1978). Teale et al. (1982) inoculated six animals with *T. gondii* cysts subcutaneously and recorded the parasite in

the semen of three inoculated animals. Aganga et al. (1988) also recorded *T. gondii* in semen samples from all of the infected rams using the TS-1 strain.

Congenital transmission of *T. gondii* between sheep is considered a significant issue (Luzon et al. 1997; Duncanson et al. 2001; Morley et al. 2005; Williams et al. 2005). Horizontal transmission through semen in cases of natural infection has not yet been proven, although the parasite has been identified in the semen of rams. Moraes et al. (2010b, 2010c) demonstrated the transmission of *T. gondii* in cases of experimental infection with ram semen containing different doses of tachyzoites. The authors added high numbers of parasites to the semen samples and reported embryo resorption, fetal death and abortion. These reproductive aspects should be investigated in terms of natural infection when fresh and frozen semen, sold in artificial insemination centers, comes from animals infected with *T. gondii*.

Brazil is at risk in terms of importing semen and certain diseases that are considered endemic within the country are not officially controlled. As examples of the dangers of importing goat and sheep semen, the OIE (2006) cites contagious agalactia of goats and sheep (unknown risk), leptospirosis (probable risk), ovine brucellosis (unknown risk), and ovine enzootic abortion (unknown risk). However, toxoplasmosis is not mentioned among the risks.

In the present study, it was not possible to estimate the infection phase or when the animals started to excrete the parasite in fresh and frozen semen because the samples were obtained at a single moment in time. The presence of genomic DNA of *T. gondii* in the fresh semen samples, as well as the frozen semen samples sold at artificial insemination centers, does not determine the viability of the parasite, thereby demonstrating the need for new studies.

Further studies should be conducted to assess sperm abnormalities in the semen of naturally infected rams, in spite of the minimal abnormalities previously reported by Lopes et al. (2009) with experimentally infected rams.

The PCR was effective in detecting the DNA of *T. gondii* and can be used to monitor semen samples in artificial insemination centers.

Acknowledgements

The authors would like to thank FACEPE (Process no. APQ-1226-5.05/10) and CAPES (Process no. 23038.8556/2010-01) for their financial support.

References

- Aganga AO, Umoh JU, Kyewalabye EK, Ekwempu CC, 1988: Comparative experimental transmission studies with Nigerian isolates and TS-I strain of *Toxoplasma gondii* in sheep. *J A Prod Res* **8**, 104-120.
- Camargo ME, 1964: Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras Patol Clin* **10**, 143-171.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA, 1998: Manual para exame e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte.
- Dubey JP, 1998: Lesions in transplacentally induced toxoplasmosis in goats. *Am J Vet Res* **49**, 905-909.
- Dubey JP, 1998: Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **28**, 1019-1024.
- Dubey JP, 2009: Toxoplasmosis in sheep-The last 20 years. *Vet Parasitol* **163**, 1-14.
- Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G, 2001: High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int J Parasitol* **31**, 1699-1703.
- Hall TA, 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT1999. *Nucleic Acids Symp* **41**, 95–98.

Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H, 2000: Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* **30**, 69-75.

Lopes WDZ, Costa AJ, Souza FA, Rodrigues JDF, Costa GHN, Soares VE, Silva GS, 2009: Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Anim Reprod Sci* **111**, 312-319.

Luzon M, Alonso A, Quintanilla Gozalo, A, 1997: Etiología y biología - Toxoplasmosis. *Rev Ovis* **52**, 11-17.

Moraes EPBX, Faria EB, Batista AM, Freitas AC, Silva JCR, Albuquerque PPF, Mota RA, 2010a: *Toxoplasma gondii* detection in the semen of naturally infected sheep. *Pesq Vet Brasil* **30**, 915-917.

Moraes EPBX, Batista AM, Faria EB, Freire RL, Freitas AC, Silva MAR, Braga VA, Mota RA, 2010b: Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Vet Parasitol* **170**, 318–322.

