

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS ESTÁGIOS AGUDO E CRÔNICO  
NA INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA PELO MÉTODO DE  
AGLUTINAÇÃO DIRETA MODIFICADO E PESQUISA DO AGENTE  
NO LEITE DE OVELHAS NATURALMENTE INFECTADAS POR  
*TOXOPLASMA GONDII*

LUCILENE GRANUZZIO CAMOSSI

Botucatu-SP

Fevereiro/2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS ESTÁGIOS AGUDO E CRÔNICO  
NA INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA PELO MÉTODO DE  
AGLUTINAÇÃO DIRETA MODIFICADO E PESQUISA DO AGENTE  
NO LEITE DE OVELHAS NATURALMENTE INFECTADAS POR  
*TOXOPLASMA GONDII*

LUCILENE GRANUZZIO CAMOSSI

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária para obtenção do  
título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Camossi, Lucilene Granuzzio.

Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pelo método de aglutinação direta modificado e pesquisa do agente no leite de ovelhas naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii* / Lucilene Granuzzio Camossi. – Botucatu : [111 p.], 2010

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010

Orientador: Helio Langoni

Assunto CAPES: 50502034

1. Ovino - Doenças 2. Toxoplasmose

CDD 636.30896

Palavras-chave: Infecção natural; Ovelhas; PCR; Sorologia; *Toxoplasma gondii*

Lucilene Granuzzio Camossi. Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pelo método de aglutinação direta modificado e pesquisa do agente no leite de ovelhas naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii*. Defesa: 18/02/2009. Local: FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu/SP.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **Prof. Titular Helio Langoni**

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

### **Profa. Assistente Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani**

Membro Titular

Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal

Faculdade de Odontologia - UNESP - Araçatuba/SP

### **Profa. Assistente Simone Baldini Lucheis**

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

---

### **Prof. Associado Dr. Itamar Teodorico Navarro**

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Centro de Ciências Agrárias UEL - Londrina/PR

### **Prof. Assistente Dra. Roberta Lemos Freire**

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Centro de Ciências Agrárias UEL - Londrina/PR

## *AGRADECIMENTOS*

### *A Deus*

*A Deus, pela presença constante em minha vida, fé renovada a cada provação que se apresenta e nos sonhos que se concretizam.*

### *Aos Animais*

*Aos animais, as ovelhas, e em especial os camundongos, que tiveram suas vidas concedidas involuntariamente em função deste estudo, minha gratidão e respeito.*

### *À Família*

*A minha mãe, meu refúgio de paz, agradeço por estar sempre ao meu lado e pela paciência em tolerar minha ausência....e ao meu pai (in memoriam) por ser minha fonte de inspiração no trabalho e pelo esforço para que eu realizasse meus sonhos. A minha irmã Lucimara, por ser minha força nos momentos de incerteza, pelo apoio e pelo quanto fez por mim.*

*A minha irmã Fernanda e meu cunhado Cássio, pelas horas alegres e pelos momentos de descontração e por sempre trazerem felicidade.*

*Ao Daniel, meu namorado, que me acompanha, ajuda e incentiva desde a graduação. Obrigada pela paciência, pelo amor, por ser tão especial e sempre estar ao meu lado.*

### *Aos professores*

*Ao meu orientador, Helio Langoni, agradeço pela oportunidade em tê-lo como meu orientador, pelo conhecimento passado, pela excelente supervisão e orientação, abdicando-se de seus finais de semana, feriados e férias, para correções de textos, meu muito obrigada.*

*As professoras Maria Cecília Rui Luvizotto e Elisa Giglio Ponsano, que me apresentaram o mundo da ciência. Obrigada por fazerem parte da minha formação.*

*A professora Simone Baldini Lucheis pelas sugestões e correções do exame de qualificação, por aceitar gentilmente participar de minha banca de mestrado.*

*A professora Kátia Denise Saraiva Bresciani, amável professora da minha graduação, meu agradecimento por aceitar participar desta banca de mestrado e por ser sempre tão atenciosa com meus e-mails.*

*Ao professor Aristeu Vieira da Silva pela imprescindível análise estatística.*

*Ao prof. Paulo Francisco Domingues pelas sugestões e correções do exame de qualificação, pela disponibilidade irrestrita sempre que procurado.*

*Aos professores Italmir Teodorico Navarro e Roberta Lemos Freire, por aceitarem participar como membros desta banca e por me atenderem tão carinhosamente pelos e-mails e telefonemas.*

### *A Fazenda Edgárdia*

*Aos funcionários Nico e Edvaldo por todo o suporte, pelo sorriso no rosto ao resolver todos os problemas de hemonose, ectima, actinobacilose do rebanho. Agradeço pela amizade construída e pelos momentos alegres.*

*A zootecnista Dra. Simone Fernandes por abrir carinhosamente as portas da fazenda Edgárdia e tornar possível o trabalho de campo.*

*Aos amigos (em ordem alfabética)*

*Ana P.F.L. Corrêa: amiga fiel e companheira de todas as horas, dividindo os bons e maus momentos dessa caminhada. À você, minha querida amiga, o meu muito obrigada pela ajuda na execução deste trabalho, pela amizade verdadeira e o desejo de que fique para sempre na minha vida.*

*Benedito D. Menozzi: amigo querido, prestativo e solícito, estando sempre disposto em ajudar.*

*Deolinda V.F. Carneiro: pessoa querida e de um carisma contagiante. Muito obrigada por sua amizade.*

*Diego B. Nóbrega: agradeço pela amizade e pelos momentos de descontração do dia a dia.*

*Felipe F. Guimarães: é aquele amigo que torna qualquer ambiente mais agradável, inclusive a sala dos pós-graduandos. É muito especial e querido, agradeço pela amizade verdadeira e pelas gargalhadas.*

*Haroldo Greca Jr: o destino me apresentou esse querido amigo ainda no estágio, mas a impressão era como se já fôssemos amigos a vida inteira. Meu inseparável amigo de residência e mestrado agradeço pela ajuda no projeto, pela rara amizade e por ter tornado essa caminhada mais feliz.*

*Leila S. Ullmann: amiga querida de uma alegria e energia contagiante, sempre prestes a colaborar e ajudar. Agradeço pela amizade fraternal e verdadeira, por ser muito especial pra mim.*

*Luciana B. Peruca: agradeço pela companhia, pela alegria, pelas piadas e amizade.*

*Marcela Z. Troncarelli: agradeço a amizade, a agradável companhia, a disposição em ajudar e por sempre ter um palavra amiga.*

*Patricia Y. Facciolli: amável amiga, minha ex- $\mathbb{R}^2$ , agradeço pelos ensinamentos, pela amizade e pela companhia na hidroginástica.*

*Priscila Barbante: pelo carinho e amizade, por ser tão especial.*

*Residentes da zoonoses: Felipe Fornazari, Rozeani O. Tomé, Fernanda C. Gaio e Diego Generoso pela amizade e pelas conversas agradáveis.*

*Rodrigo C. Silva: pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho, pelas dicas e amizade.*

*Virgínia Richini-Pereira: amiga querida agradeço pela ajuda preciosa na PCR e nas correções de textos, pela serenidade que você transmite, quando estou com você, estou em paz.*

*Aos amigos do departamento de Higiene Veterinária: Selene Babboni, Hení Falcão, Camila Appolinário, Marta Fernandes, João Marcelo, Simone Mangia, Susan Allendorf, Joseane Cipriano, Ricardo Yamatogi, Thiago Izidoro.*

*Por fim, aos meus antigos amigos, Kellem Libardi Cypriano, Evandro Cypriano e Alessandra Voigt, que permaneceram comigo mesmo com a distância provocada pela graduação e pós-graduação. O contato é pouco, mas o carinho é imenso.*

#### *À Fapesp*

*Pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio pesquisa, indispensáveis para execução deste trabalho e pelas sugestões da assessoria científica.*

#### *À pós-graduação da FMVZ*

*Aos funcionários José Roberto Lalla Júnior, Patrícia e Maria pela atenção e disposição em tirar nossas dúvidas e resolver nossos problemas.*

*“Não fiquem maravilhados diante do novo, nem assustados pelo que ontem vos era desconhecido.*

*Não recuem diante do mistério, mas procurem enfrentá-lo e desvendá-lo...*

*Não se considerem os únicos donos da verdade e do conhecimento, pois um diploma não faz o cientista.*

*Somente assim poderão cumprir sua missão, ser úteis ao próximo...*

*E façam tudo com amor, pois será um dia esplêndido aquele em que dos progressos da ciência, participará também o coração.”*

*(Pasteur)*

## LISTA DE TABELAS

Página

<b>Tabela 1.</b> Ocorrência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos, em estados das cinco regiões brasileiras, por meio de três técnicas sorológicas, nos últimos dez anos.....	08
<b>Tabela 2.</b> Ocorrência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em humanos, em estados das cinco regiões brasileiras, nos últimos dez anos.....	12
<b>Tabela 3.</b> Identificação das ovelhas, pertencentes ao grupo 1 (sorologia positiva), com distribuição inicial dos títulos de seus anticorpos e grupo 2 (sorologia negativa), pela técnica de aglutinação direta modificada com antígeno fixado pela formalina.....	40
<b>Tabela 4.</b> Datas das coletas de sangue e leite das ovelhas, com seus respectivos títulos sorológicos pelo método de aglutinação direta modificado com antígeno fixado pela formalina, e encontro do DNA do <i>T. gondii</i> no leite.....	42
<b>Tabela 5.</b> Datas das coletas de sangue e leite das ovelhas, com seus respectivos títulos sorológicos pela reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG, e encontro do DNA do <i>T. gondii</i> no leite.....	43
<b>Tabela 6.</b> Datas das coletas de sangue e leite das ovelhas, com seus respectivos títulos sorológicos pelo método de aglutinação direta modificado com antígeno fixado pelo metanol e encontro do DNA do <i>T. gondii</i> no leite.....	44

**Tabela 7.** Datas das coletas de sangue e leite das ovelhas, com seus respectivos títulos sorológicos pela reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgM, e encontro do DNA do *T. gondii* no leite.....45

**Tabela 8.** Média  $\pm$  desvio-padrão das áreas sobre a curva (AUC) para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de ovelhas pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pela formalina (MAD-AF) ou etanol (MAD-AM), e reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG) e IgM (RIFI-IgM).....46

**Tabela 9.** Número de pares, teste t, coeficiente de correlação (r) e valor de P, pelo teste de Spearman, para as comparações entre os títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* detectados pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pela formalina (MAD-AF) X reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG), e pelo métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pelo metanol (MAD-AM) X IgM (RIFI-IgM).....47

**Tabela 10.** Frequência absoluta (n) e relativa (%) de negativos e positivos à reação em cadeia pela polimerase para a detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite de ovelhas, segundo os títulos de anticorpos ao método de aglutinação direta com antígeno fixado pela formalina.....53

**Tabela 11.** Frequência absoluta (n) e relativa (%) de negativos e positivos à reação em cadeia pela polimerase para a detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite de ovelhas, segundo os títulos de anticorpos a reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG.....53

**Tabela 12.** Frequência absoluta (n) e relativa (%) de negativos e positivos à reação em cadeia pela polimerase para a detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite de ovelhas, segundo os títulos de anticorpos ao método de aglutinação direta com antígeno fixado pelo metanol.....54

**Tabela 13.** Frequência absoluta (n) e relativa (%) de negativos e positivos à reação em cadeia pela polimerase para a detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite de ovelhas, segundo os títulos de anticorpos a reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgM.....54

**Tabela 14.** Análises das sequências dos amplicons obtidos nas reações de PCR das amostras de leite das ovelhas positivas e a comparação com as sequências depositadas no GenBank.....60

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figuras 1 e 2.</b> Rebanho de ovelhas Bergamácia da Fazenda Experimental Edgárdia – UNESP – campus Botucatu.....	24
<b>Figura 3.</b> Técnica de aglutinação direta modificada (MAT). Reação positiva (A) e negativa (B).....	30
<b>Figura 4.</b> Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI). Reação positiva (A) e negativa (B).....	32
<b>Figura 5.</b> Cinética de anticorpos séricos (média) anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em ovelhas, verificados pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pela formalina (MAD-AF) ou metanol (MAD-AM), e reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG) e IgM (RIFI Ig).....	47
<b>Figura 6.</b> Frequência de títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> detectados pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pela formalina (MAD-AF) X reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG).....	48

**Figura 7.** Frequência de títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* detectados pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pelo metanol (MAD-AM) X reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgM (RIFI-IgM).....49

**Figura 8.** Quadro adaptado de Montoya et al, para estabelecimento do estágio da infecção por *T.gondii*.....50

**Figura 9.** Visualização de banda de 529 pb, em gel de agarose 2,0%, mostrando os fragmentos de amplificação das diluições de *T. gondii* em água ultra-pura e no leite de ovelhas. (A) Amostras de água ultra-pura contaminadas com taquizoítos (B) amostras de leite contaminadas com taquizoítos. 1) Padrão de peso molecular 100 bp DNA-Ladder Invitrogen®; A2)  $1,0 \times 10^4$  taquizoítos/ml A3)  $1,0 \times 10^3$  taquizoítos/ml A4)  $1,0 \times 10^2$  taquizoítos/ml A5)  $1,0 \times 10^1$  taquizoítos/ml A6)  $1,0 \times 10^0$  taquizoítos/ml. B2)  $1,0 \times 10^3$  taquizoítos/ml B3)  $1,0 \times 10^2$  taquizoítos/ml B4)  $1,0 \times 10^1$  taquizoítos/ml B5)  $1,0 \times 10^0$  taquizoítos/ml.....51

**Figura 10.** Visualização de banda de 529 pb, em gel de agarose 2,0%, mostrando os fragmentos de amplificação de *T. gondii* no leite de ovelhas. 1) Padrão de peso molecular 100 bp DNA-Ladder Invitrogen; 2) ovelha 361 3) ovelha 530; 4) ovelha 361; 5) ovelha 480; 6) ovelha 530; 7) ovelha 510, 8) ovelha 520; 9) Controle negativo; 10) Controle positivo.....52

- Figura 11.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, das ovelhas de número 452, 510, 520 e 530.....55
- Figura 12.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, das ovelhas de número 219, 361, 480 e 482.....56
- Figura 13.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, da ovelha de número 393.....56
- Figura 14.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, da ovelha de número 401.....57
- Figura 15.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, da ovelha de número 404.....57
- Figura 16.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, da ovelha de número 371.....58
- Figura 17.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, da ovelha de número 185.....58
- Figura 18.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, das ovelhas de número 372, 381, 440, 450, 476,503,511.....59

## LISTA DE QUADROS

Página

<b>Quadro 1.</b> Etapas da amplificação das regiões codificadoras dos oligonucleotídeos utilizados na detecção (TOX4 e TOX5) de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	35
--	----

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Histórico.....	4
2.2. Ciclo evolutivo e transmissão .....	5
2.3. A Toxoplasmose ovina .....	6
2.4. A Toxoplasmose humana.....	11
2.5. Diagnóstico .....	16
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Animais de experimentação.....	23
4.2. Delineamento experimental .....	24
4.3. Colheita de materiais .....	25
4.3.1. Colheita de sangue.....	25
4.3.2. Colheita de leite.....	25
4.3.3. Colheita de amostras de solo.....	25
4.4. Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	26
4.5. Cepas de Sarcoma murino TG180.....	26
4.6. Técnica de aglutinação direta modificada (MAD).....	27
4.6.1. Produção de Antígeno para Técnica de aglutinação direta modificada (MAD).....	27
4.6.2. Obtenção de taquizoítos por centrifugação.....	27
4.6.3. Inativação do antígeno pela formalina (AF).....	27
4.6.4. Inativação do antígeno pelo metanol (AM).....	28

4.6.5. Provas sorológicas.....	29
4.6.5.1. Diluição dos soros.....	29
4.6.5.2. Técnica de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pelo metanol (MAD-AM).....	29
4.6.5.3. Técnica de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pela formalina (MAD-AF).....	29
4.6.5.4. Leitura.....	30
4.7. Reação de Imunofluorescência Indireta.....	30
4.7.1. Produção de Antígeno para Reação de Imunofluorescência Indireta.....	30
4.7.2. Confeção das lâminas de imunofluorescência.....	31
4.7.3. Prova Sorológica.....	31
4.7.3.1. Diluição dos soros.....	31
4.7.3.2. Reação de Imunofluorescência indireta.....	31
4.7.3.3. Leitura.....	31
4.8. Pesquisa de oocistos.....	32
4.8.1. Técnica de flutuação em sulfato de zinco.....	32
4.8.2. Leitura.....	33
4.9. Procedimentos de Biologia Molecular.....	33
4.9.1. Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de PCR para <i>T. gondii</i> em amostras de leite de ovelhas.....	33
4.9.2. Extração de DNA.....	33
4.9.3. Quantificação de DNA.....	34
4.9.4. Amplificação do DNA.....	34

4.9.5. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados na PCR.....	35
4.9.6. Controles.....	35
4.9.7. Sequenciamento.....	36
4.10. Análise Estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Animais experimentais.....	39
5.2. Provas sorológicas.....	40
5.3. PCR.....	50
5.3.1. Limiar de detecção para limite mínimo de <i>T. gondii</i> em amostras de leite.....	50
5.3.2. Detecção de DNA de <i>T. gondii</i> em amostras de leite.....	51
5.3.3. Sequenciamento.....	59
6. DISCUSSÃO.....	62
6.1. Animais experimentais.....	62
6.2. Exames realizados.....	64
6.2.1. Provas sorológicas.....	64
6.2.2. PCR.....	69
7. CONCLUSÃO.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....	76

CAMOSSI, L.G. **Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pelo método de aglutinação direta modificado e pesquisa do agente no leite de ovelhas naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii***. Botucatu, 2010. 111p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

## RESUMO

A toxoplasmose em ovinos é uma doença parasitária de grande importância médica veterinária, zootécnica e de saúde pública, uma vez que acarreta prejuízos na criação animal, gerado pelas perdas reprodutivas e econômicas, além de sua implicação na saúde humana, já que o consumo de carne e leite contaminados podem facilitar a transmissão zoonótica. Este estudo tem como propósito maior investigar a resposta imunológica das infecções naturais por *Toxoplasma gondii* em ovelhas, pela análise seqüencial de imunoglobulinas, objetivando a diferenciação entre os estágios agudo e crônico da doença, bem como a pesquisa do DNA do agente no leite pela técnica de PCR. Para realização do estudo utilizaram-se ovelhas em lactação, naturalmente infectadas por *T. gondii*, divididas em dois grupos: G1, com sorologia positiva, e G2, sorologicamente negativo, composto por 20 ovelhas cada um. A diferenciação dos estágios da infecção toxoplásmica, agudo ou crônico foi realizada pela técnica de aglutinação direta modificada (MAT) com antígeno fixado com formalina (MAT-AF) e metanol (MAT-AM) e pela Reação de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de imunoglobulinas IgM e IgG. Os resultados sorológicos evidenciaram que as ovelhas demonstravam perfil sorológico de cronicidade da infecção. A detecção do parasito no leite foi realizada pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), detectando-se o DNA do *T. gondii* em sete amostras de leite, provenientes de cinco ovelhas soropositivas, sendo que em duas ovelhas o DNA foi detectado no leite por duas vezes. A identidade molecular dos produtos amplificados foi confirmada pelo sequenciamento., obtendo-se de 97 a 100% de identidade com *T. gondii*, constituindo-se em resultado relevante quanto aos aspectos de saúde pública.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, infecção natural, PCR, ovelhas, sorologia.