Moraes EPBX., Freitas AC, Gomes-Filho MA, Guerra MMP, Silva MAR, Pereira M. F, Braga VA, Mota RA, 2010c: Characterization of reproductive disorders in ewes given an intrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during the intrauterine insemination. *Anim Reprod Sci* **122**, 36–41.

Morley EK, Williams RH, Hughes JM, Terry RS, Duncanson P, Hide G, 2005: Significant familial differences in the frequency of abortion and *Toxoplasma gondii* infection within a flock of Charollais sheep. *Parasitol* **131**, 181-185.

OIE - Office International des Epizooties, 2006: Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis). *Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines*. 4a. ed.

Pinheiro Jr JW, Mota RA, Oliveira AA, Faria EB, Gondim LF, da Silva, AV, Anderline GA, 2009: Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. *Parasitol Res* **105**, 709-715.

Spence JB, Beattie CP, Faulkner J, Henry L, Watson WA, 1978: *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. *Vet Rec* **14**, 38-39.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.

Teale AJ, Blewett DA, Miller JK, Buxton D, 1982: Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of *Toxoplasma*. *Vet Rec* **17**, 53-55.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM, 2000: *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* **30**, 1217-1258.

Williams RH, Morley EK, Hughes JM, Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G, 2005: High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitol* **130**, 1-7.

CAPÍTULO 4**DETECTION OF *Toxoplasma gondii* IN THE MILK OF NATURALLY INFECTED
GOATS IN THE NORTHEAST OF BRAZIL****(Artigo aceito na revista *Transboundary and Emerging Diseases*)**

**Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the
Northeast of Brazil**

Mauro José Gonçalves Bezerra¹, Pomy de Cássia Peixoto Kim², Érica Paes Barreto Xavier de Moraes², Silvio Gomes de Sá², Pedro Paulo Feitosa de Albuquerque², José Givanildo da Silva², Bruno Henrique Leal e Silva Alves², Rinaldo Aparecido Mota².

¹Médico Veterinário da Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste – SUDENE;

²Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brazil.

Corresponding author. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Zip Code: 52171-900, Recife, Brasil. Tel.: +55 81 3320-6425; fax: +55 81 3320-6402

E-mail address: oruam@lycos.com (M J G Bezerra) or rinaldo.mota@hotmail.com (R A Mota)

Abstract

The aim of the present study was to detect the genomic DNA of *Toxoplasma gondii* in milk samples from naturally infected goats in the state of Pernambuco, (Brazil). In total, 248 blood serum samples were collected and processed from lactating goats and then submitted to a search for antibodies to *T. gondii* through the indirect immunofluorescence reaction. Samples with a score of 64 or more were considered positive. In total, 248 milk samples were collected and processed from the same group of goats in order to study the DNA of *T. gondii* using the polymerase chain reaction (PCR) technique. In the serum samples, 56/248 (22.58%) of the animals were positive, whereas the DNA of the parasite was detected in 15/248 (6.05%) of the milk samples. Five of these 15 samples were animals who were also positive in the serology. This study reports the first occurrence of the elimination of *T. gondii* from the milk of naturally infected goats in the northeast of Brazil. It is suggested that the consumption of *in natura* goat milk may constitute a potential risk to the health of milk consumers in this region.

Keywords: Toxoplasmosis; goat milk; Polymerase Chain Reaction (PCR)

Introduction

Toxoplasma gondii is a cosmopolitan protozoan which infects all homeothermic species, including man. Toxoplasmosis causes great economic losses, particularly in animal production chains, and is extremely important to public health (Luzon et al. 1997; Underwood and Rook 1992; Tenter et al. 2000; Kompalic-Cristo et al. 2005).

T. gondii exhibits three primary transmission paths: carnivorousness; the fecal-oral route and the congenital path. Both definitive and temporary hosts may acquire the infection by ingesting oocytes or cysts that contain bradyzoites, through the transplacental route, or by ingesting tachyzoites in non-pasteurized milk products (Dubey et al. 1998; Veronesi et al. 2005).

Tachyzoites have already been identified and isolated in milk secreted from goats. These studies have shown that in certain regions of the world, milk is a significant source of *T. gondii* infection in humans (Chiari and Neves 1984; Dubey et al. 1998; Vitor et al. 1991; Skinner et al. 1990; Powell et al. 2001; Veronesi et al. 2005; Costa and Langoni 2010).

Experimental studies have shown that the milk of infected animals contains tachyzoites, which favor the transmission to offspring (Sanger and Cole 1955; Saari and Raisanen 1974; Sogandares-Bernal et al. 1975; Powell et al. 2001).

The literature reports the presence of tachyzoites in the milk of numerous species and cases of the disease being transmitted to humans through non-pasteurized goat milk have been recorded (Chiari et al. 1987; Skinner et al. 1990). However, in the Northeast of Brazil, which contains the greatest quantity of goats in the country (IBGE, 2010), this type of study has not yet been carried out.

The aim of the present study was to detect genomic DNA of *T. gondii* in samples of raw milk from goats reared in the northeast of Brazil, thereby contributing to epidemiological investigations of the species, given that this information is scarce in the literature.

Materials and Methods

Origen of the animals and samples

In total, 248 biological samples of blood and milk sera were taken from goats of different races that were aged between one and three years old. The samples were collected in 2010 and 2011 from subsistence properties in the state of Pernambuco. The properties were chosen based on convenience, depending on the ease of access. After the animals were contained, blood and milk samples were taken. The blood was kept in sterile labeled glass

tubes at room temperature and was later submitted to centrifugation to completely retract the clot and extract the blood. Milk was collected manually from both teats after they had been cleaned and disinfected with Iodine solution (0.5%). During milk collection, the first few squirts were ignored. The milk was kept in sterile glass tubes in a final volume of approximately 10 ml. These samples were frozen until the implementation of molecular tests.

The samples were processed in the *Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos* of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco*.

Serology

The indirect immunofluorescence reaction (IIR) was employed to detect IgG antibodies to *T. Gondii*, according to the protocol recommended by Camargo (1964), using anti-goat IgG antibodies (Sigma®) conjugated to fluorescein isothiocyanate, with a cut-off point of 64, and RH tachyzoites as antigen.

Molecular examination to detect the DNA of *T. gondii*

The milk samples were submitted to DNA extraction using the Wizard Genomic DNA Purification (Promega®) kit, following the manufacturer's protocol. Initially, a cryotube of 1.5ml was prepared, adding 300QL of the milk sample and 900 QL of the Cell Lysis solution. The samples underwent enzymatic pre-digestion with 20 QL of Proteinase K (20mg/ml) overnight at 56°C, following all stages of the manufacturer's protocol. The initial pairs used were TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) and TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) as described by Homan et al. (2000), amplifying a region of 529 base pairs (bp). The amplification reactions were carried out with a final volume of 12.5 µL containing: 2.5 QL of genomic DNA (mean concentration of 7 ng / QL); 0.5 QL of each primer (TOX4 and TOX5) to 10 QM; 2.5QL of ultrapure Milli-Q water and 6.25 QL of Top Taq Master Mix (Quiagen®), following the recommended protocol. The thermal profile of the reaction phases was conducted in an XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO. LTDA), consisting of an initial DNA denaturation at 94°C (7 minutes), followed by 35 cycles at 94°C for one minute (denaturation), at 60°C for one minute (annealing), 72°C for one minute (extension) and a final extension of 10 minutes at 72°C. The amplified products were detected by agarose gel electrophoresis (2%), stained with Blue Green (LGC®), visualized with ultraviolet light and photodocumented. The positive control used in the reaction was obtained by the intraperitoneal suspension of mice previously affected with the RH strain. Amplicons were purified by employing commercial GFX™

PCR DNA and a Gel Band Purification kit (GE Healthcare). Using the sequencer ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems), reactions were carried out in both strands, using primers (TOX4 and TOX5), according to the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), and polymerization was performed with 96-well plates, according to the manufacturer's instructions. Sequences were analyzed through Bioedit and MEGA 5 software and compared with the NCBI database using Blast.