CAMOSSI, L.G. **Differentiation between acute and chronic stages in *Toxoplasma* infection by modified agglutination test and DNA research of *Toxoplasma gondii* in milk from naturally infected ewes.** Botucatu, 2010. 111p. Dissertation (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

## **ABSTRACT**

Toxoplasmosis is a major parasitary disease in sheep, due its importance in veterinary medicine and animal science and in public health, causing reproductive and economic losses to the herd, and also the prejudice to human health for the consumption of contaminated meat and milk, which can facilitate the zoonotic transmission. This study aims to investigate the immune response of natural infections by *Toxoplasma gondii* in sheep by sequence analysis of immunoglobulins, aiming to compare the acute and chronic stages of disease as well as DNA research agent in milk by the technique PCR. To accomplish the goal of this study, naturally infected by *T. gondii* lactating ewes were used, divided in two groups: G1, serologically positive, and G2, serologically negative, each group were composed by 20 ewes. The differentiation between the acute and chronic stages of the illness was made by the modified direct agglutination test (MAT) with antigens fixed with formaline (MAT-AF) and methanol (MAT-AM) and by the indirect fluorescent antibody test searching for IgM and IgG immunoglobulins. The serological results showed that the sheep showed serological profile of chronic infection. The detection of the parasite in milk was performed by polymerase chain reaction (PCR), detecting the DNA of *T. gondii* in seven milk samples from five seropositive sheep, and in two sheep DNA was detected in milk twice. The molecular identity of the amplified products was confirmed by sequencing, getting up for 97 to 100% identity with *T. gondii*, constituting an important result regarding the public health aspects

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, natural infection, PCR, sheep, serology.

# *I*NTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente expansão da ovinocultura no Brasil, com um rebanho atual na ordem de 16 milhões de cabeças (IBGE, 2007), vem se consolidando no país como uma importante atividade agropecuária, traduzida pelo aumento do consumo da carne ovina, e demanda por leite e derivados, devido suas excelentes propriedades nutricionais. Entretanto, apesar do desenvolvimento deste setor na pecuária nacional, o plantel atual de ovinos é pouco expressivo, e incapaz de atender sequer a demanda do mercado interno (ANUALPEC, 2000).

É evidente o potencial de crescimento econômico que esta atividade pode atingir futuramente, considerando que o Brasil apresenta grande extensão territorial e condições climáticas adequadas à criação de ovinos, produzindo carne de qualidade, com preços atrativos, que pode atender não apenas ao mercado interno, mas também ao externo, gerando empregos e renda a toda cadeia produtiva da carne ovina (SIMPLÍCIO e SIMPLÍCIO, 2006).

Nesse cenário, o estudo de doenças que afetam a produção e a qualidade sanitária do rebanho merece atenção especial, destacando-se, a toxoplasmose, importante causa de aborto em ovelhas (BUXTON et al., 2007). Assim, deve-se considerar a relevância da ovinocultura no contexto pecuário atual, além de sua implicação na saúde humana, já que o consumo de carne e leite contaminados, inadequadamente preparados, pode facilitar a transmissão zoonótica.

A detecção de *Toxoplasma gondii* no leite de ovinos e a inexistência de relatos na literatura sobre diferenciação de fase aguda e crônica da doença nesta espécie animal motivaram a elaboração deste projeto de pesquisa.

Assim, este experimento tem como propósito maior investigar a resposta imunológica das infecções naturais por *Toxoplasma gondii* em ovelhas, pela análise seqüencial de imunoglobulinas IgG e IgM, objetivando a diferenciação entre os estágios agudo e crônico da doença, bem como a pesquisa do DNA do agente no leite pela técnica de PCR , a partir dos animais positivos sorologicamente.

# *R*evisão da Literatura

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Histórico

O agente causador da toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, é um protozoário, parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa (LEVINE, 1970), classe Sporozoa (LEUKART, 1979), subclasse Coccidia (LEUKART, 1979), ordem Eucoccidii (LEGER e DOBOSCQ, 1910), família Sarcocystidae (POCHE, 1913), sub-família Toxoplasmatinae (BIOCCA, 1956), sendo a única espécie do gênero *Toxoplasma* (NICOLLE e MACEAUX, 1908) (CURRENT et al., 1990).

O agente foi descoberto em 1908 quando, Charles Nicolle e Louis Manceaux, comunicaram a Academia de Ciências Francesa a descoberta de um parasita intracelular no baço e fígado de um roedor proveniente da Tunísia, Norte da África, o *Ctenodactylus gundi*. Estes pesquisadores acreditaram que o organismo encontrado tratava-se de uma forma particular do gênero *Leishmania*, denominando-o de *Leishmania gondii*. Em 1909, estes autores retificaram sua posição e o denominou *T. gondii*, uma referência a morfologia de arco (toxon=arco), e por ser primeiramente identificada no roedor, “gundi”.

No mesmo ano, no Brasil, Alfonso Splendore intrigado pela mortandade de coelhos ocorrida no biotério do hospital da Real Benemerita Sociedade Portuguesa de Beneficência, necropsiou vários animais que ao exame histopatológico revelou pela coloração de Giemsa, vários corpúsculos parasitários císticos, denominando tal parasita de *Toxoplasma cuniculi* (SOUZA et al., 2009).

O *T. gondii* só foi reconhecido como patógeno humano 30 anos após a primeira descrição da infecção em animais. Em 1923, o oftalmologista Checoslovaco, Josef Janku, descreveu um caso de hidrocefalia e lesões na retina de uma criança de 11 meses de idade, porém não identificou que as formas encontradas ao exame histopatológico se tratavam de taquizoítos de *T. gondii* (MORRISSETTE e AJIOKA, 2009).

Somente em 1939, este protozoário teve sua importância médica reconhecida, quando Abner Wolf, David Cowin e Beryl Page acompanharam

um caso clínico de encefalite em uma criança de três dias de idade, com achados clínicos muito semelhantes ao verificados por Janku. O parasita foi então identificado pelo diagnóstico histopatológico e a doença foi reproduzida em coelhos, cobaias e camundongos (MORRISSETTE e AJIOKA, 2009).

Em ovinos o agente é descrito desde 1954, mas a importância da enfermidade nestes animais ficou evidenciada quando foram consideradas as perdas econômicas decorrentes, principalmente, de abortos, natimortos e crias debilitadas, devido à transmissão congênita do parasito, quando casos de aborto atingiram massivamente ovelhas na Austrália em 1957 (HARTLEY e MARSHALL, 1957).

## **2.2. Ciclo evolutivo e transmissão**

Durante a sua evolução, o *T. gondii* desenvolveu diversos modos de transmissão, sendo as três principais vias a ingestão de tecidos animais contendo cistos infectantes, ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados, e a transmissão congênita. Entretanto, menos de 1% dos humanos e animais de produção adquirem a infecção transplacentariamente (DUBEY e JONES, 2008). Outras formas de transmissão são relatadas na literatura, porém com menor frequência, tais como a ingestão de taquizoítos presentes no leite caprino não pasteurizado, produtos sanguíneos, transplantes de órgãos e transfusão sanguínea (HILL e DUBEY, 2002).

O ciclo biológico do *T. gondii* é heteroxeno facultativo. Taquizoítos e bradizoítos são os dois estágios de desenvolvimento no ciclo de vida assexuada. É o estágio de multiplicação rápida que ocorre em qualquer célula nucleada do hospedeiro intermediário (mamíferos e aves) e qualquer célula nucleada que não seja do epitélio intestinal do hospedeiro definitivo. Nos hospedeiros intermediários, como o homem, ovinos e caprinos e outros animais, ocorre unicamente a forma de multiplicação assexuada (DUBEY, 1986).

A fase sexuada de desenvolvimento ocorre somente nos felídeos (silvestres e gatos domésticos), hospedeiros definitivos do agente. Com o desenvolvimento enteroepitelial nessas espécies, há formação de oocistos, os quais são eliminados juntamente com as fezes, contaminando o meio ambiente

(FRENKEL, 1970). Ressalta-se, que nos felídeos também pode ocorrer paralela ou simultaneamente, a multiplicação extra intestinal assexuada (taquizoítos e bradizoítos), anteriormente descrita.

Todos os três estágios de desenvolvimento, taquizoítos (fase aguda), bradizoítos (fase crônica) e esporozoítos presentes nos oocistos são infectantes, tanto para os hospedeiros intermediários como para os hospedeiros definitivos, garantindo o sucesso da transmissão por diversas vias e em inúmeras espécies de hospedeiros. O ciclo da doença pode continuar indefinidamente por transmissão de hospedeiros intermediários para definitivo, de hospedeiro definitivo para intermediário, entre hospedeiros intermediários (até mesmo na ausência de hospedeiros definitivos) e entre hospedeiros definitivos (até mesmo na ausência de hospedeiros intermediários) (TENTER, 2009).

Classicamente, o consumo de carne crua ou mal cozida, principalmente de ovinos e suínos, têm sido apontado como o principal fator de risco para aquisição da toxoplasmose humana (KIM e WEISS, 2008). A importância desta via de transmissão para o homem, foi destacada recentemente em duas revisões científicas (KIJLSTRA e JONGERT, 2008, 2009).

A participação do gato no ciclo de vida do *T. gondii* é essencial, inclusive foi verificado que em ilhas isoladas do Pacífico, da Austrália e dos EUA em que não havia a presença de felídeos, a toxoplasmose também era ausente (DUBEY e SU, 2009).

Em herbívoros, além da transmissão transplacentária, a principal via de transmissão é pela ingestão de oocistos presentes nas pastagens, feno, forragem, ração e na água fornecida a estes animais (TENTER et al., 2000).

### **2.3. A toxoplasmose ovina**

A infecção por *T. gondii* é relativamente comum em pequenos ruminantes, causando problemas reprodutivos e perdas econômicas nas criações de ovinos (BUXTON et al., 2007; PANADERO et al., 2010). O aborto representa a principal repercussão clínica e econômica da toxoplasmose ovina.

Desde 1954, o parasita é descrito como agente causador de abortos, considerado o maior responsável por problemas reprodutivos na espécie ovina (HARTLEY et al., 1954), até momento atual (PEREIRA-BUENO et al., 2004).

Desde 1972, quando o ciclo de vida do parasita foi completamente elucidado por Dubey e Frenkel, e ficou definitivamente estabelecida a importância dos felídeos como hospedeiro definitivo da doença, as evidências tem indicado que a contaminação ambiental com os oocistos de *T. gondii* eliminados pelas fezes de felídeos, incluindo-se o gato doméstico, é a principal fonte de infecção para os ovinos (BUXTON et al., 2006).

Os danos reprodutivos como a repetição de cio, o aborto, a ocorrência de natimortos, ou o nascimento de cordeiros débeis, que vão a óbito logo após nascerem, e os consequentes prejuízos econômicos são evidências há tempos relatadas em países como Nova Zelândia, Austrália, Inglaterra, França, Índia e Canadá (DUBEY e BEATTIE, 1988). Nos países europeus, a toxoplasmose é apontada como segunda maior causa de abortamentos (CHANTON et al., 2002), sendo a primeira causa de aborto infeccioso em ovinos o agente *Chlamydophila abortus* (BOREL et al., 2004).

Em uma revisão recente de Dubey (2009) a menor prevalência mundial encontrada foi de 3% no Paquistão e a maior foi de 95,7% na Turquia. Na Tabela 1 são apresentadas as prevalências encontradas nos últimos dez anos, em diversas regiões brasileiras.

**Tabela 1.** Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos em estados das cinco regiões brasileiras por meio de três técnicas sorológicas, nos últimos dez anos. Botucatu, SP, 2010.

Região	Estado	Técnica	Ocorrência	Positivos/Total	Referência
Norte	Rondônia	RIFI	46,8%	66/141	Cavalcante et al. (2004)
Nordeste	Bahia	LAT	18,75%	45/240	Gondim et al. (1999)
	Pernambuco	RIFI	35,30%	61/173	Silva et al. (2003)
	Rio Grande do Norte	ELISA	29,41%	30/102	Clementino et al. (2007)
	Rio Grande do Norte	RIFI	20,70%	73/409	Soares et al. (2009)
Centro-Oeste	Distrito Federal	RIFI	38,22%	364/1028	Ueno et al. (2009)
Sudeste	São Paulo	RIFI	55,10%	194/352	Langoni et al. (1999)
	São Paulo	RIFI	7,70%	40/522	Silva e Langoni(2001)
	São Paulo	RIFI	23,00%	23/100	Silva et al. (2002)
	São Paulo	ELISA	31,00%	62/200	Meirelles et al. (2003)
	São Paulo	RIFI	34,70%	207/597	Figliuolo (2004)
	São Paulo	RIFI	52,00%	254/488	Lopes et al. (2010)
Sul	Paraná	RIFI	51,80%	118/228	Garcia et al. (1999)
	Paraná	RIFI	54,60%	185/339	Ogawa et al. (2003)
	Rio Grande do Sul	RIFI	39,00%	48/123	Silva e la Rue (2006)
	Paraná	RIFI	7,00%	11/157	Moura et al. (2007)
	Paraná	RIFI	51,50%	157/305	Romanelli et al. (2007)

RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA = Ensaio Imunozimático;  
LAT=Aglutinação em Látex.

A toxoplasmose clínica não é o principal problema nestes animais (DUBEY e JONES, 2008), a importância atribuída a esta protozoose em termos veterinários consiste nas verdadeiras epizootias de aborto e natimortalidade em cordeiros (DUBEY, 1994). Infecção no início da gestação pode resultar em morte fetal e reabsorção, algo que só raramente pode ser observado (BUXTON et al., 2007). Nas fases mais adiantadas da gestação tanto pode haver aborto como sobrevivência do feto, mas neste caso, o cordeiro poderá apresentar patologias de ordem geral (FREYRE et al., 1997; PEREIRA-BUENO et al., 2004). Portanto, a severidade da infecção é associada ao tempo de gestação, quanto menor o tempo de gestação, mais severas são as conseqüências (DUBEY et al., 2009).

A morte fetal é gerada pela multiplicação do parasita na placenta, e posteriormente pela invasão fetal (DUBEY, 1988). Quando a lesão é iniciada nos placentomas, a replicação do *T. gondii* ocasiona necrose focal placentária gerando reações inflamatórias que se estendem ao longo da gestação até o momento do nascimento ou do aborto (BUXTON e FINLAYSON, 1986). A multiplicação continuada do parasita na placenta e no feto é provavelmente ocasionada pela supressão de mecanismos imunes da placenta e da imaturidade do sistema imune fetal (BUXTON e FINLAYSON, 1986).

Nas ovelhas gestantes a resposta imune é modulada para acomodar a presença do feto semialogênico e como resultado, a imunidade materna suprime os mecanismos que ativam as células inflamatórias, com expressão mínima de citocinas, como interleucina 2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interferon gama (IFN $\gamma$ ) (ENTRICAN e WHEELHOUSE, 2006). Entretanto, ao mesmo tempo em que garantem o sucesso da gestação, estes mecanismos também representam vulnerabilidade, fazendo com que a placenta e o feto tornem peculiarmente suscetíveis a certos patógenos (BUXTON et al., 2007).

Somente por volta do sexagésimo dia de gestação, o feto começa a montar a resposta imunológica, porém não suficiente para conferir proteção contra *T. gondii* até o último mês antes do nascimento (BUXTON e FINLAYSON, 1986). A infecção antes do 40<sup>o</sup> dia de gestação causa morte embrionária e reabsorção fetal, entre 40<sup>o</sup> e 120<sup>o</sup> dias de gestação a infecção resulta em maceração fetal, mumificação ou aborto, após o 120<sup>o</sup> dia pode gerar natimortos ou nascimento de cordeiros fracos. As alterações histopatológicas predominantemente encontradas no feto abortado são miocardite, encefalite não supurativa, nefrite intersticial, hepatite e pneumonia intersticial difusa (AHMED et al., 2008).

O fato de esta doença ocorrer de forma esporádica e das matrizes geralmente não apresentarem sintomatologia clínica característica até o momento do aborto, faz com que a preocupação dos criadores seja maior com as infecções de etiologia bacteriana ou viral (CAVALCANTE, 2004). Desta forma, a perda econômica devido à toxoplasmose ainda permanece desconhecida e são atribuídos abortos em ruminantes a outras doenças, como bruceloses, clamidioses e salmoneloses (HURTADO et al., 2001).

Em muitos países o *T. gondii* é reconhecido como importante causa de abortos e mortalidade neonatal, mas pouco se sabe sobre a toxoplasmose associada a abortos em ovinos (DUBEY, 2009). Ressalta-se ainda, a necessidade de incluir este agente entre as causas de perdas reprodutivas nos rebanhos brasileiros (PESCADOR et al., 2007).

Na América do Sul, em 1997, estimou-se que os prejuízos anuais decorrentes dessa enfermidade em rebanhos uruguaios variaram entre 1,5 a 4,7 milhões de dólares (FREYRE et al., 1997). Na Itália, as perdas econômicas devido à mortalidade de cordeiros e conseqüentemente, a falhas na lactação, são estimadas em prejuízos acima de 10 milhões de euros por ano (MASALA, 2003).

Ahmed et al. (2008) verificaram taxa de abortos por toxoplasmose nos rebanhos caprinos e ovinos do Egito, de 35,6 e 43,7%, respectivamente. Na Itália as porcentagens encontradas foram de 11,1% para os ovinos e 6,4% para caprinos (MASALA, 2003).

Essa importância já foi relatada desde 1963, quando o agente foi isolado do músculo de ovelhas naturalmente infectadas que apresentavam títulos de anticorpos específicos (JACOBS et al., 1963). Desde então, inúmeras outras investigações têm demonstrado a presença do parasita na carne ovina. Segundo Falcón e Freyre (2009), as taxas de isolamento nas amostras analisadas variaram de 3 a 68%, demonstrando a alta prevalência de infecção na carne de ovinos.

No Brasil, Silva e Langoni (2001) encontraram taxa de isolamento de 69% (27/39) em ovinos sorologicamente positivos para *T. gondii* destinados ao abate. Silva et al. (2009) identificaram 9 genótipos de *T. gondii* isolados de 22 ovinos destinados ao abate, inclusive a linhagem clonal Tipo II, não descrita no Brasil.

Anteriormente havia o conceito de que o *T. gondii* não era capaz de sobreviver após processo de cura, defumação ou congelamento, mas a carne poderia permanecer infectante após preparo em microondas, devido ao cozimento desigual (LUNDEN e UGGLA, 1992). No entanto, cistos viáveis de *T. gondii* foram recuperados a partir de carne congelada (DUBEY e KIRKBRIDE, 1989), curada (WARNEKULASURIYA et al., 1998), sendo o

consumo de carne curada considerado fator de risco para toxoplasmose congênita (COOK et al., 2000).

Além da carne, como via de transmissão, a eliminação do parasito pelo leite já foi demonstrada em cabras naturalmente infectadas (CHIARI E NEVES, 1984) e também demonstrada em infecção experimental, havendo eliminação do *T. gondii* em 12,7% (9/71) das cabras (VITOR et al., 1991), com sobrevivência do agente até 7 dias a temperatura de 4°C (WALSH et al., 1999).

#### **2.4. A toxoplasmose humana**

A infecção determinada pelo *T.gondii* é uma das mais importantes infecções parasitárias no homem, estimando-se que aproximadamente um terço da população humana esteja infectada (HILL e DUBEY, 2002). As prevalências variam de 0 a 100%, conforme a região e o grupo étnico estudado (TENTER et al., 2000). No Brasil, as taxas de prevalências encontradas por região, encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em humanos, em estados das cinco regiões brasileiras, nos últimos dez anos. Botucatu, SP, 2010.

Região	Estado	Técnica	Ocorrência	Positivos/Total	Referência
Norte	Pará	ELISA	82,93%	68/82	Carmo et al. (2004)
	Rondônia	MAD	73,30%	195/266	Cavalcante et al. (2006)
Nordeste	Fortaleza	ELISA	53,10%	529/997	Rey e Ramalho (1999)
	Recife-Pernambuco	RIFI	74,70%	376/503	Porto et al. (2008)
	Sergipe	ELISA	69,00%	6351/9550	Alves et al. (2009)
Sudeste	São Paulo	ELISA	53,70%	478/890	Olbrich e Meira (2004)
	São Paulo	RIFI	32,40%	110/339	Franciso et al. (2006)
	São Paulo	ELISA	57,30%	133/232	Galisteu et al. (2007)
Centro -Oeste	Mato Grosso do Sul	HI	30,34%	44/145	Araújo et al. (2000)
	Goiás	RIFI	51,20%	267/522	Avelino et al. (2003)
	Mato Grosso	ELISA	70,70%	165/205	Leão et al. (2004)
	Mato Grosso do Sul	ELISA	91,60%	29781/32512	Figueiró-Filho et al. (2005)
Sul	Paraná	RIFI	66,00%	228/345	Garcia et al. (1999)
	Paraná	RIFI	67,00%	1044/1559	Reichel et al. (2000)
	Santa Catarina	ELISA	41,91%	1713/2994	Cantos et al. (2000)
	Rio Grande do Sul	ELISA	61,10%	6396/10468	Reis et al. (2006)

RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA = Ensaio Imunozimático; LAT=Aglutinação em Látex, MAD= Método de algutinação direta modificado, HI= Inibição da hemaglutinação.

O protozoário *T. gondii*, juntamente com as bactérias *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* representam mais de 75% de todas as mortes transmitidas por alimentos nos EUA (MEAD et al., 1999).

É considerada como importante causa mundial de morbidade e mortalidade infantil e estima-se que nasçam anualmente, no Brasil, cerca de 60.000 crianças infectadas, podendo ocorrer ainda, aborto, parto prematuro, natimorto e casos de malformação (MACÊDO, 1994).

A toxoplasmose congênita geralmente ocorre quando a mulher é primariamente infectada com *T.gondii* durante a gestação (REMINGTON et al., 2006). A infecção congênita pode ocasionar uma variedade de manifestações no recém-nascido, sendo os sinais clássicos a hidrocefalia, calcificação cerebral, retinocoroidite e falhas no desenvolvimento (REMINGTON et al., 2006).

Nos EUA, os custos com a toxoplasmose congênita ultrapassam US\$ 1,26 milhão por caso, valores atribuídos a gastos médico-hospitalares, educação especial, cuidados especiais na residência do paciente, além da perda na produtividade deste indivíduo (ROBERTS et al., 1994; KIJLSTRA e JONGERT, 2008).

A sua incidência é alta e, apesar da doença ser frequentemente subclínica, manifesta-se principalmente em crianças infectadas congenitamente e em indivíduos imunocomprometidos (DUBEY e JONES, 2008).

Em imunossuprimidos, a enfermidade é importante em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e pacientes transplantados submetidos à terapia imunossupressora (HILL e DUBEY, 2002). A encefalite toxoplásmica é a apresentação clínica mais comum da toxoplasmose entre indivíduos aidséticos (DUBEY e JONES, 2008). Pode causar encefalite em até 40% dos pacientes com AIDS e, estima-se que de 10 a 30% deles morram devido à doença (TENTER et al., 2000).

Mesmo em indivíduos sem comprometimento imunológico, a toxoplasmose vem sendo associada à linfadenopatia, febre, fraqueza, debilidade, oftalmite, infecções multissistêmicas e, recentemente, a esquizofrenia e outras desordens psiquiátricas (MCALLISTER, 2005).

Produtos cárneos oriundos das espécies suína, ovina e caprina, contendo cistos teciduais, quando ingeridos crus ou mal cozidos, são uma das principais vias de transmissão para a população humana (DIAS e FREIRE, 2005). Estudos de investigação epidemiológica demonstram estreita relação entre a prevalência da infecção nos rebanhos e a ocorrência de casos isolados ou de surtos de toxoplasmose humana, podendo-se inferir, que a taxa de infecção nestes animais possa ser considerada um possível índice preditivo da doença humana. Reforça essa afirmativa a descrição de surtos seguida da ingestão de carne crua ou mal passada ou do consumo de leite in natura. Abaixo segue uma breve descrição dos surtos identificados no Brasil.

O primeiro relato de surto de toxoplasmose no Brasil, descrito por Magaldi et al. (1967) ocorreu em Bragança Paulista-SP. Neste, de 81 pessoas que viviam em um seminário, 30 apresentaram toxoplasmose. Em virtude do pouco conhecimento sobre a epidemiologia da doença na época, não se chegou a conclusões a respeito das fontes de infecção ou das vias de

transmissão. Porém chama a atenção o fato de que todos, com exceção de três dos seminaristas que adoeceram, comeram salame de um frigorífico de Bragança Paulista.

Surto de toxoplasmose em uma festa árabe na cidade de Bandeirantes-Paraná, em 1993, em que pessoas apresentaram quadro clínico e perfil sorológico sugestivo de infecção aguda, após ingerir carne crua de um rebanho ovino com 23,0% de soropositividade para *T. gondii* (BONAMETTI et al., 1997).

Na confirmação de surto intra familiar de toxoplasmose no município de Santa Vitória do Palmar-RS, ficou associado o consumo de embutido de carne suína (copa) com a ocorrência de toxoplasmose entre os adultos (BRASIL, 2006).

Em 2006, um surto de toxoplasmose associado ao consumo de prato a base de carne crua (Steak tartar) no município de São Paulo e Guarujá foi publicado pelo Boletim Epidemiológico Paulista, onde seis casos foram confirmados para a doença (BRASIL, 2006).

A infecção humana pelo leite de animais vem sendo relatada como possível há alguns anos. Sachs et al. (1982) identificaram um surto de toxoplasmose aguda em dez pessoas de uma mesma família que haviam ingerido leite cru de cabra. Quando correlacionaram a soropositividade desses indivíduos com outros fatores de risco para toxoplasmose, nenhum foi tão expressivo quanto à ingestão de leite cru de cabra. Desse modo, os autores sugeriram ser este um importante veículo de transmissão para o *T. gondii*.

A ingestão de leite de cabra não pasteurizado também foi considerada como provável fonte de infecção de uma família proveniente de área rural (CHIARI e NEVES, 1984). Embora os relatos de infecção estejam associados ao leite de cabra, outros autores declararam que o leite de outros animais pode constituir fonte potencial de transmissão do *T. gondii* (SPALDING, 2005). Já foi demonstrada, experimentalmente, a presença do agente no leite de várias espécies como em bovinos, ratos, camundongos, camelos, gatos e cães (PETTERSEN, 1984; TENTER et al., 2000; POWELL et al., 2001; BRESCIANI et al., 2001; ISHAG et al., 2006; COSTA, 2008).

Consultando a literatura observam-se poucos dados relativos a detecção de *T. gondii* no leite de ovelha, devendo-se admitir que no que se refere ao risco de transmissão pela ingestão de leite cru, deva ocorrer efeito semelhante

ao leite de cabra. Em um estudo realizado em rebanhos de ovelhas leiteiras no sul da Itália foi possível detectar o DNA do *T. gondii* em quatro amostras de leite de um total de 117 amostras, demonstrando a potencialidade de transmissão a partir de leite e produtos lácteos oriundos de ovelhas (FUSCO et al., 2007).

Experimentalmente já foi descrito camundongos lactantes cronicamente infectados, excretando cistos pelo seu leite, mostrando que, apesar da transmissão ser comumente atribuída à eliminação de taquizoítos, também pode ocorrer pela excreção de cistos teciduais (PETTERSEN, 1984, COSTA, 2008).

Estes dados são de importância singular, uma vez que no Brasil, o leite e seus derivados são importantes fontes de alimentação em áreas rurais, que utilizam o leite para subsistência, sem pasteurização ou fervura prévia ao consumo.

Embora a ordenha de ovelhas pareça algo novo e original em nosso país, os países europeus, asiáticos e do Norte africano tem uma tradição milenar na produção e consumo de queijos de leite de ovelha. Sendo assim, existem no mundo mais de 100 milhões de ovelhas que são ordenhadas com uma produção estimada em 7,8 milhões de litros de leite por ano (FAO, 2001). Atualmente observa-se um incentivo ao consumo de leite de cabra e a introdução do leite de ovelhas, por apresentar inocuidade para pessoas que possuem intolerância a lactose do leite de vaca (BRITO, 2006). Estes fatos justificam a preocupação em obter-se um produto que seja inócuo a saúde humana.

Embora não associado ao consumo de carne ou ingestão de leite, vale ressaltar que no Brasil foi registrado o maior surto de toxoplasmose do mundo, ocorrido no município de Santa Isabel do Ivaí-(PR). Um total de 462 pessoas apresentaram sorologia sugestiva para toxoplasmose (IgM reagente). Dentre os acometidos, sete eram gestantes e destas, seis tiveram seus filhos infectados, ocorrendo um caso de anomalia congênita grave e um aborto espontâneo. A investigação epidemiológica concluiu que a fonte de contaminação era um dos reservatórios de água da cidade que estava contaminado com oocistos de *Toxoplasma* (BRASIL, 2002).

O declínio da incidência da toxoplasmose humana está diretamente relacionado com a redução da infecção nos animais, o qual é alcançada por medidas de controle. O controle da toxoplasmose baseia-se na monitoração da evolução da infecção subclínica na população animal, após a adoção de medidas preventivas apropriadas. Para tal propósito, requer-se a identificação rotineira dos animais infectados com *T. gondii*, o qual deve ser baseado em um teste diagnóstico rápido e exequível (MAINAR-JAIME e BARBERÁN, 2007).

## 2.5. Diagnóstico

A frequência da infecção começou a ser caracterizada a partir de 1948, com Sabin e Feldman, e a seguir com outros pesquisadores, ao desenvolverem as primeiras provas diagnósticas da enfermidade. Tornou-se uma valiosa ferramenta diagnóstica em função do diagnóstico clínico difícil, por apresentar sintomas e sinais clínicos genéricos o que leva a confusão com outras afecções de etiologias diversas, necessitando de técnicas laboratoriais para sua confirmação (UCHÔA, 1999).

Classicamente, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose baseia-se na pesquisa de anticorpos contra o parasito por meio de testes sorológicos (COSTA et al., 2007). Segundo as características desses anticorpos, diferentes marcadores sorológicos têm sido descritos para distinguir entre infecção latente e infecção recente (CONTRERAS et al., 2000). Outras respostas se esperam, também, da sorologia da toxoplasmose, como datar o contágio pelo *Toxoplasma* ou reagudização de uma toxoplasmose latente. Por tais interrogações, a sorologia da toxoplasmose apresenta-se como uma das mais complexas, em contínua evolução, exigindo uma variedade de testes e experiência do responsável pela realização e interpretação dos resultados.

Em ovinos, a utilização de testes sorológicos para a demonstração de anticorpos anti-*T. gondii* é de grande importância, frente às limitações encontradas nos diagnósticos parasitológicos, molecular e clínico, dificultados pela quase totalidade de formas assintomáticas (BAHIA, 1995). Além disso, quando sintomática, a toxoplasmose pode assumir quadros clínicos facilmente confundidos com grande variedade de enfermidades, dificultando a tomada de medidas específicas de controle e tratamento (VIDOTTO, 1992).

Extensa literatura é encontrada sobre estudos de prevalência de infecção em ovinos, por meio da detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. Embora estes dados forneçam valiosa informação epidemiológica, não discriminam entre infecção aguda e crônica (HILL e DUBEY, 2002).

Há poucos relatos existentes na literatura sobre a distinção das infecções agudas e crônicas na toxoplasmose ovina e, quando existentes, são baseados apenas no encontro de altos títulos de anticorpos IgG. Figlioulo et al. (2004), relataram que 3,62% dos ovinos estudados em São Paulo se encontravam na fase aguda da infecção por apresentarem títulos sorológicos superiores a 1024. O mesmo tipo de raciocínio é utilizado por Klun et al. (2006), que sugeriram que aproximadamente 10% dos ovinos avaliados na Sérvia se encontravam na fase aguda da infecção, pois apresentavam anticorpos da classe IgG específicos com títulos iguais ou superiores a 1600.

Em humanos e também nos animais, o diagnóstico da toxoplasmose aguda recém adquirida tem sido feito tradicionalmente por provas sorológicas baseadas na detecção de imunoglobulinas específicas, anticorpos IgM, ou pela demonstração de títulos ascendentes (soroconversão) de anticorpos específicos IgG. Entretanto, devido a prevalência de altos títulos de anticorpos IgG em indivíduos aparentemente normais ou a persistência de anticorpos IgM específicos em alguns indivíduos tem complicado a interpretação de testes sorológicos quando se suspeita de toxoplasmose (BERTOZZI et al., 1999; SUZUKI et al., 2001).

Apesar da importância do estudo da resposta humoral na toxoplasmose, existem poucas informações disponíveis principalmente nas espécies domésticas, entre elas os ovinos (CONDE et al., 2001). Por estas razões, é necessário pesquisar novas técnicas sorológicas, capazes de distinguir infecção recente de infecção crônica pelo *T. gondii*, fornecendo, assim, melhor precisão temporal, quanto a ocorrência da infecção (MEIRELES, 2005).

Dentre as provas sorológicas para a detecção de anticorpos específicos anti-*T. gondii* tem-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a técnica de Aglutinação Direta Modificada (MAD), dois testes de precisão comprovada na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de animais e humanos (MINHO, 2004).

A RIFI é a prova mais empregada no diagnóstico da toxoplasmose, sendo utilizada como padrão ouro. Títulos a partir de 16 são considerados positivos para *T. gondii* (DUBEY e BEATTIE, 1988, ESTEBAN-REDONDO e INNES, 1998). Segundo Fialho e Araújo (2002), a RIFI é um teste específico e sensível, de fácil realização, com as desvantagens do alto custo do microscópio de imunofluorescência e de apresentar interferências como luminosidade, objetivas do microscópio, filtros, sensibilidade do conjugado e do antígeno, e subjetividade da leitura. Por essa técnica, os anticorpos IgM podem ser detectados uma a duas semanas após o início da infecção, alcançando o pico em 6 a 8 semanas, quando então declinam. Títulos baixos podem persistir por 12 meses. Os anticorpos IgG aparecem mais tarde, seus níveis desaparecem gradualmente, podendo persistir ao longo da vida do hospedeiro.

A MAD consiste em um teste simples, acurado e não espécie-específico, que detecta principalmente IgG, excluindo as IgM, porque o 2-mercaptoetanol utilizado no teste, inativa as IgM específicas e inespecíficas. No entanto, o teste pode ser realizado com a utilização de acetona (AA), metanol (AM) ou formalina (AF) como fixadores de taquizoítos, permitindo assim diferenciar as IgGs de fase aguda e crônica da infecção (THULLIEZ et al., 1986; WILSON et al., 1990; SILVA et al., 2007).

A MAD permite comparar os títulos de anticorpos obtidos com taquizoítos fixados com formalina (antígeno AF) com títulos de anticorpos obtidos com taquizoítos fixados com acetona (antígeno AA). Os antígenos AA, AM e AF são antígenos associados a membrana, sendo que os primeiros são encontrados predominantemente em taquizoítos e o último, em taquizoítos e bradizoítos. Altos títulos na MAD-AA ou AM estão associados com uma infecção recentemente adquirida, enquanto que, títulos altos na MAD-AF estão associados com infecção passada (SUZUKI et al., 2001).

Na MAD-AF, os antígenos reagem com anticorpos dirigidos tanto contra antígenos 27kDa (típico da fase aguda) como contra antígenos de 35kDa (típicos de fase crônica), enquanto que na MAD-AA aglutinam somente antígenos de 27kDa. Desta forma, consegue-se distinguir a fase aguda da fase crônica da infecção usando-se as duas provas concomitantemente (THULLIEZ et al., 1986; SILVA et al., 2007).

Silva et al. (2007) verificaram que em substituição a acetona, o metanol apresentou excelentes resultados na diferenciação dos anticorpos de acordo com o estágio da infecção. Além disso, demonstraram o comportamento cinético dos anticorpos em ratas infectadas experimentalmente com *T.gondii*. Inicialmente houve a detecção de anticorpos de fase aguda nas duas provas de aglutinação, e posteriormente houve a diferenciação com os de fase crônica, a partir dos títulos obtidos. A partir da terceira semana foram detectados títulos superiores na MAD-AF em comparação com a MAD-AM. Os autores enfatizam que um período maior de infecção, como mais de um ou dois anos, seria mais eficiente para se analisar a diferenciação dos estágios agudo e crônico da infecção, pois os títulos da MAD-AF tendem a se manter elevados com a cronificação da infecção, e adaptação do sistema imune na produção de imunoglobulinas mais ávidas, enquanto que os títulos da MAD-AM tendem a diminuir, com a cronificação da infecção, apresentando baixa avidéz.