Results

In the serum samples, 56/248 (22.58%) of the animals were positive. The DNA of the parasite was detected in 15/248 (6.05%) of the milk samples. Five of these 15 positive milk samples were animals who also recorded positive samples in the serology. The molecular amplicon identities were confirmed through direct double-strand sequencing, which indicated 99.9% similarity with the *T. gondii* DNA sequences stored in GenBank (DQ779196.1).

Discussion

The infection phase of the animals was not assessed in the present study. However, the serology of certain positive animals revealed elevated titers of antibodies. The PCR results in the serology of positive animals are similar to the findings of Camossi et al. (2011) who stated that compromised immunity in sheep during the peripartum period may favor the reactivation of cystic forms of *T. gondii*, thus eliminating the tachyzoite in milk. In this case, the results obtained in the serology do not coincide with the PCR results because not all positive animals eliminate the parasite in their milk. This elimination depends on the infection phase the animal is in, as well as their immunity.

The positive PCR results found in 10 milk samples from seronegative goats may be explained as follows: according to Dubey and Frenkel (1998), no serologic test is definitive in the diagnosis of toxoplasmosis. Seroconversion of this parasite is complex and many factors may be involved. The animals which were positive in the PCR for milk and negative in the serology could be in the initial phase of the infection, in which the quantity of antibodies is not yet sufficient to be detected in the serology. These biological characteristics could explain the prevalence of animals that were positive in the PCR and negative in the serology.

The presence of *T. gondii* DNA in goat milk does not confirm the viability of the parasite. However, it does raise the possibility that transmission occurs through the consumption on *in natura* milk and its sub-products, particularly in the region studied. There is still a scarcity of studies investigating this aspect in the literature. Reimann et al. (1975)

attributed the *T. gondii* infection in humans to the ingestion of milk containing tachyzoites of the parasite.

Other outbreaks of human toxoplasmosis, involving the ingestion of *in natura* goat milk, have also been reported by Sacks et al. (1982), who recorded an outbreak in 10 members of a family composed of 24 individuals. The positive family members exhibited IgM antibodies and one individual exhibited symptoms compatible with retinochoroiditis. The authors stated that the consumption of this milk was the only risk factor associated with the seroconversion. Chiari and Neves (1984) conducted similar investigations and reported three acute toxoplasmosis cases in members of a single family who had consumed milk from goats with toxoplasmosis.

Skinner et al. (1990) studied a child with signs of acute toxoplasmosis and confirmed that the child regularly consumed milk from goats with toxoplasmosis. The authors isolated the parasite in the milk sample using a bioassay. Also related to this aspect, Paul (1998) identified risk factors associated with primary infection in fertile women and concluded that milk consumption is a potential risk factor for the transmission of toxoplasmosis to humans. Tenter et al. (2000) also reported *T. gondii* seroconversion in children whose diet included goat milk.

With regards to the consumption of *in natura* goat milk, there are still controversial references in the literature associating goat milk consumption with toxoplasmosis in humans, as well as divergent issues about the role of tachyzoites in horizontal transmission. However, in a study of lactating cats, Powell et al. (2001) reported the elimination of the parasite in milk and stated that it was infectious to inoculated mice. More recently, Costa and Langoni (2010) confirmed the presence of tachyzoites in the milk secreted from experimentally infected rats, as well as the seroconversion of offspring after breast-feeding. The infection of kids through ingesting milk from goats that have been naturally infected should be investigated further.

The northeast of Brazil is the region that produces most goats in the country (IBGE, 2010). Ingestion of *in natura* goat milk remains a common practice in this region, particularly among poor children and those that are allergic to cows milk (personal communication). Pasteurized goat milk is also used in school lunches, with no risk of *T. Gondii* transmission. Considering these factors, and the possibility of this group of individuals exhibiting other immunosuppressive diseases, goat milk may represent a source of infection that should be investigated further. Cordeiro (2006) also stated that almost all of the goat milk produced in developing countries is for subsistence consumption, particularly by families in under-developed areas, and it is usually consumed close to the production site.