Nos últimos anos incorporaram-se técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico da toxoplasmose, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) revolucionou o diagnóstico da infecção (BOOTHROYD, 2009). Seu uso na Medicina Veterinária, especialmente na detecção da toxoplasmose ovina, têm se mostrado uma importante ferramenta diagnóstica, principalmente nos casos de aborto (WHEELER et al., 1990), além da sua eficácia na detecção do DNA do parasito em produtos cárneos destinados ao consumo humano, útil em programas de monitoramento para segurança alimentar (ASPINALL et al., 2002). Esta técnica permite a amplificação das sequências específicas do DNA, mesmo que presente em quantidades muito pequenas, apresentando como principal vantagem a alta sensibilidade e especificidade, mas a principal desvantagem se encontra ainda nos altos custos dos equipamentos necessários (SWITAJ et al., 2005).

# *O*bjctivos

### 3. OBJETIVOS

**1** - Diferenciar os estágios agudo e crônico da infecção toxoplásmica em ovinos infectados naturalmente com *T. gondii*, utilizando-se o método de aglutinação direta com antígenos fixados pelo metanol e formalina;

**2** - Acompanhar a evolução dos títulos de anticorpos das ovelhas nas duas provas sorológicas (fixação em metanol e formalina) ao longo de 12 meses após detecção da infecção;

**3** - Avaliar possível detecção do DNA de *T. gondii* por reação em cadeia da polimerase (PCR), no leite de ovelhas envolvidas no estudo;

**4** - Correlacionar os resultados sorológicos com o possível encontro do agente no leite das ovelhas.

# ***M*ATERIAL E MÉTODOS**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais “a campo” foram desenvolvidos na Fazenda Experimental de Ensino, Pesquisa e Produção “Edgárdia” pertencente a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizada no município de Botucatu (22°47’30” a 22°50’ de latitude S e 48°22’30” de longitude W). Os trabalhos laboratoriais foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses - NUPEZO, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP. Todos os procedimentos foram aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal, protocolo número 13/2008-CEEA.

### 4.1. Animais de experimentação

Um total de 40 ovelhas, em lactação, da raça Bergamácia foram mantidas no setor de ovinos da Fazenda Edgárdia, durante todo o período experimental, que foi de 12 meses. Os animais foram mantidos sob pastejo rotacionado, piquetes cultivados com capim Tanzânia (*Panicum maximum*), com acesso a água potável “*ad libitum*” em bebedouros automáticos. No inverno, pela escassez de pasto, foram suplementadas com 300 gramas por cabeça/dia de ração comercial (Ovino Tech Elite® - Purina)

Para a produção dos antígenos necessários para as provas sorológicas foram utilizados camundongos Swiss Webster, albinos, não isogênicos, de 30 dias de idade, com cerca de 30 a 40g. Os animais foram procedentes do no Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu.



**Figura 1 e 2.** Rebanho de ovelhas Bergamácia da Fazenda Experimental Edgárdia – UNESP – Campus Botucatu. Botucatu, SP, 2010.

#### **4.2. Delineamento experimental**

A triagem sorológica das ovelhas foi realizada no período próximo a cobertura, em março de 2008. Estas foram submetidas à sorologia para toxoplasmose utilizando-se o método de Aglutinação Direta Modificada (MAD) de acordo com Desmonts e Remington (1980) e também a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo Camargo (1974), instituindo-se para ambas como ponto de corte o título 16. A partir dos resultados obtidos pelo teste, 40 ovelhas foram selecionadas e divididas em dois grupos experimentais, G1 e G2, com 20 ovelhas em cada grupo, assim divididos:

Grupo 1: 20 animais sorologicamente positivos para a infecção por *T. gondii*.

Grupo 2: 20 animais sorologicamente negativos para a infecção por *T. gondii*.

Os animais dos grupos 1 e 2 tiveram acompanhamento sorológico pelo MAD e pela RIFI, por um período de 12 meses, com frequência quinzenal, iniciando-se a partir do período de cobertura das fêmeas, no final do mês de março de 2008. Após a parição, evento ocorrido entre final de agosto e primeira quinzena de setembro de 2008, concomitantemente com a prova sorológica foi também efetuada a coleta de leite das ovelhas soropositivas e também das soronegativas, com frequência quinzenal, durante todo o período de lactação, para posterior análise das amostras pelo PCR.

### **4.3. Colheita de materiais**

#### ***4.3.1. Colheita de sangue***

Amostras individuais de sangue das ovelhas foram colhidas quinzenalmente dos grupos 1 e 2 por venopunção jugular com auxílio de vacutainer. O soro sanguíneo foi obtido por centrifugação a 1600g por 10 minutos, transferido para microtubos identificados e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos exames sorológicos. Todas estas amostras foram separadas em três alíquotas (1- para MAD-AM e 2- MAD-AF; 3- para RIFI-IgM e RIFI-IgG), para evitar o frequente congelamento e descongelamento das mesmas, e consequente interferências nos resultados das provas sorológicas.

#### ***4.3.2. Colheita de leite***

O leite das ovelhas foi obtido por ordenha manual dos tetos utilizando-se anti-sepsia prévia, com álcool iodado e uso de luvas durante a manipulação. As amostras foram separadas em três alíquotas, com 1.5 mL cada, e armazenadas individualmente em microtubos de polipropileno estéreis livres de DNAses e RNAses, mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório, e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração de DNA e amplificação por PCR.

#### ***4.3.3. Colheita de amostras de solo***

Amostras de solo foram colhidas das quatro áreas de pastejo onde os animais eram rotacionados e nas proximidades do centro de manejo, coletando-se cinco amostras por área (quatro amostras laterais e uma no centro das áreas), com aproximadamente dez gramas cada amostra, colhidas com auxílio de espátula de jardinagem, a uma profundidade de mais ou menos cinco cm, totalizando 25 amostras. Foram acondicionadas em sacos plásticos, e na chegada ao laboratório foram mantidas na geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ , até serem preparadas para a pesquisa de oocistos pela técnica de flutuação em sulfato de zinco.

#### **4.4. Cepas de *Toxoplasma gondii***

Para a produção de antígeno utilizado em todas as provas sorológicas realizadas neste experimento foi utilizada a cepa RH, isolada por Sabin em 1939 de uma criança nos Estados Unidos (SABIN, 1941), pertencente ao genótipo I. Esta é mantida por inoculação intraperitoneal semanal de camundongos Swiss, albinos, com 1mL de exsudato peritoneal obtido de camundongos previamente inoculados. O animal foi fixado em decúbito dorsal, procedendo-se a anti-sepsia da região ventral com álcool iodado, colhendo-se o líquido ascítico com seringa de 10 mL e agulha 30mmx7mm. Primeiramente injetou-se 5 mL de solução fisiológica 0,9%, estéril, e depois aspirou-se o conteúdo, resgatando-se os taquizoítos. No caso de punção acidental de algum vaso ou órgão, o líquido peritoneal era descartado, para que não houvesse contaminação do líquido ascítico por células, interferindo posteriormente, na leitura pelo MAD ou pela RIFI.

#### **4.5. Cepa de Sarcoma murino TG180**

As células de sarcoma linhagem TG180 são células tumorais derivadas do sarcoma ATCC (CCRFS-180 II), em 1958. Estas células se multiplicam como um tumor ascítico em camundongos e são comumente utilizadas para obtenção de uma grande quantidade de taquizoítos, quando da inoculação concomitante do parasita com a célula, muito útil para produção de antígeno pelo MAD. Para a manutenção desta linhagem tumoral em camundongos inoculou-se, pela via intraperitoneal, cinco camundongos de 30 dias de idade, com 0,2ml do lavado peritoneal de um camundongo previamente inoculado. Após 12 dias, procedeu-se a eutanásia do camundongo que apresentou maior grau de ascite, com a porção ventre abdominal mais rosada. Fixou-se o animal em decúbito dorsal, procedendo-se a anti-sepsia da região ventral com álcool iodado, colhendo-se o líquido ascítico com seringa de 10 mL e agulha 30mmx7mm. Outros cinco animais foram inoculados com parte do material recém obtido. Os camundongos restantes foram eutanasiados assim que os da nova passagem desenvolveram ascite (DESMONTS e REMINGTON, 1980).

## **4.6. Técnica de aglutinação direta modificada (MAD)**

### ***4.6.1. Produção de antígeno para técnica de aglutinação direta modificada (MAD)***

Foram inoculados 20 camundongos, via intraperitoneal, com 1mL das suspensões da cepa RH, previamente selecionada. Foi colhido o exsudato peritoneal destes, três dias após, por lavagem intraperitoneal com 10mL de solução salina 0,95% estéril, por animal. Os exsudatos foram observados e avaliados ao microscópio e aqueles ricos em parasitas e livres de contaminação bacteriana, hemácias e leucócitos, foram homogeneizados, volume a volume, com líquido ascítico tumoral (células de sarcoma murino TG180), previamente diluído a 1/10 em solução salina 0,95% estéril. Com esta suspensão de taquizoítos e células tumorais, foram inoculados em camundongos Swiss, com 40 dias de idade (2mL para cada). Dois dias após a inoculação, foi colhido o exsudato, como descrito anteriormente (DESMONTS e REMINGTON, 1980). Os lavados foram separados e submetidos a centrifugação.

### ***4.6.2. Obtenção de taquizoítos por centrifugação***

Os lavados peritoneais obtidos foram analisados em microscópio óptico e aqueles que apresentavam somente taquizoítos foram separados para serem utilizados em volume completo, ou seja, puro. Os demais foram homogeneizados e submetidos a um esquema de centrifugação, com rotação variável. Iniciou-se com centrifugação da suspensão de células e taquizoítos a 65g por cinco minutos. Pipetou-se o sobrenadante, onde se encontravam os taquizoítos, para outro tubo de centrífuga. O sedimento foi desprezado. O sobrenadante foi centrifugado novamente, a 440g por 20 minutos, pipetando-se o mesmo para outro tubo. O sedimento obtido foi ressuspenso em solução salina 0,95%, e centrifugado a 260g por dez minutos. O sobrenadante foi acondicionado em tubo de centrífuga, para posterior inativação, desprezando-se o sedimento.

### ***4.6.3. Inativação do antígeno pela formalina (AF)***

Adicionou-se volume a volume solução de formalina-12% (formaldeído-6%), diluída em SST 0,01M pH 7,2, à suspensão com parasitas, incubando-se

*overnight*, em temperatura ambiente. No dia seguinte, centrifugou-se a 600g por 10 minutos e, o sedimento, foi ressuspendido em 50ml SST 0,01M pH 7,2. O processo foi repetido mais duas vezes, para remover todo o formaldeído, e finalmente ressuspendido em solução tampão borato pH 8,7. A suspensão final foi conservada a 4°C (DESMONTS e REMINGTON, 1980). A diluição de uso do antígeno foi determinada pelo teste de várias diluições frente a soros controle positivos e negativos.

#### ***4.6.4. Inativação do antígeno pelo metanol (AM)***

O antígeno fora adicionado de metanol PA na concentração final de 25%, como descrito por Silva (2007), como segue. Centrifugou-se a solução rica em antígeno a 700g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 150 ml de SST 0,01M pH 7,2, contendo 3ml de tripsina 2,5% e 4000U de heparina sódica, para romper todas as células remanescentes. Incubou-se a solução em estufa a 37°C sob agitação constante por 30 minutos. Centrifugou-se a 1500g por 15 minutos. Lavou-se duas vezes em SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1% a 700g por 15 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em 120 ml SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1% sob agitação constante em temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se rapidamente 40 ml de metanol, de modo que a concentração final ficasse em 25% de metanol, e manteve-se sob agitação por 15 minutos em temperatura ambiente. Após, incubou-se a solução em erlenmeyer de 250 ml, sob repouso, a 4°C por 36 horas. Após a incubação, centrifugou-se o sedimento a 4000g por 30 minutos, desprezou-se o sobrenadante, e o sedimento foi ressuspendido em 10 ml de SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1%, sendo então centrifugado a 4000g por 10 minutos. Repetiu-se este procedimento por duas vezes. Ressuspendeu-se o sedimento final com 20 a 30 ml de SST 0,01M pH 7,2 contendo albumina bovina 1% e azida sódica 0,15% (NaN<sub>3</sub>), sendo estocado a 4°C até o momento da utilização. A diluição de uso do antígeno foi determinada pelo teste de várias diluições frente a soros controle positivos e negativos.

#### **4.6.5. Provas sorológicas**

##### **4.6.5.1. Diluição dos soros**

Em microplacas distribuiu-se 150 µL de solução salina tamponada de fosfatos (SSTF) pH 7.2 em cavidades de acordo com o número de amostras a serem testadas, neste caso até 1:16384. Adicionou-se 10µL do soro a ser testado na primeira cavidade na proporção de 1:16. Transferiu-se 50µL do soro diluído da primeira cavidade para a segunda, homogeneizando-se, repetindo-se esta operação até a sexta cavidade, desprezando-se 50µL da última cavidade (diluições 1:64, 1:256, 1:1024, 1:4096, 1:16384). O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra de soro sabidamente positiva (controle positivo) e outra sabidamente negativa (controle negativo). Em provas separadas, as amostras de soro foram testadas frente ao antígeno inativado pela formalina e pelo metanol.

##### **4.6.5.2. Técnica de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pelo metanol (MAD-AM)**

Das amostras de soro previamente diluídas em microplacas de fundo chato, foram transferidos 50 µl de cada diluição do soro (1:16, 1:64 até 1:16384) para as respectivas cavidades de microplacas com fundo em “V”, e 50 µl de 2- mercaptoetanol 0,2M, diluído em solução tampão borato pH 8,97 (MAD-AM), e 50 µl do antígeno, diluído em solução tampão borato pH 8,97, foram adicionados às cavidades. As placas foram seladas com filme plástico, homogeneizadas por um minuto e incubadas a temperatura de 30°C, *overnight* procedendo-se a leitura com interpretação dos resultados.

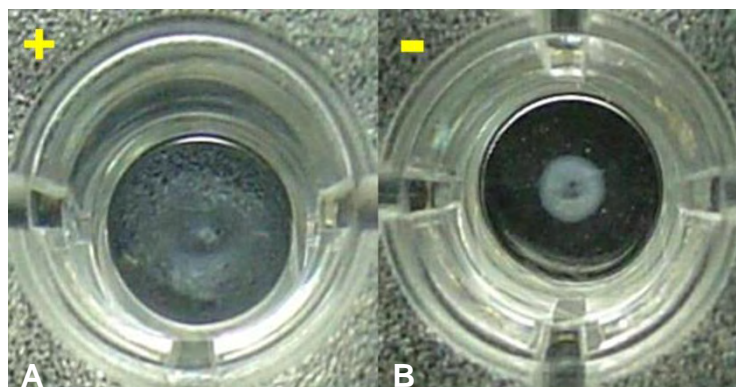
##### **4.6.5.3. Técnica de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pela formalina (MAD-AF)**

As amostras de soro foram diluídas em microplacas de fundo chato, transferindo-se 25 µl de cada diluição do soro (1:16, 1:64 até 1:65536) para as respectivas cavidades de microplacas com fundo em “V”, e 25 µl de 2- mercaptoetanol 0,2M diluído em SST 0,01M pH 7,2, e 50 µl do antígeno diluído em solução tampão borato pH 8,7 foram adicionados às cavidades. As placas foram seladas com filme plástico, homogeneizadas por um minuto e incubadas

a temperatura ambiente, *overnight*, no caso do antígeno inativado pela formalina (DESMONTS e REMINGTON, 1980) procedendo-se a leitura com interpretação dos resultados.

#### 4.6.5.4. Leitura

A leitura foi realizada com a sobreposição da placa sobre um fundo escuro, sendo consideradas positivas aquelas diluições dos soros em que se formava uma película que cobria pelo menos 50% da cavidade, e negativas quando se formava botão ou anel no fundo da cavidade (Figura 3).



**Figura 3.** Técnica de aglutinação direta modificada (MAD). Reação positiva (A) e negativa (B). Botucatu, SP, 2010.

### 4.7. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (CAMARGO, 1974)

#### 4.7.1. Produção de antígeno para Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A solução antigênica foi obtida de lavados intraperitoneais realizados em camundongos previamente inoculados, via intraperitoneal com suspensão contendo taquizoítos da cepa RH (DESMONTS e REMINGTON, 1980). Este exsudato, rico em taquizoítos, foi homogeneizado volume/volume em solução de formalina a 2%, obtendo-se uma suspensão final a 1%. Foi incubada a 37°C por 30 minutos, agitando-se suavemente por inversão dos tubos, a cada 10 minutos, com posterior centrifugação a 1600 x g por 5 minutos. Após, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 2 mL de solução salina tamponada de fosfatos (SSTF) pH 7.2, centrifugando-se, como anteriormente. Este procedimento foi repetido por duas a três vezes até a

obtenção de 20 a 30 parasitos/campo, utilizando-se microscópio com aumento de 40 vezes para a leitura, para examinar 50µL da suspensão final, entre lâmina e lamínula.

#### ***4.7.2. Confeção das lâminas de imunofluorescência***

Para fixação do antígeno em lâminas utilizadas na prova sorológica, pipetou-se 10µL da suspensão antigênica nas delimitações de lâminas adequadas para esta finalidade. Aspirou-se o excesso em seguida, restando apenas uma fina película, que posteriormente foi secada à temperatura ambiente. As lâminas assim preparadas foram mantidas em laminários, em freezer a -20°C, até o momento de sua utilização.

#### ***4.7.3. Prova Sorológica***

##### ***4.7.3.1. Diluição dos soros***

Em microplacas distribuiu-se 150µL de SSTF pH 7.2 em cavidades de acordo com o número de amostras a serem testadas. Adicionou-se 10µL do soro a ser testado na primeira cavidade na proporção de 1:16. Transferiu-se 50µL do soro diluído da primeira cavidade para a segunda, homogeneizando-se, repetindo-se esta operação até a sexta cavidade, desprezando-se 50µL da última cavidade (diluições 1:64, 1:256, 1:1024, 1:4096, 1:16384). O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra de soro sabidamente positiva (controle positivo) e outra sabidamente negativa (controle negativo).

##### ***4.7.3.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)***

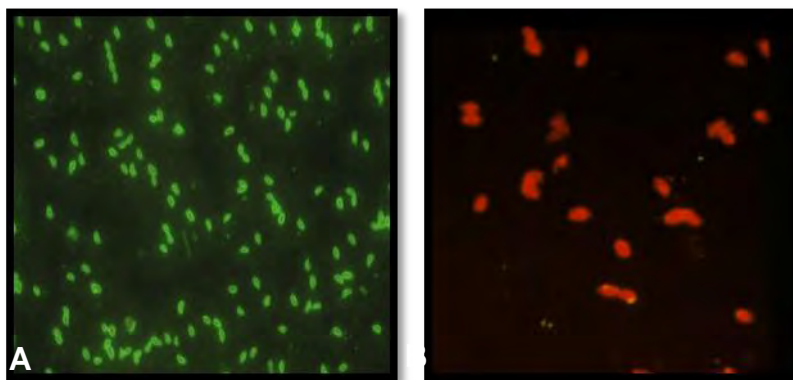
A pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-*T.gondii* foi realizada segundo metodologia descrita por Camargo (1974).

Na lâmina fixada com o antígeno, distribuiu-se 10µL de cada diluição do soro nos orifícios de acordo com protocolo previamente determinado. Incubaram-se as lâminas à 37 °C em câmara úmida por 30 minutos, em seguida foram lavadas duas vezes com SSTF pH 7.2, deixando-as em imersão por 10 minutos cada lavagem. A seguir foram secadas e coradas. Procedeu-se a diluição do conjugado anti-IgG/anti-IgM ovino-FITC (Bethyl®), em solução de

azul de Evans a 20mg% diluída em SSTF pH 7.2 na proporção 1:5. Esta solução preparada com o conjugado diluído em solução de azul de Evans foi distribuída em todos os orifícios da lâmina tratada com o soro, colocando-se 10µL da solução. Novamente a lâmina foi incubada e lavada, como descrito anteriormente. Depois de seca, colocou-se duas gotas de glicerina, cobrindo-se com lamínula 24 x 60 x 0,18 mm, estando pronta para a leitura.

#### 4.7.3.3. *Leitura*

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência (Zeiss SH250, Zeiss®) com sistema de filtros para fluorescência e lâmpada de mercúrio de 100V, com objetiva de aumento de 40 vezes e ocular de aumento de 10 vezes. Considerando-se positiva a maior diluição do soro em que ainda havia fluorescência completa na borda de pelo menos 50% dos taquizoítos. A ausência de fluorescência ou apenas na extremidade dos parasitas foi considerada como reação negativa (Figura 4).



**Figura 4.** Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI). Reação positiva (A) e negativa (B).

## 4.8. Pesquisa de oocistos

### 4.8.1. *Técnica de flutuação em sulfato de zinco*

Pesou-se três gramas de solo e misturou-se diretamente com a solução de flutuação de sulfato de zinco a 33%. A mistura (solo e solução de flutuação) foi passada por uma camada dupla de gaze. A seguir o conteúdo foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL até atingir o menisco reverso e uma

lamínula 22 x 22 foi adicionada, submeteu-se a centrifugação a 650 g por cinco minutos. A lamínula foi então removida do topo do tubo, colocada na lâmina e examinada.

#### ***4.8.2. Leitura***

Procedeu-se a leitura em microscópio óptico comum, com objetiva de 40 vezes, percorrendo-se toda a lâmina.

### **4.9. Procedimentos de biologia molecular**

#### ***4.9.1. Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de PCR para *T. gondii* em amostras de leite de ovelhas***

Para a determinação do limite mínimo de detecção foram utilizadas amostras de água ultra-pura e de leite de ovelhas contaminadas experimentalmente com uma suspensão de  $1,0 \times 10^5$  taquizoítos (cepa RH) por mL, contados em câmara de Neubauer. Realizou-se diluições seriadas com PBS 7,2 estéril nas concentrações aproximadas de  $1,0 \times 10^4$ ,  $1,0 \times 10^3$ ,  $1,0 \times 10^2$ ,  $1,0 \times 10^1$ ,  $1,0 \times 10^0$ , por mL, para as amostras de água e  $1,0 \times 10^3$ ,  $1,0 \times 10^2$ ,  $1,0 \times 10^1$ ,  $1,0 \times 10^0$ , por mL, para as amostras de leite. Posteriormente, realizou-se a extração de DNA dessas amostras.

#### ***4.9.2. Extração de DNA***

Para realização das extrações de DNA dos controles positivos e das 138 amostras de leite, obtidas durante o experimento, utilizou-se kit comercial Illustra Genomic Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin (GE-Healthcare), como descrito a seguir. Pipetou-se 200  $\mu$ L de cada amostra leite em microtubo estéril livre de DNase e RNase, acrescentou-se 50  $\mu$ L de solução de lise 1 e 10  $\mu$ L de proteinase K (20mg/ml). Agitou-se em vórtex por 15 segundos e incubou-se a 56°C por uma hora. Centrifugou-se a 2000 g por 10 segundos e foi acrescentado 5  $\mu$ l de RNase e 500  $\mu$ l de solução de lise 2. Agitou-se em vórtex por 15 segundos e manteve-se em temperatura ambiente por 10 minutos. Aplicou-se a amostra na coluna do tubo coletor. Prosseguiu-se com a centrifugação a 11000 g por 1 minuto. Adicionou-se novamente solução de lise 2 e centrifugou-se

novamente a 11000 g por 1 minuto. Acrescentou-se 500 µl de tampão de lavagem. Centrifugou-se a 11000 g por 3 minutos. Descartou-se o tubo coletor e colocou-se a coluna em microtubo estéril. Acrescentou-se 200 µl de tampão de eluição e centrifugou-se a 11000 g por 1 minuto. A solução permaneceu em geladeira por 24 horas para estabilização e a seguir foi procedida a quantificação do DNA.

#### **4.9.3. Quantificação de DNA**

A quantificação foi avaliada em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) que utiliza pequenos volumes das amostras com acurácia, reprodutibilidade e economia de reagentes.

#### **4.9.4. Amplificação do DNA**

A reação em cadeia pela polimerase para a detecção de DNA de *T. gondii* no leite foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos TOX4, com sequência de bases 5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3' e TOX5 com sequência de bases 5'CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT3', segundo descrito por Homan et al. (2000), amplificando uma região de 529 pares de base (pb).

Para a amplificação, cada tubo de reação de 0,2mL com volume total de 25µL contendo tampão de reação (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0.), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), solução de desoxinucleotídeos (0,2 mM), 10ρM de cada oligonucleotídeos TOX4 e TOX5 (10µM/µL - prodimol), 0,2U/µL de *taq-polimerase platinum* (Invitrogen). O volume da reação foi corrigido com água ultrapura para 23 µL e adicionados 2 □L de DNA (10ng/µL). A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), em 35 ciclos onde consistiu na desnaturação, anelamento e extensão e um ciclo final para completar a extensão dos amplicons (Quadro 1).

Quadro 1. Etapas da amplificação das regiões codificadoras dos oligonucleotídeos utilizados na detecção (TOX4 e TOX5) de *T. gondii*. Botucatu, SP, 2010.

Etapas	Número de ciclos	Período (minutos)	Temperatura (°C)
Desnaturação	1	7	94
Anelamento		1	60
Extensão		1	72
Desnaturação	34	1	94
Anelamento		1	60
Extensão		1	72
Extensão final	1	10	72

#### ***4.9.5. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados na PCR***

Foi preparado gel de agarose a 2% adicionado de 1,0 $\mu$ L/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). Foram utilizados 8 $\mu$ L do material amplificado e como marcador de peso molecular 4  $\mu$ L de 100pb ladder (Invitrogen). Para todas as amostras foram acrescentados 2  $\mu$ L do tampão de corrida (0,25% azul de bromophenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal HE99 (GE-Healthcare) contendo TBE 1X (0,1m Tris, 0,09m ácido bórico e 0,001m EDTA) e a voltagem empregada foi 100 V por 90 minutos utilizando a fonte Electrophoresis Power Supply Model EPS 301 (GE Healthcare). O gel foi visualizado em transiluminador de luz UV e a imagem capturada pelo sistema GelDoc-It™ Imaging System foi fotodocumentada utilizando-se o software Vision Works@LS.

#### ***4.9.6. Controles***

Para cada sequência de extração e PCR de leite foram utilizados controles positivo e negativo. Para o leite utilizou-se como controle positivo amostras de leite de ratas contaminadas com *T.gondii*, na concentração de 2,0

x 10<sup>2</sup> taquizoítos/mL. Como controle negativo utilizou-se água ultra-pura para todas as amostras testadas.

#### **4.9.7. Sequenciamento**

Realizou-se o sequenciamento dos produtos amplificados obtidos nas reações PCR, sendo realizada a purificação destes produtos empregando-se um kit comercial Illustra GFX™-PCR-DNA and Gel-Band Purification (GE-Healthcare).

O sequenciamento foi realizado para confirmar a identidade dos produtos amplificados obtidos pela PCR, comparando-se com sequências já definidas depositadas na base de dados do genBank. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo Centro de Estudos do Genoma Humano/USP, em sequenciador automático MegaBace™ 1000 (GE-Healthcare) empregando-se o kit DYEnamicET Dye Terminator Cycle Sequencing com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase (GE-Healthcare) e analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. As sequências *sense* e *antisense* obtidas foram visualizadas pelo software Chromas 2.3, na forma de eletroferograma, alinhadas pelo programa MEGA4, submetidas ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados.

#### **4.10. Análise estatística**

Para efeito de análise, os títulos de anticorpos obtidos pelos diferentes métodos de detecção foram adicionados do valor 1 e a seguir calculou-se o log correspondente. Este valor foi utilizado para se calcular a área sobre a curva (ASC) para cada animal, calculando-se a seguir a média e o desvio-padrão para cada teste. As ASC da RIFI-IgG e da MAD-AF foram comparadas pelo teste t de Student. A correlação entre os resultados de RIFI-IgG e MAD-AF, e de RIFI-IgM e MAD-AC foi verificada pelo teste de Spearman.

Os resultados de detecção de DNA de *T. gondii* foram comparados com o título de anticorpos em cada um dos testes pelo teste G.

Os mesmos resultados dos testes de detecção de anticorpos foram comparados com os resultados da detecção de DNA considerando-se como

ponto de corte para a RIFI-IgG e para a MAD-AF o título 64, e para a RIFI-IgM para a MAD-AC o título 16.

Para todos os cálculos foram considerados significativos os valores de P menores que 0,05.

# *R*esultados

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Animais experimentais

Nenhum indício clínico de toxoplasmose foi evidenciado nas ovelhas do grupo sorologicamente positivo (grupo 1) para *T. gondii*, durante o período de 12 meses de acompanhamento dos animais. Durante o período experimental as ovelhas de ambos os grupos (grupo 1 e grupo 2) foram desafiadas naturalmente por outros agentes patogênicos, como actinobacilose no mês de abril de 2008, o ectima contagioso nos meses de junho e julho de 2008 e hemoncose no período final da gestação e início da lactação. As três enfermidades que atingiram o rebanho promoveram emagrecimento dos animais, e o tratamento preconizado para cada uma dessas doenças foi instituído. Ressalta-se que são animais criados a condições de campo, sujeitos a desafios constantes por outros agentes patogênicos.

Durante a triagem para definição dos grupos experimentais, priorizou-se a utilização de animais positivos com títulos sorológicos iguais ou maiores que 64. Porém quatro ovelhas do grupo soropositivo para *T. gondii*, acometidas pela actinobacilose foram eutanasiadas, e ovelhas com títulos 16 foram utilizadas para compor o grupo de 20 animais soropositivos. No Núcleo de Pesquisa em Zoonoses, adota-se o título 16 como positividade para a infecção toxoplásmica.

As ovelhas foram submetidas à monta natural, no mês de março e não foi realizado diagnóstico de prenhez das mesmas. Do grupo com diagnóstico de infecção, quatro ovelhas não emprenharam (ovelhas: 371, 372, 401, 511), o mesmo número foi observado no grupo soronegativo (ovelhas: 319, 364, 410, 495), não sendo possível a coleta de leite destes animais. Não foram observados, durante o estudo, casos de aborto. Dos grupos experimentais, uma ovelha prenhe (ovelha 452) do grupo 1 não entrou em lactação por morte do cordeiro. A desmama ocorreu no segundo mês de vida dos cordeiros.

Os animais soronegativos (grupo 2), não soroconverteram durante o período do experimento, pois nenhum título foi detectado pelas diferentes técnicas sorológicas empregadas no estudo.

Não foi detectado oocistos nas amostras de solo, pelo método de flutuação em sulfato de zinco.

## 5.2. Provas Sorológicas

Para definição dos grupos sorológicos, utilizou-se a técnica de aglutinação direta modificada com antígeno fixado pela formalina como prova de triagem. No primeiro momento do experimento ficou estabelecida a seguinte distribuição: nove ovelhas com título inicial de 1:1024, uma ovelha com título de 1:256, duas ovelhas com título 1:64 e oito ovelhas com título 1:16.

**Tabela 3.** Identificação das ovelhas, pertencentes ao grupo 1 (sorologia positiva) com distribuição inicial dos títulos de seus anticorpos anti- *T. gondii* e grupo 2 (sorologia negativa), pela técnica de aglutinação direta modificada com antígeno fixado pela formalina (MAD-AF).

Grupo 1: ovelhas sorologicamente positivas					Grupo 2: ovelhas sorologicamente negativas	
Animal	16	64	256	1024	Animal	
185	x				266	
219				x	293	
361				x	297	
371		x			319	
372	x				338	
381	x				349	
393				x	353	
401			x		364	
404		x			380	
440	x				389	
450	x				410	
452				x	439	
476	x				453	
480				x	456	
482				x	467	
503	x				475	
510				x	483	
511	x				495	
520				x	519	
530				x	523	

Os resultados dos exames sorológicos pela MAD-AF, RIFI-IgG, MAD-AM, RIFI-IgM, são apresentados na tabela 4, tabela 5, tabela 6 e tabela 7, respectivamente, indicando o título sorológico individual do grupo 1, coleta de amostra de leite e encontro do DNA do parasito, nos diferentes momentos de coleta de amostras.

A comparação entre os testes sorológicos dos animais do grupo 1 em um mesmo momento é demonstrada na tabela 8. Pelo teste t de Student, não houve diferença significativa entre MAD-AM e RIFI IgM, porém pelo mesmo teste, constatou-se diferença significativa entre MAD-AF e RIFI IgG, observando uma maior sensibilidade do MAD. A figura 5 demonstra graficamente os mesmos dados indicando a média em log dos títulos do grupo soropositivo, pelas diferentes provas sorológicas, nos diferentes momentos de coleta das amostras. Ainda, nesta figura observam-se oscilações nos títulos sorológicos durante os diferentes momentos, embora a média dos títulos da última coleta seja inferior a média dos títulos da primeira coleta.

A correlação entre as provas sorológicas MAD-AF e RIFI IgG e MAD-AM e RIFI IgM é demonstrada na tabela 9, observando-se correlações altas e positivas entre as variáveis estudadas conjunta e graficamente. Correlações altas e positivas, com r próximo do valor 1. A representação gráfica entre as variáveis MAD-AF x RIFI IgG, observadas na figura 6, e MAD-AM x RIFI IgM, observadas na figura 7, mostram uma dispersão proporcional entre X e Y.

Para interpretação dos resultados sorológicos obtidos pela MAD-AM e MAD-AF, para diferenciação entre os estágios agudo e crônico da infecção por toxoplasmose, utilizou-se o quadro adaptado, proposto por Montoya et al (2007), onde cruza-se título sorológico obtido na MAD-AM (eixo x) com o título obtido na MAD-AF (eixo y), obtendo-se o quadrante correspondente ao estágio da infecção: crônico, ambíguo e agudo (Figura 8). Aplicando-se os resultados sorológicos do grupo 1, obtidos pelo MAD-AF e MAD-AM (apresentados anteriormente nas tabelas 4 e 6) no quadro, todos os animais apresentam-se no estágio crônico da infecção.

**Tabela 4.** Datas das coletas de leite das ovelhas, com seus respectivos títulos sorológicos pelo método da aglutinação direta modificada com antígeno fixado pela formalina, e encontro do DNA do *T. gondii* no leite. Botucatu, SP, 2010.

Coleta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Animal	11/3/08	25/3/08	8/4/08	22/4/08	6/5/08	20/5/08	3/6/08	17/6/08	1/7/08	15/7/08	29/7/08	12/8/08	26/8/08	9/9/08	23/9/08	7/10/08	21/10/08	4/11/08	18/11/09	2/12/09	16/12/09	30/12/09	13/1/09	27/1/09	10/2/09	24/2/09	
185	16	16	16	16	0	0	0	0	16	16	16	16	0	16	0	0	16	0	16	16	16	16	16	16	16	0	0
219	1024	1024	4096	4096	1024	1024	1024	256	256	256	1024	1024	256	256	256	64	64	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	
361	1024	1024	1024	1024	1024	1024	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	256	64	
371	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	16	16	64	64	64	64	64	64	64	64	16	16	
372	16	16	16	16	0	16	16	0	16	16	16	16	16	16	0	16	16	16	16	16	16	16	16	0	0	0	
381	16	16	16	16	16	16	0	0	16	16	16	16	16	0	0	0	16	16	16	16	16	0	16	0	16	0	
393	1024	1024	1024	1024	256	256	64	64	256	256	256	256	64	64	16	16	64	256	256	256	64	64	64	64	64	64	
401	256	256	256	256	256	256	64	64	256	256	256	256	64	64	64	64	64	256	1024	256	256	256	256	64	64	16	
404	64	64	256	256	64	64	64	64	256	64	64	64	64	64	64	64	64	16	64	256	64	64	256	256	64	64	
440	16	16	16	16	0	0	0	0	16	16	0	16	0	0	0	0	16	16	16	16	16	16	0	0	0	0	
450	16	16	64	16	0	16	0	0	16	16	0	16	16	16	0	0	16	0	16	16	16	16	16	16	0	0	
452	1024	1024	1024	1024	256	256	256	64	256	64	64	64	64	256	64	64	64	256	256	256	256	256	256	256	64	64	
476	16	16	16	16	0	0	16	0	16	16	16	16	16	0	0	0	0	0	16	16	16	16	0	16	0	0	
480	1024	1024	1024	1024	256	1024	256	256	256	256	1024	1024	256	256	256	256	256	256	1024	256	256	256	256	256	256	64	
482	1024	1024	1024	256	256	256	256	256	256	256	256	256	64	256	64	16	64	256	256	256	256	256	256	256	64	64	
503	16	16	16	16	0	16	0	0	16	16	16	16	16	0	0	0	16	16	16	16	16	16	16	16	0	0	
510	1024	1024	1024	4096	4096	4096	1024	1024	1024	1024	1024	1024	256	256	1024	256	256	256	256	256	256	256	256	256	64	64	
511	16	16	16	16	16	16	0	0	16	16	16	16	16	0	0	0	0	16	16	16	16	0	0	0	0	16	
520	1024	1024	1024	1024	256	1024	256	256	256	256	256	256	256	256	256	64	256	4096	1024	1024	1024	1024	256	1024	256	256	
530	1024	1024	1024	1024	1024	1024	256	256	1024	256	256	256	256	256	256	256	256	1024	1024	1024	1024	256	256	256	256	256	

Coleta de Leite

Deteção molecular do DNA de *T. gondii* no leite

**Tabela 5.** Datas das coletas de leite das ovelhas, com seus respectivos títulos sorológicos pela reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG, e encontro do DNA do *T. gondii* no leite. Botucatu, SP, 2010.