This is the first such study in the northeast of Brazil. The present study is important when analyzed from a public health point of view, considering the data referring to expansion, the characteristics of the production system in this region, and the socioeconomic prospects of the goat supply chain in Brazil. It is undeniable that toxoplasmosis plays an important role in public health worldwide, particularly in rural areas which do not use milk pasteurization methods. Further studies are necessary to investigate the possible transmission of toxoplasmosis through milk consumption (Cook et al. 2000; Tenter 2009; Camossi et al. 2011). The sampling type of the present study does not represent the entire goat population in this region. Therefore, further observational studies with goats in the Northeast of Brazil are recommended.

Considering the results found in the present study, health authorities must provide guidance to milk consumers in relation to boiling or pasteurization, which eliminate the risk of transmission of this parasite. These results should stimulate the performance of other studies to confirm the quantity and viability of parasites eliminated in milk. Studies of natural infections are important, particularly on farms where families tend to consume *in natura* goat milk.

References

- Amendoeira M.R. and S.G. Coutinho, 1982: Isolation of *Toxoplasma gondii* from the saliva and tonsils of a three-year-old child. *J. Infect. Dis.* 145-587.
- Blewett D.A., A.J. Teale, J.K. Miller, G.R. Scott and D. Buxton, 1982: Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission. *Vet. Rec.* 24, 73-75.
- Camargo M.E. 1964: Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev. Bras. Patol. Clin.* 10, 143-171.
- Camossi L.G., H. Greca-Junior, A.P.F.L. Côrrea, V.B. Richini-Pereira, R.C. Silva, A.V. Da Silva and H. Langoni, 2011: Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. *Vet. Parasitol.* 177, 256-261.
- Chiari C.A. and D.P. Neves, 1984: Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 79, 337-340.
- Chiari C.A., W.S. Lima, C.M.F. Antunes and J.D. Lima, 1987: Soroepidemiologia da toxoplasmose caprina em Minas Gerais. Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 39, 587– 609.
- Cook A.J.C., R.E. Gilbert, W. Buffolano, J. Zufferey, E. Peterse, P.A. Jenum, W. Foulon, A.E. Semprini and D.T. Dunn 2000: Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ* 321, 142–147.

- Cordeiro P.R.C. 2006: Mercado de leite de cabras e seus derivados. Rev. Cons. Fed. Med. Vet. 1-8.
- Costa V.M. and H. Langoni 2010: Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected Wistar female rats. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 16, 368-374.
- Dubey J.P. and C.P. Beattie 1988: Toxoplasmosis of animals and man, CRC Press, Boca Raton.
- Dubey J.P. and J.K. Frenkel 1998: Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. Vet. Parasitol. 77, 1-32.
- Dubey J.P., S.D. Lindsay and C.A. Speer 1998: Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissues cysts. Clin. Microbiol. Rev. 11, 267-299.
- Dubey J.P., and S.P. Sharma 1980: Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. Am. J. Vet. Res. 41, 794-795.
- Dubey J.P., S.P. Sharma, C.W.G. Lopes, J.F. Williams, C.S.F. Williaors and S.E. Weisbrode 1980: Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical, signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Am. J. Vet. Res. 41, 1072-1076.
- Hiramoto R.M., M. Mayrbaur-Borges, A.J. Galisteo, L.R. Meireles, M.S. Macre and H.F. Andrade Junior 2001: Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. Rev. Saude Publica 35, 113-118.
- Homan W.L., M. Vercammen, J. De Braekeleer and H. Verschueren 2000: Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Internat. J. Parasitol. 30, 69-75.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal, v. 38, 2010.
- Jacobs L., M.L. Melton and M.K. Cook 1966: Observations on toxoplasmosis in dogs. J. Parasitol. 41, 353-361.
- Kompalic-Cristo A., C. Britto and O. Fernandes 2005: Diagnóstico molecular da Toxoplasmose: revisão. J. Brasil. Patol. Med. Lab. 41, 229-235.
- Luzon M., A. Alonso and A. Quintanilla Gozalo 1997: Etiologia y biología - Toxoplasmosis. Rev. Ovis – Trat. Patol. Prod. Ovin. 52, 11-17.
- Martinez-Garcia F., J. Regadera, R. Mayer, S. Sanchez and N. Nistal 1996: Protozoan infections in the male genital tract. J. Urol. 156, 340-349.