Coleta:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Animal	11/3/08	25/3/08	8/4/08	22/4/08	6/5/08	20/5/08	3/6/08	17/6/08	1/7/08	15/7/08	29/7/08	12/8/08	26/8/08	9/9/08	23/9/08	7/10/08	21/10/08	4/11/08	18/11/09	2/12/09	16/12/09	30/12/09	13/1/09	27/1/09	10/2/09	24/2/09	
185	16	16	0	0	0	16	0	0	0	0	16	16	0	0	0	0	0	0	16	16	16	16	16	16	16	16	0
219	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	64	64	64	64	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256
361	1024	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	64	256	64	256	256	256	256	1024	1024	256	256	256	256	256	64
371	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	16	64	16	16	64	64	64	64	64	64	64	64	64	16	16
372	16	16	16	0	0	16	16	0	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	16	0	0	0	0	0	0
381	16	16	16	16	16	16	16	0	0	16	16	16	0	0	0	0	16	16	16	16	16	0	0	16	16	16	0
393	256	256	256	256	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	16	64	64	256	64	64	64	64	64	64	64	16
401	64	64	64	64	64	64	64	64	256	256	64	256	64	64	64	64	64	64	256	64	64	64	64	64	64	64	16
404	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	16
440	16	16	16	0	0	0	16	16	0	0	0	16	0	0	0	0	16	16	16	16	16	0	0	0	0	0	0
450	16	16	16	0	0	16	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	16	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0
452	256	256	256	256	256	256	256	64	256	64	64	64	64	64	64	64	64	256	256	256	256	256	64	256	256	64	64
476	16	16	0	0	16	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	16	0	0	16	0	0	0	0	0	0
480	256	256	256	1024	256	256	256	256	256	1024	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	1024	256	256	256	256	64	64
482	256	256	256	256	256	256	256	256	16	16	64	64	64	16	64	16	64	256	256	256	256	256	256	256	256	64	64
503	16	16	0	0	0	16	0	0	16	16	0	0	0	0	0	0	16	0	16	16	16	16	16	16	16	0	0
510	1024	256	256	1024	1024	256	256	256	1024	256	256	256	256	256	256	64	64	64	256	64	64	64	64	64	64	64	64
511	16	16	16	16	16	16	0	0	16	16	0	0	0	0	0	0	0	1024	1024	1024	1024	256	256	256	256	256	64
520	1024	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	64	64	64	64	1024	1024	1024	1024	256	256	256	256	256	64
530	1024	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	64	64	64	64	1024	1024	1024	256	256	256	256	256	64	64

Coleta de Leite

Deteção molecular do DNA de *T. gondii* no leite

**Tabela 6.** Datas das coletas de leite das ovelhas, com seus respectivos títulos sorológicos pelo método da aglutinação direta modificada com antígeno fixado pelo metanol, e encontro do DNA de *T. gondii* no leite. Botucatu, SP, 2010.

Coleta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Animal	11/3/08	25/3/08	8/4/08	22/4/08	6/5/08	20/5/08	3/6/08	17/6/08	1/7/08	15/7/08	29/7/08	12/8/08	26/8/08	9/9/08	23/9/08	7/10/08	21/10/08	4/11/08	18/11/09	2/12/09	16/12/09	30/12/09	13/1/09	27/1/09	10/2/09	24/2/09	
185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
219	16	16	16	16	16	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
361	16	16	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
371	16	16	0	0	16	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
372	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
381	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
393	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
401	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0	0	0	0	0	0	0	16	0	16	0	0	0	0	0	16	0
404	64	64	64	64	16	16	64	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
452	64	16	16	16	16	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480	16	16	16	0	0	16	16	0	16	16	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
482	16	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	16	0	16	0	0	0	0	0	0	0
503	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
510	64	64	64	64	64	64	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
511	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
520	64	16	16	16	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0
530	64	64	64	16	64	16	16	16	16	16	0	16	0	0	16	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Coleta de Leite

Deteção molecular do DNA de *T. gondii* no leite

**Tabela 7.** Datas das coletas de leite das ovelhas, com seus respectivos títulos sorológicos pela reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgM, e encontro do DNA do *T. gondii* no leite. Botucatu, SP, 2010.

Coleta:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Animal	11/3/08	25/3/08	8/4/08	22/4/08	6/5/08	20/5/08	3/6/08	17/6/08	1/7/08	15/7/08	29/7/08	12/8/08	26/8/08	9/9/08	23/9/08	7/10/08	21/10/08	4/11/08	18/11/09	2/12/09	16/12/09	30/12/09	13/1/09	27/1/09	10/2/09	24/2/09	
185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
219	16	0	0	0	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
361	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
371	16	0	0	0	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
372	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
381	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
393	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
401	16	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
404	16	64	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
452	16	0	0	0	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480	16	0	0	0	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
482	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
503	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
510	16	16	64	64	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
511	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
520	16	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
530	64	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16



Coleta de Leite

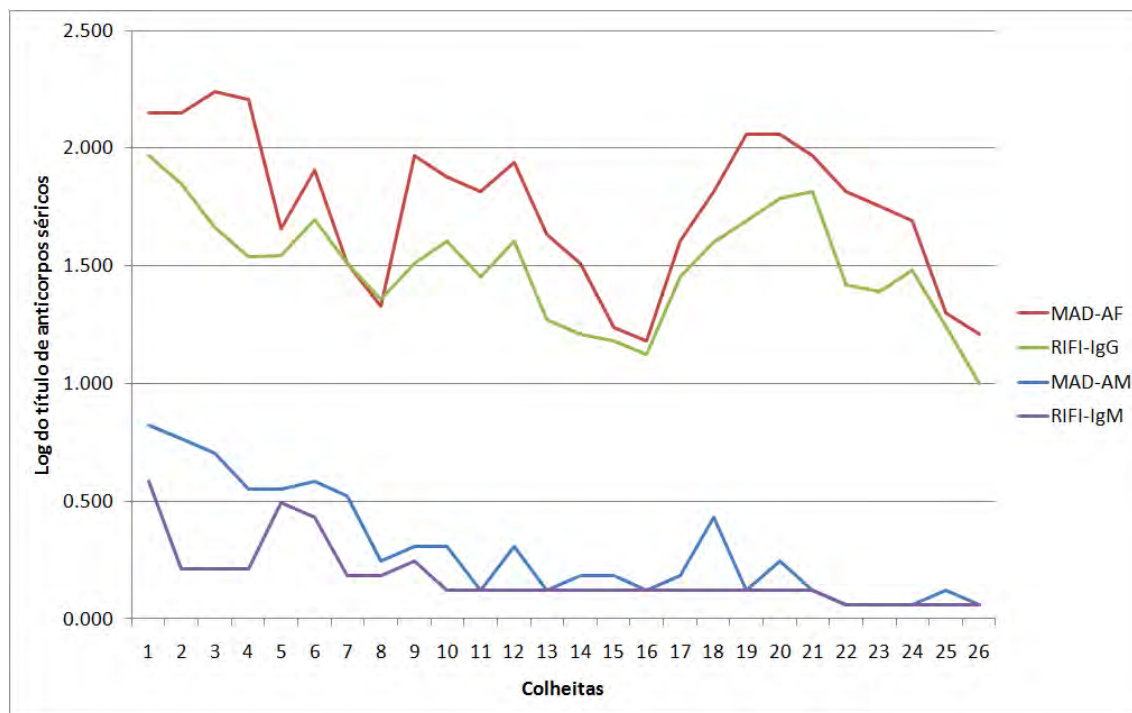


Detecção molecular do DNA de *T. gondii* no leite

**Tabela 8.** Média  $\pm$  desvio-padrão das áreas sobre a curva (AUC) para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ovelhas pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pela formalina (MAD-AF) ou etanol (MAD-AM), e reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG) e IgM (RIFI-IgM). Botucatu, SP, 2010.

<b>Teste</b>	<b>AUC (Média <math>\pm</math> Desvio-padrão)</b>
MAD-AF	1.753 <sup>b</sup> $\pm$ 0.320
RIFI-IgG	1.499 <sup>a</sup> $\pm$ 0.237
MAD-AM	0.303 $\pm$ 0.235
RIFI-IgM	0.175 $\pm$ 0.132

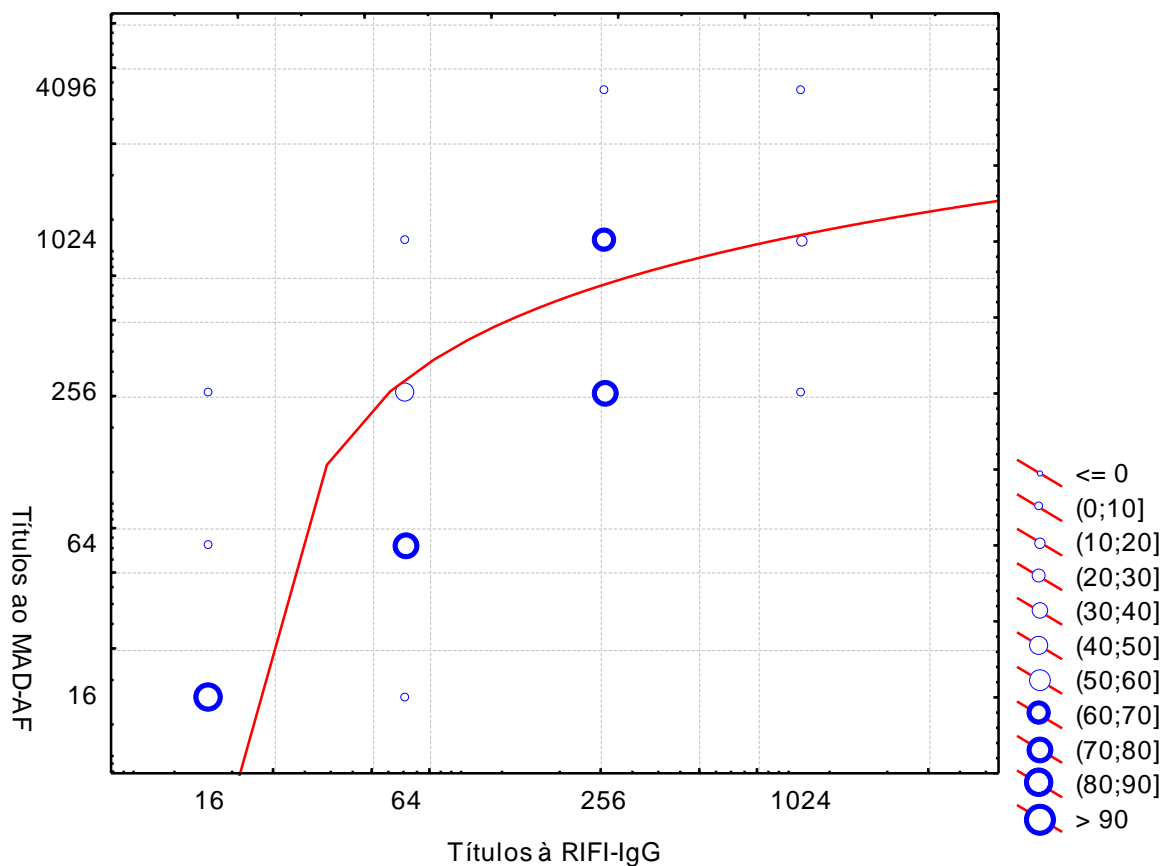
**Estatística:** para os testes MAD-AF e RIFI-IgG, valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste t de Student.



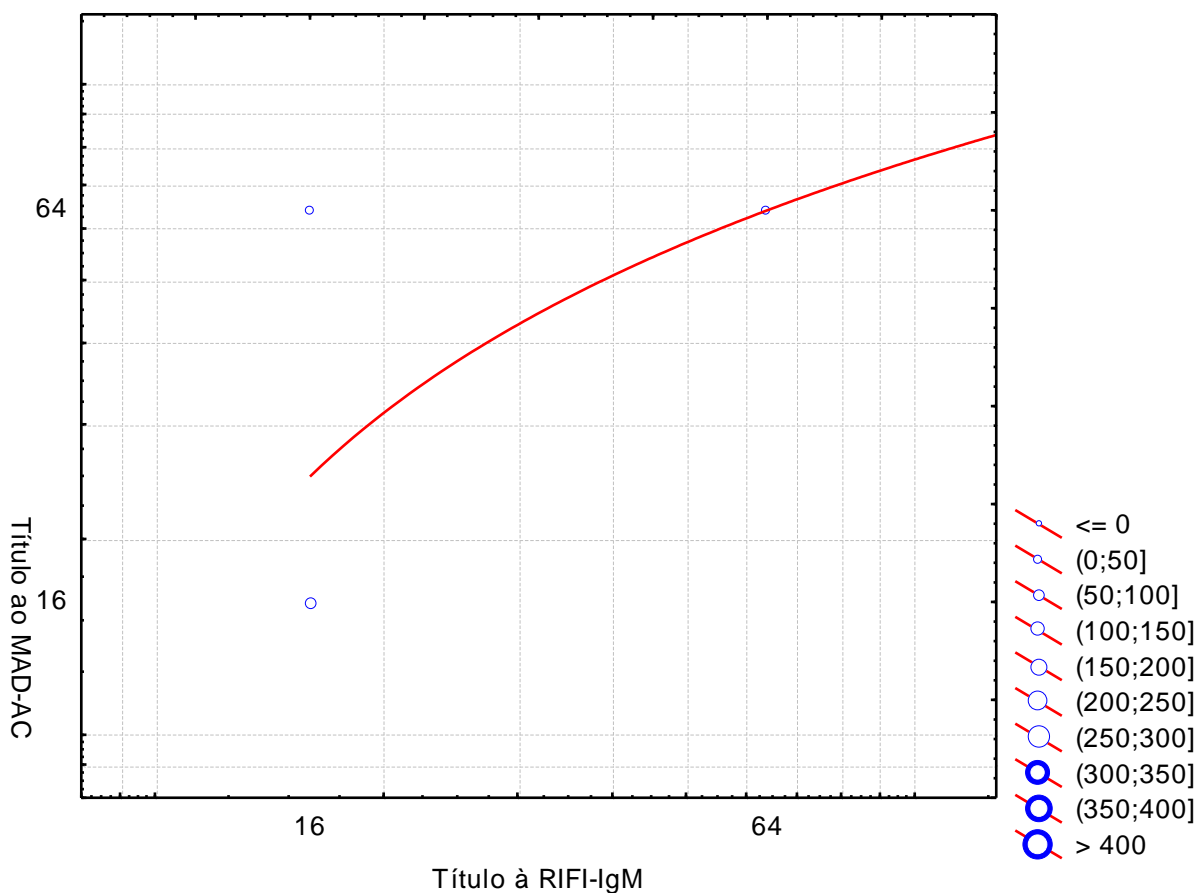
**Figura 5.** Cinética de anticorpos séricos (média) anti-*T. gondii* em ovelhas, verificados pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pela formalina (MAD-AF) ou etanol (MAD-AM), e reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG) e IgM (RIFI-IgM). Botucatu, SP, 2010.

**Tabela 9.** Número de pares, teste t, coeficiente de correlação (r) e valor de P, pelo teste de Spearman, para as comparações entre os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* detectados pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pela formalina (MAD-AF) X reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG), e pelo método de aglutinação direta com antígenos fixados pelo etanol (MAD-AM) X IgM (RIFI-IgM). Botucatu, SP, 2010.

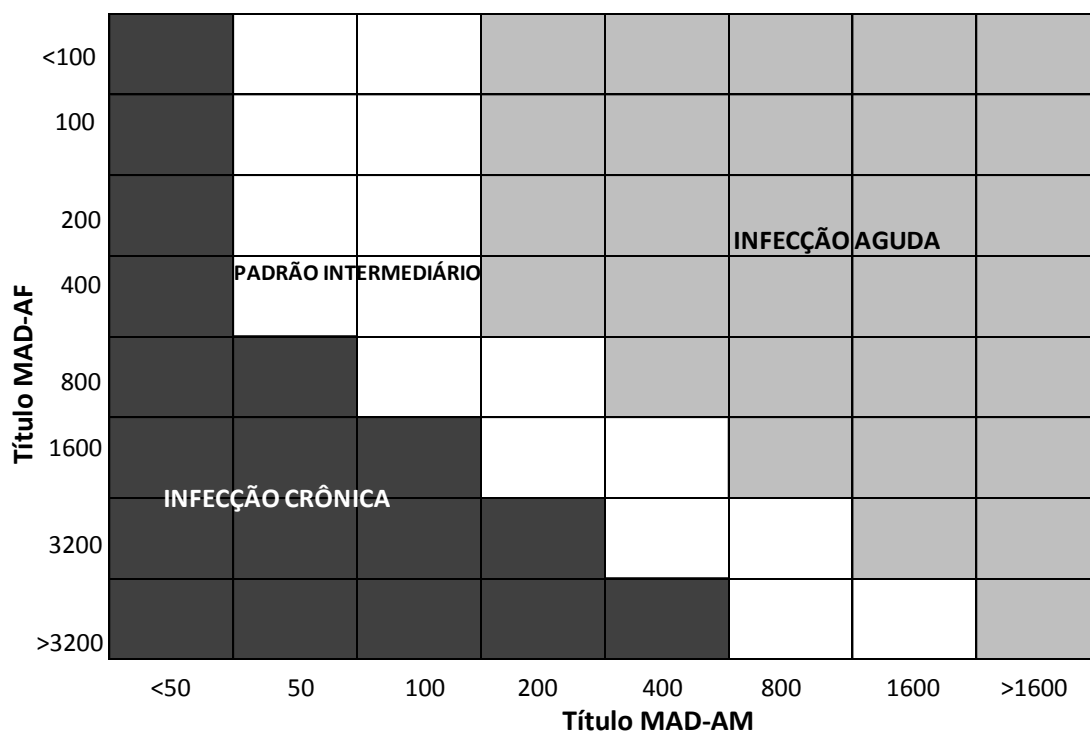
Métodos avaliados	Número de pares	Teste t	r	Valor de P
MAD-AF x RIFI-IgG	520	53,512	0,920	<0,0001
MAD-AC x RIFI-IgM	520	24,817	0,738	<0,0001



**Figura 6.** Frequência de títulos de anticorpos anti-*T. gondii* detectados pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pela formalina (MAD-AF) X reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG). Botucatu, SP, 2010.



**Figura 7.** Frequência de títulos de anticorpos anti-*T. gondii* detectados pelos métodos de aglutinação direta com antígenos fixados pelo etanol (MAD-AC) X reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgM (RIFI-IgM). Botucatu, SP, 2010.

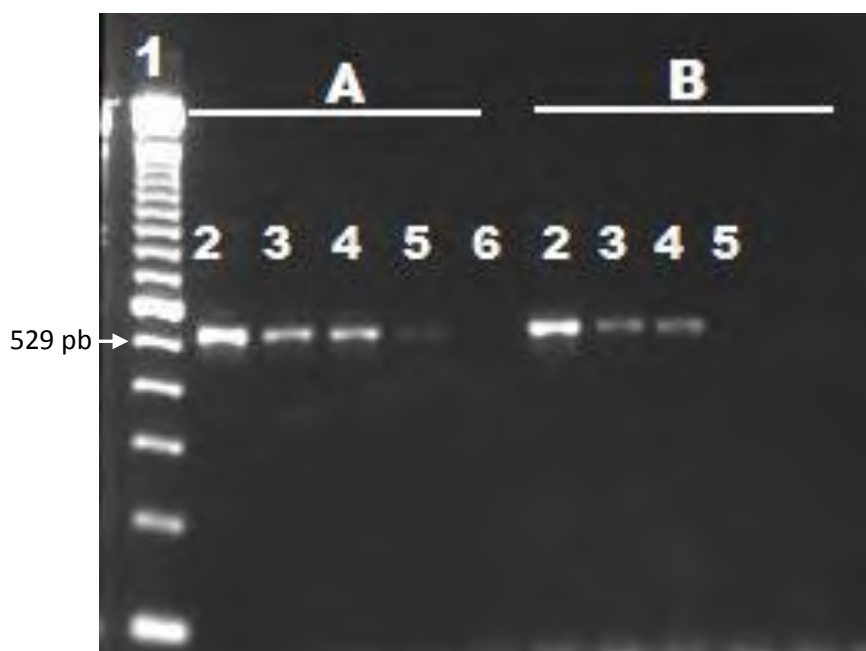


**Figura 8.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*.

### 5.3. PCR

#### 5.3.1. Limiar de detecção para limite mínimo de *T. gondii* em amostras de leite

O limite mínimo de Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*.detecção da reação de PCR para *T. gondii* em amostras de leite foi de 10 parasitas por mL, utilizando-se o kit comercial Illustra Genomic Tissue & Cells genomic prep. Mini spin Purification Kit (GE-Healthcare). As mesmas amostras testadas pelo Kit comercial GFX Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare) mostraram-se menos sensíveis, com limite mínimo de detecção de 100 parasitas por mL. Para extrações dos controles e das amostras de leite, optou-se pelo primeiro kit, por ser mais sensível.

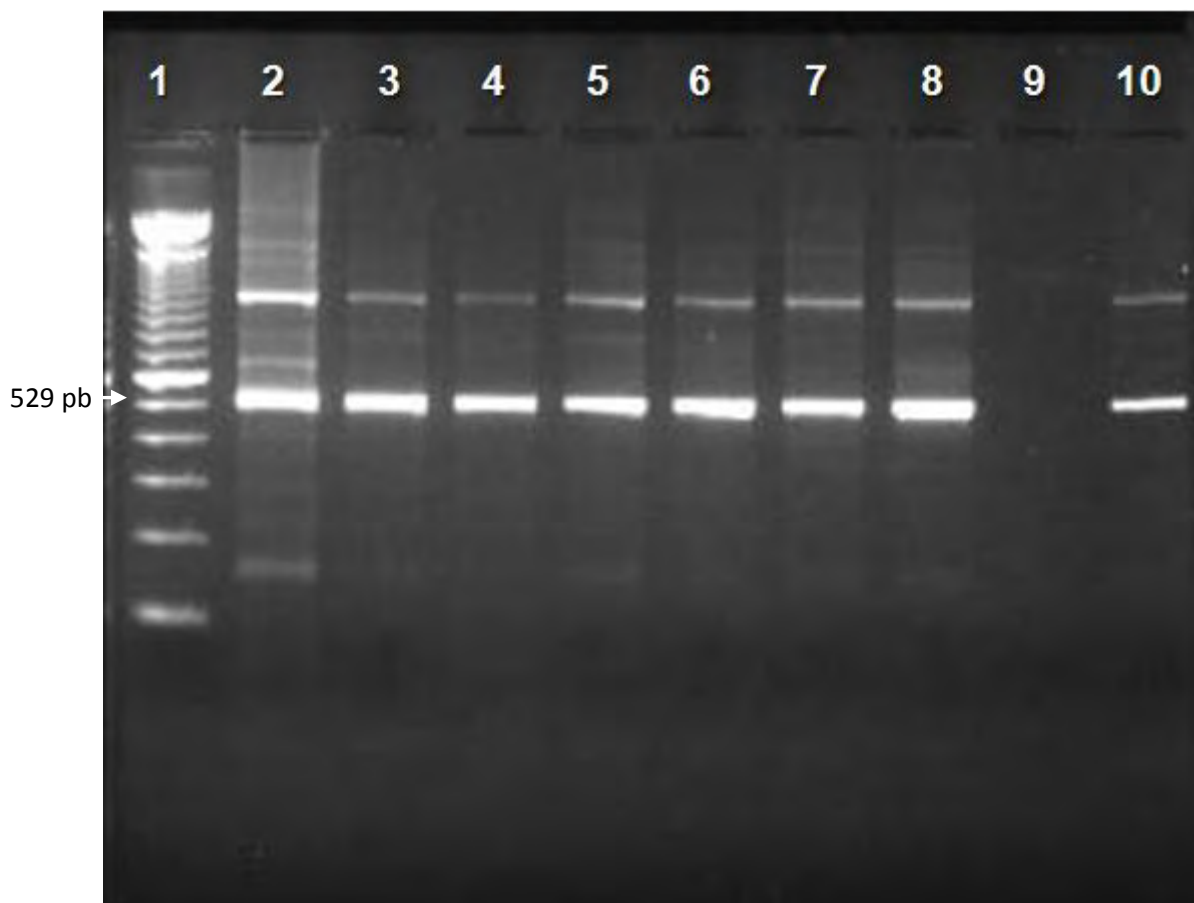


**Figura 9.** Visualização de banda de 529 pb, em gel de agarose 2,0%, mostrando os fragmentos de amplificação das diluições de *T. gondii* em água ultra-pura e no leite de ovelhas. (A) amostras de água ultra-pura contaminadas com taquizoítos (B) amostras de leite contaminadas com taquizoítos. 1) padrão de peso molecular 100 bp DNA-Ladder Invitrogen®; A2)  $1,0 \times 10^4$  taquizoítos/ml A3)  $1,0 \times 10^3$  taquizoítos/ml A4)  $1,0 \times 10^2$  taquizoítos/ml A5)  $1,0 \times 10^1$  taquizoítos/ml A6)  $1,0 \times 10^0$  taquizoítos/ml. B2)  $1,0 \times 10^3$  taquizoítos/ml B3)  $1,0 \times 10^2$  taquizoítos/ml B4)  $1,0 \times 10^1$  taquizoítos/ml B5)  $1,0 \times 10^0$  taquizoítos/ml. Botucatu, SP, 2010.

### 5.3.2. Detecção de DNA de *T. gondii* em amostras de leite

Os momentos das coletas de leite e o resultado da PCR, correlacionando com o título sorológico individual das ovelhas soropositivas, pelas diferentes provas sorológicas, são apresentados nas tabelas 10,11, 12 e 13.

Ao total, 70 amostras de leite das ovelhas soropositivas foram analisadas, a PCR foi positiva em sete amostras de leite (Figura 10), detectando-se o DNA do *T. gondii* no leite de cinco ovelhas (ovelhas 361, 480, 510, 520, 530) sendo que de duas dessas ovelhas o DNA foi detectado no leite por duas vezes (ovelhas 361 e 530).



**Figura 10.** Visualização de banda de 529 pb, em gel de agarose 2,0%, mostrando os fragmentos de amplificação de *T. gondii* no leite de ovelhas. 1) padrão de peso molecular 100 bp DNA-Ladder Invitrogen; 2) ovelha 361 3) ovelha 530; 4) ovelha 361; 5) ovelha 480; 6) ovelha 530; 7) ovelha 510, 8) ovelha 520; 9) controle negativo; 10) controle positivo. Botucatu, SP, 2010.

No grupo 2, analisou-se 69 amostras de leite e não houve detecção do DNA do *T. gondii* em nenhuma amostra.

As tabelas 10, 11, 12 e 13 apresentam os resultados da PCR das ovelhas soropositivas, correlacionando-os com os títulos sorológicos obtidos pelas diferentes provas sorológicas MAD-AF, RIFI-IgG, MAD-AM e RFI-IgM, respectivamente, nos momentos da coleta de leite.

**Tabela 10.** Frequência absoluta (n) e relativa (%) de negativos e positivos à reação em cadeia pela polimerase para a detecção de *T. gondii* em amostras de leite de ovelhas, segundo os títulos de anticorpos ao método de aglutinação direta com antígeno fixado pela formalina. Botucatu, SP, 2010.

MAD-AF	PCR Negativo		PCR Positivo		TOTAL	
	n	%	N	%	N	%
0	16	94,1	0	0,0	16	22,9
16	14	100,0	0	0,0	14	20,0
64	12	100,0	0	0	12	17,1
256	18	72,0	7	28,0	25	35,7
1024	3	100,0	0	0,0	3	4,3
<b>TOTAL</b>	<b>63</b>	<b>90,0</b>	<b>7</b>	<b>10,0</b>	<b>70</b>	<b>100,0</b>

Estatística: Teste G = 15,86; p=0,0032

**Tabela 11.** Frequência absoluta (n) e relativa (%) de negativos e positivos à reação em cadeia pela polimerase para a detecção de *T. gondii* em amostras de leite de ovelhas, segundo os títulos de anticorpos a reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgG. Botucatu, SP, 2010.

RIFI-IgG	PCR Negativo		PCR Positivo		TOTAL	
	n	%	N	%	N	%
0	21	100,0	0	0,0	21	30,0
16	9	14,3	0	0,0	9	12,9
64	23	85,2	4	14,8	27	38,6
256	10	76,9	3	23,1	13	18,6
<b>TOTAL</b>	<b>63</b>	<b>90,0</b>	<b>7</b>	<b>10,0</b>	<b>70</b>	<b>100</b>

Estatística: Teste G=8,81; p=0,0319

**Tabela 12.** Frequência absoluta (n) e relativa (%) de negativos e positivos à reação em cadeia pela polimerase para a detecção de *T. gondii* em amostras de leite de ovelhas, segundo os títulos de anticorpos ao método de aglutinação direta com antígeno fixado pelo etanol. Botucatu, SP, 2010.

MAD-AM	PCR Negativo		PCR Positivo		TOTAL	
	n	%	N	%	N	%
0	53	91,4	5	8,6	58	82,9
16	10	83,3	2	16,7	12	17,1
<b>TOTAL</b>	<b>63</b>	<b>90,0</b>	<b>7</b>	<b>10,0</b>	<b>70</b>	<b>100,0</b>

**Estatística:** Teste G=0,63; valor de P=0,4266

**Tabela 13.** Frequência absoluta (n) e relativa (%) de negativos e positivos à reação em cadeia pela polimerase para a detecção de *T. gondii* em amostras de leite de ovelhas, segundo os títulos de anticorpos a reação de imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgM. Botucatu, SP, 2010.

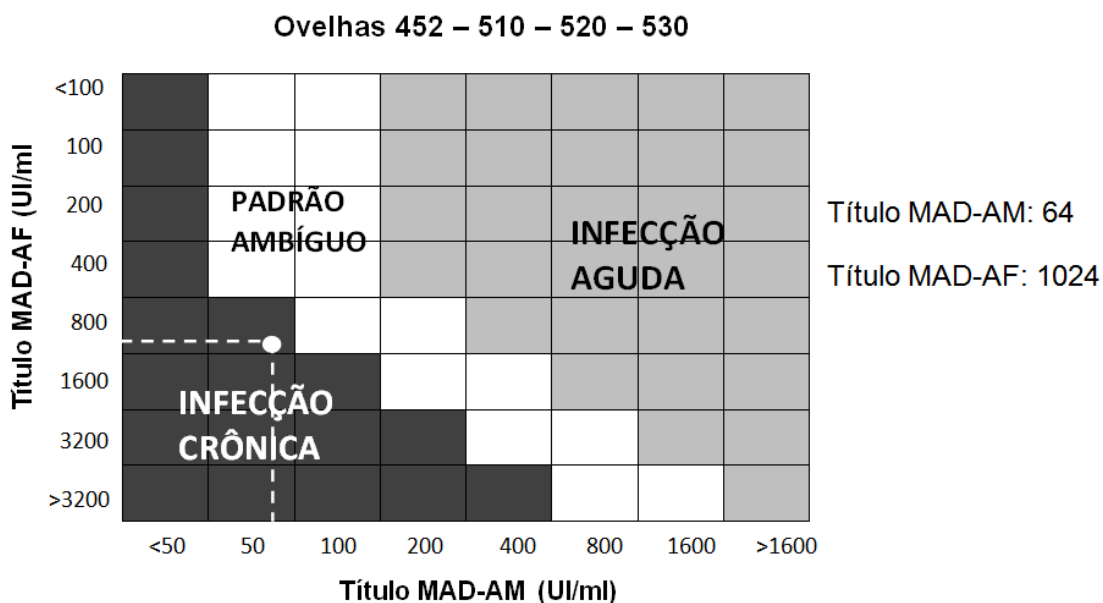
RIFI-IgM	PCR Negativo		PCR Positivo		TOTAL	
	n	%	N	%	N	%
0	57	90,5	6	9,5	63	90,0
16	6	85,7	1	14,3	7	10,0
<b>TOTAL</b>	<b>63</b>	<b>90,0</b>	<b>7</b>	<b>10,0</b>	<b>70</b>	<b>100</b>

**Estatística:** Teste G=0,14; valor de P=0,7044

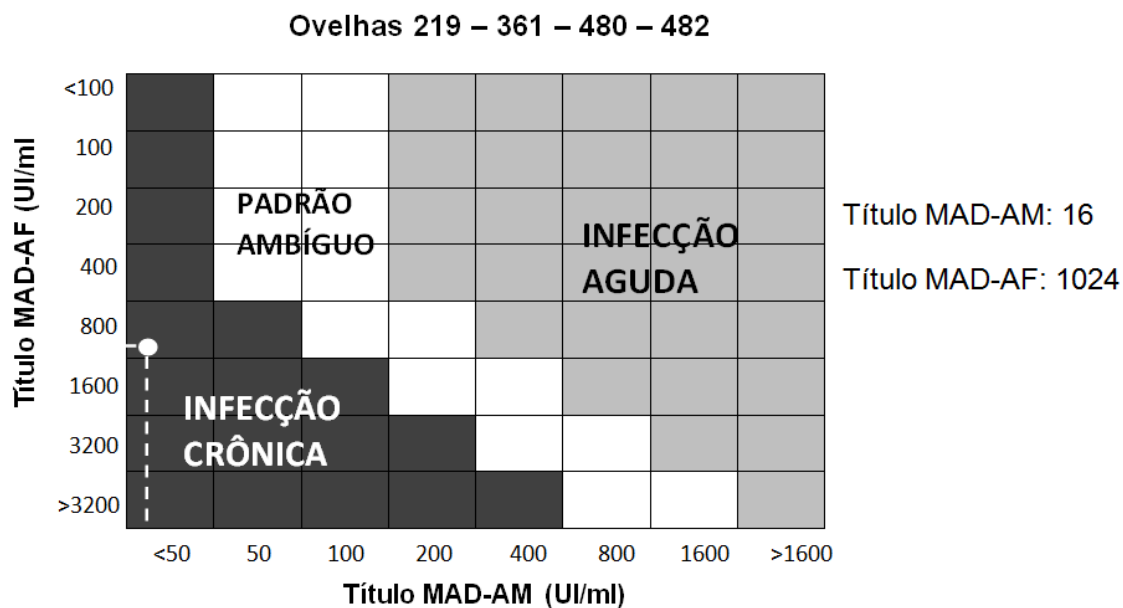
Nas figuras 11 a 18 são apresentados, esquematicamente, os títulos sorológicos obtidos na primeira coleta do experimento, pelo MAD-AF (eixo y) e MAD-AM (eixo x), segundo o gráfico de interpretação proposto por Montoya et al. (2007). Os animais com títulos iguais foram representados pela mesma figura.

Os resultados sorológicos evidenciaram, segundo os critérios interpretativos propostos por Montoya et al. (2007), que as ovelhas demonstravam desde a primeira coleta, perfil sorológico de cronicidade da infecção. Com exceção da ovelha 404 (Figura 15), que até a quarta coleta não

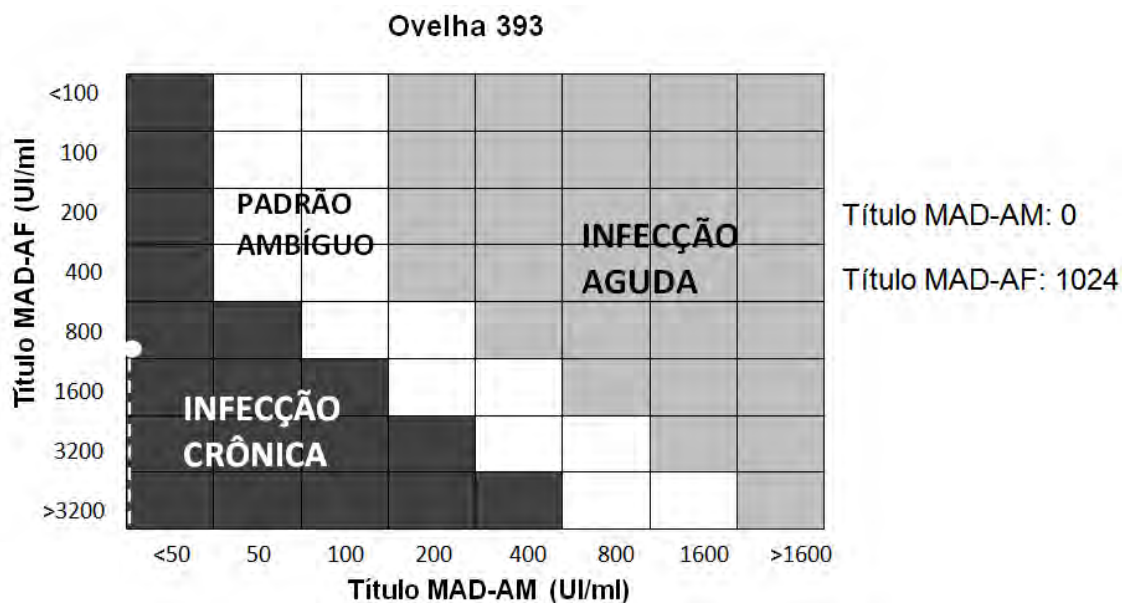
era possível determinar o estágio da infecção, mas na quinta coleta pode ser evidenciado perfil sorológico compatível com infecção crônica. Todas as ovelhas exibiram padrão crônico da infecção toxoplásmica até a última coleta do experimento, inclusive durante a lactação e mesmo quando acompanhada de elevações nos títulos de anticorpos obtidos pelo MAD-AF e pela RIFI-IgG (Tabelas 4 e 5).