- Paul M. 1998: Potential risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cases with recently acquired toxoplasmosis. *Przegl. Epidemiol.* 52, 447-454.
- Powell C.C., M. Brewer and M.R. Lappin 2001: Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. *Vet. Parasitol.* 102, 29-33.
- Riemann H.P., M.E. Meyer, J.H. Theis, G. Kelso and D.E. Behymer 1975: Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. *J. Pediatr.* 87, 573-576.
- Rocha R.J., W.I. Tafuri and C.A. Chiari 1993: Eliminação de *Toxoplasma gondii* pela urina de camundongos durante a fase aguda da infecção experimental. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 35, 307-313.
- Saari M. and N. Raisane 1974: Transmission of acute toxoplasma infection. The survival of trophozoites in human tears, saliva, and urine and in cow's. *Acta Ophthalmol Scand.* 52, 847-852.
- Sacks J.J., R.R. Roberto and N.F. Brooks 1982: Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *J. Am. Med. Assoc.* 248, 1728-1732.
- Sanger V.L. and C.R. Cole 1955: Toxoplasmosis: VI. Isolation of *Toxoplasma* from milk, placentas and newborn pigs of asymptomatic carrier sows. *Am. J. Vet. Res.* 16, 536-539.
- Skinner L.J., A.C. Timperley, D. Wightman, J.L. Chatterton and D.O. Ho-Yen 1990: Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goat owner's family. *Scand. J. Infect. Dis.* 22, 359-361.
- Sogandares-Bernal F., A.A. Marchiando and D.W. Duszynki 1975: Prevalence of *Toxoplasma* antibodies in range dairy cattle from the Bitter-Root Valley of Montan. *J. Parasitol.* 965-966.
- Spence J.B., C.P. Beattie, J. Faulkner, L. Henry and W.A. Watson 1978: *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. *Vet. Rec.* 14, 38-39.
- Teale A.J., D.A. Blewett, J.K. Miller and D. Buxton 1982: Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of *Toxoplasma*. *Vet. Rec.* 17, 53-55.
- Tenter A.M., A.R. Heckeroth and L.M. Weiss 2000: *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217-1258.
- Tenter A.M. 2009: *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 364-369.
- Terragna A., A.C. Quaglia, N. Morandi, A. Canessa, C. Pellegrino, F. Borasi and A. Barbieri 1981: Isolation of "*Toxoplasma gondii*" from saliva of rabbits. *Ann. Sclavo.* 23, 477-485.
- Underwood W.J. and J.S. Rook 1992: Toxoplasmosis infection in sheep. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 14, 1543-1549.

Veronesi R. 2005: Tratado de Infectologia. 3^a ed. Editor Científico Roberto Focaccia. São Paulo: Editora Atheneu.

Vitor R.W.A., J.L. Pinto, and C.A. Chiari 1991: Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 42, 147-154.

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, o *Toxoplasma gondii* se mostrou um parasito importante para os criadores de ovinos na região estudada, pois se verificou uma frequência considerável de animais de matadouro positivos na sorologia e, a presença do DNA parasitário de *T. gondii* é um importante achado, pois pode comprometer a saúde dos consumidores de carne e vísceras. Além disto, a presença do DNA parasitário em órgãos do sistema reprodutivo de machos deve ser melhor investigada, pois pode representar outra via de transmissão do parasito. Os resultados obtidos neste estudo quanto à eliminação do DNA de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite, sêmen fresco e congelado acrescentaram informações epidemiológicas importantes sobre o possível envolvimento deste parasito em surtos da Toxoplasmose em humanos e na transmissão venérea. Outros estudos que avancem no que se refere ao aspecto reprodutivo e ao estudo da viabilidade deste protozoário nestes fluídos devem ser encorajados para acrescentar informações ao que já se conhece sobre a epidemiologia desta importante doença.