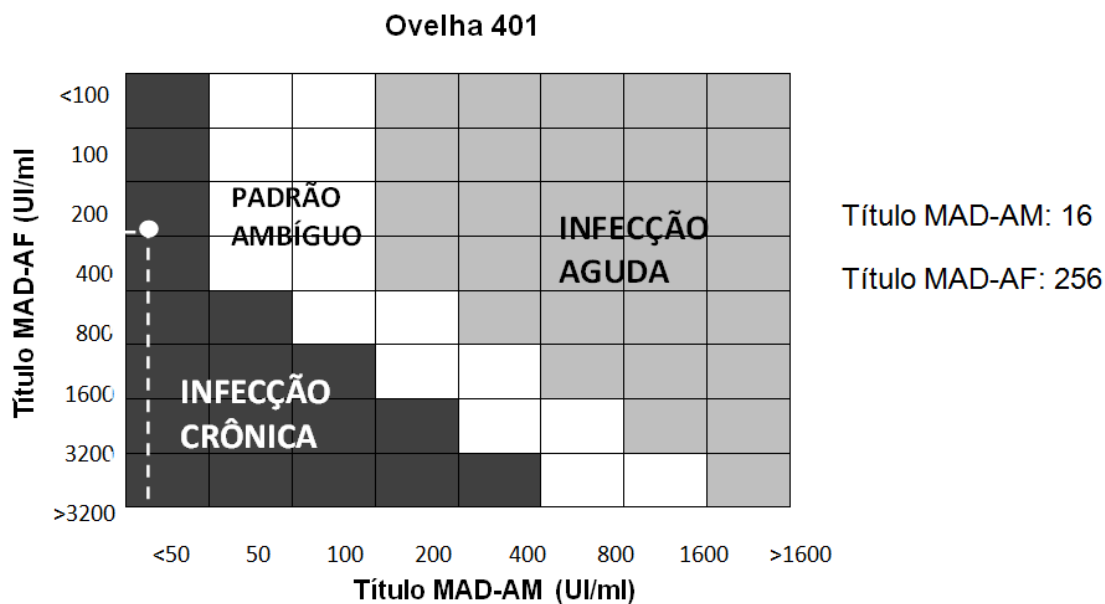
**Figura 11.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii* das ovelhas de número 452, 510, 520 e 530.



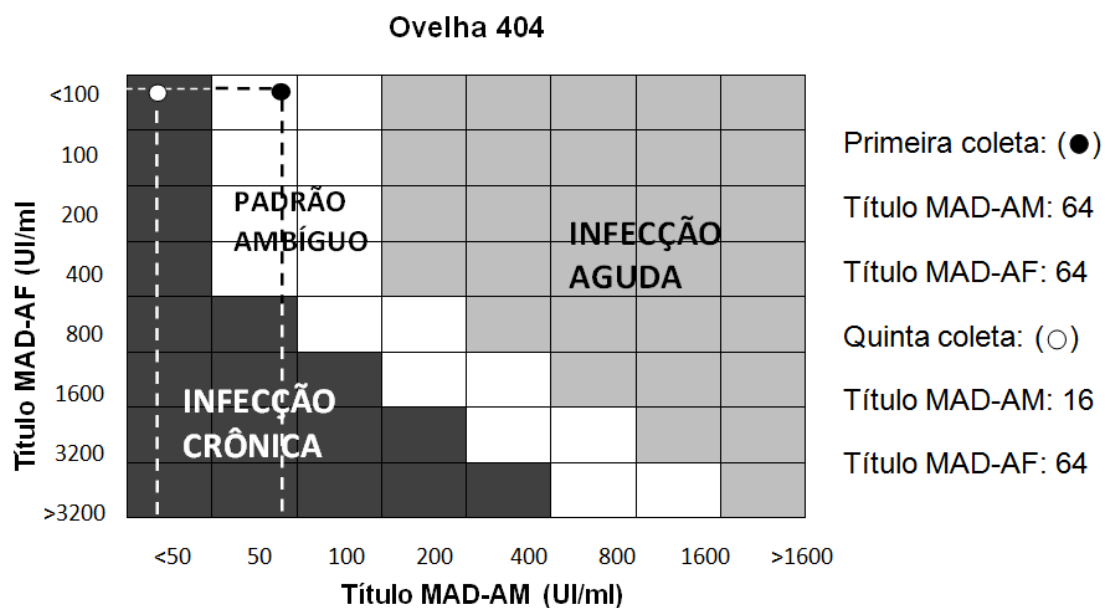
**Figura 12.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, das ovelhas de número 219, 361, 480 e 482.



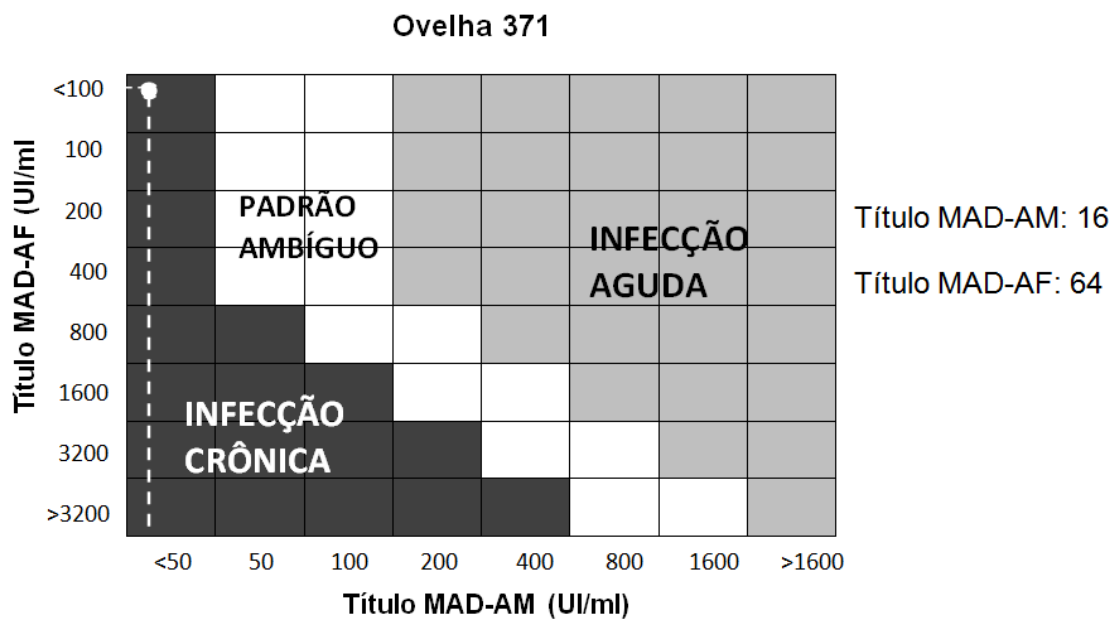
**Figura 13.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, da ovelha de número 393.



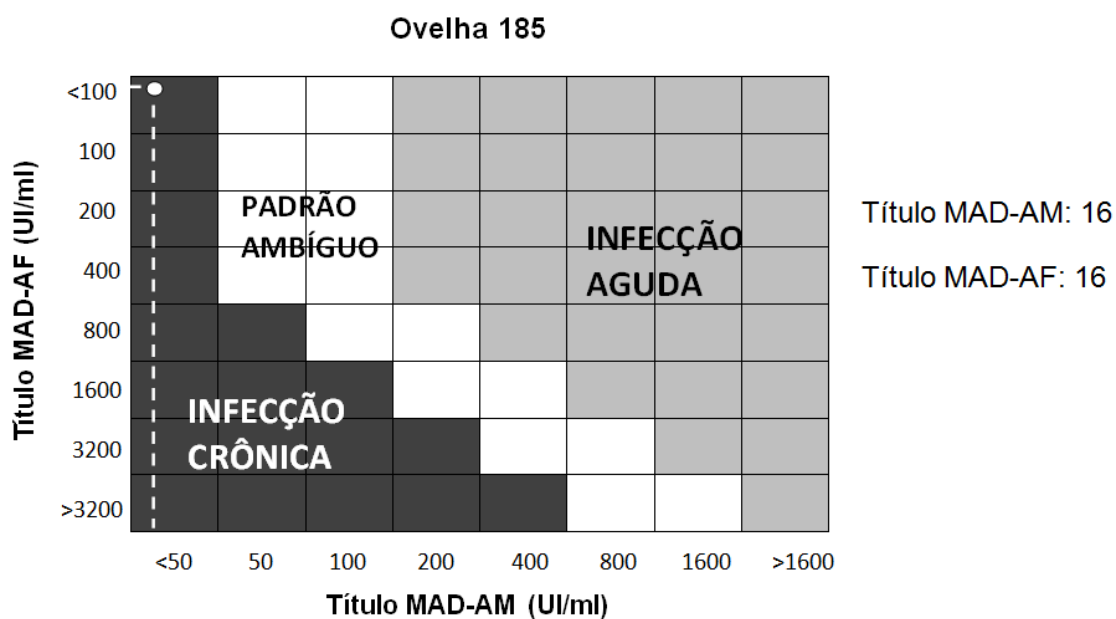
**Figura 14.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, da ovelhas de número 401.



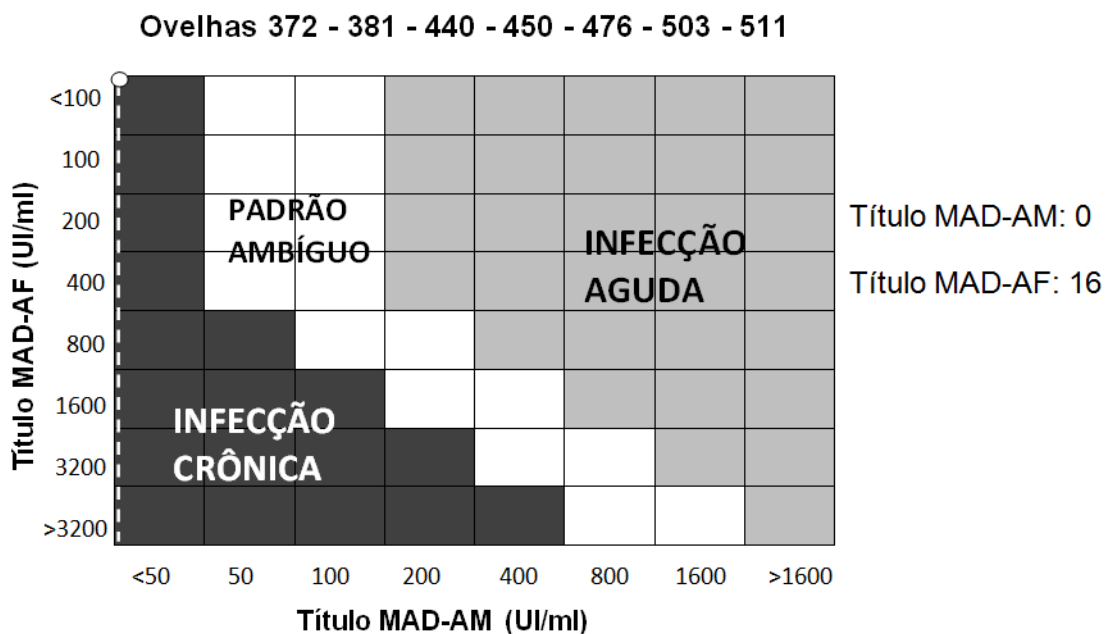
**Figura 15.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, em dois momentos, na primeira e na quinta coleta, da ovelha de número 404.



**Figura 16.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, da ovelha 371.



**Figura 17.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, da ovelha de número 185.



**Figura 18.** Quadro adaptado de Montoya et al. (2007), para estabelecimento do estágio da infecção por *T. gondii*, das ovelhas de número 372, 381, 440, 450, 476, 503, 511.

### 5.3.3. Sequenciamento

As amostras positivas no PCR foram seqüenciadas determinando a ordem dos nucleotídeos das amostras, as seqüências de nucleotídeos para cada amostra foram comparadas com seqüências já definidas depositadas na base de dados do genBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), obtendo-se de 97 a 100% de identidade ou similaridade com *T. gondii*. As seqüências obtidas pelo sequenciamento dos amplicons de DNA das amostras de leite estão sumarizadas na tabela 14.

**Tabela 14.** Análises das sequências dos amplicons obtidos nas reações de PCR das amostras de leite das ovelhas positivas e a comparação com as sequências depositadas no GenBank.

Amostra	Ovelha	Data Coleta	Espécie depositada GenBank	% identidade/ acesso
1	361	09/09/2008	<i>Toxoplasma gondii</i>	100%/DQ779196.1
2	530	23/09/2008	<i>Toxoplasma gondii</i>	99%/DQ779196.1
3	361	07/10/2008	<i>Toxoplasma gondii</i>	98%/DQ779196.1
4	480	07/10/2008	<i>Toxoplasma gondii</i>	98%/DQ779196.1
5	530	07/10/2008	<i>Toxoplasma gondii</i>	97%/DQ779196.1
6	510	21/10/2008	<i>Toxoplasma gondii</i>	99%/DQ779196.1
7	520	21/10/2008	<i>Toxoplasma gondii</i>	99%/DQ779196.1

# *D*iscussão

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Animais experimentais

Este estudo foi motivado pela utilização de ovelhas com infecção natural por *T. gondii*, como etapa preliminar para investigações posteriores sobre a possível participação desta espécie, na epidemiologia da doença, como potencial via de transmissão da toxoplasmose em relação ao consumo de leite de ovelhas infectadas. Os resultados apresentados, principalmente a detecção do DNA do *T. gondii* no leite de ovelhas com índice sorológico de infecção crônica, fornecem subsídios importantes para investigações futuras.

Nenhum índice clínico de toxoplasmose foi evidenciado nas ovelhas do grupo G1, durante o período de 12 meses de acompanhamento dos animais. Durante o período experimental as ovelhas de ambos os grupos foram desafiadas naturalmente por outros agentes patogênicos, como da actinobacilose, do ectima contagioso e da hemonose. As três enfermidades que atingiram o rebanho têm em comum o fato de se instalarem em ovelhas imunossuprimidas, que em ovinos, é comumente atribuída à origem endócrina (periparto) ou nutricional (nutrição aquém das necessidades ou por demanda maior de proteínas no periparto e lactação). Ressalta-se que são animais criados a condições de campo, sujeitos a desafios constantes por outros agentes patogênicos, retratando fielmente as condições de manejo que ocorrem nos sistemas de produção da ovinocultura brasileira.

O sistema imune desempenha funções que visam a sobrevivência do animal (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008). Contrariamente às infecções agudas de curta duração causadas pelas bactérias e vírus, as infecções causadas pelos protozoários são de longa duração e crônicas, e os parasitas podem persistir no hospedeiro por longo período de tempo. A sobrevivência do parasita irá regular a resposta imune do hospedeiro, suprimindo-a e permitindo a sua sobrevivência, enquanto, ao mesmo tempo, permite que outras respostas ocorram prevenindo a morte do hospedeiro por outras infecções (TIZARD, 2002). Esses dados de literatura podem justificar perfeitamente as oscilações nos títulos sorológicos observados ao longo dos 12 meses de acompanhamento das ovelhas.

Os animais soronegativos, não soroconverteram durante o período do experimento, nas condições do presente estudo, o que mostra possivelmente, que o ambiente e as pastagens não se constituíram em via importante de transmissão da doença para as ovelhas, o que certamente em período anterior tenha exercido influência, justificando os resultados do grupo de ovelhas soropositivas. Esse fato pode ser explicado, pela presença de gatos na Fazenda Edgárdia em um período anterior ao experimento ou também pela presença de felídeos (*Puma concolor*) aos arredores da fazenda, que ocupa área de preservação ambiental, e são registrados ataques constantes ao rebanho (Fórum Ambiental da Alta Paulista, 2008).

A pesquisa de oocistos nas amostras de solo mostrou-se negativa pelo método de flutuação. A sensibilidade de detecção deste método diagnóstico está relacionada à carga de oocistos no ambiente (AFONSO et al., 2008). Pela grande extensão de área onde as ovelhas são criadas, 8 hectares (80.000 m<sup>2</sup>) de pastagens, pode-se considerar, que as amostras coletadas não foram suficientes para permitir a detecção de oocistos.

Afonso et al. (2008) ao investigarem a distribuição espacial de oocistos de *T. gondii* no solo verificaram que somente em áreas com maior concentração de fezes de gatos foram encontradas amostras positivas. No presente estudo, não foi visualizada fezes de felino no solo ou sobre as pastagens, fato dificultado pelo próprio hábito do animal de enterrar suas fezes.

Em situações onde a quantidade do agente disponível é reduzida, a utilização de métodos moleculares na detecção de oocistos em amostras ambientais pode-se constituir em valiosa ferramenta diagnóstica, frente à elevada sensibilidade da técnica, mas seu uso ainda não é rotineiramente empregado e parece não haver um consenso da melhor metodologia para o diagnóstico molecular na detecção de oocistos.

## 6.2. Exames Realizados

### 6.2.1. Provas Sorológicas

O diagnóstico da toxoplasmose é bastante complexo, podendo ser feito por métodos parasitológicos ou sorológicos. Contudo, os métodos parasitológicos apresentam limitações como baixa sensibilidade, demanda de um maior período de tempo para a realização de infecções experimentais em camundongos, que os tornam bastante laboriosos; além da necessidade de um observador experiente. Em contrapartida, a pesquisa de anticorpos séricos é extremamente eficiente se observarmos sua praticidade e rapidez quando comparada aos ensaios biológicos.

Portanto, a sorologia tem sido o método de escolha para o diagnóstico da toxoplasmose com a possibilidade de utilização de diversas provas imunológicas na determinação da infecção pelo *T. gondii*, nas diferentes populações animais. Entretanto, há uma total ausência na literatura científica em apontar o melhor teste para o diagnóstico da infecção natural por *T. gondii* em ovinos (MAINAR-JAIME e BARBERÁN, 2007).

A metodologia mais empregada para o diagnóstico consiste na pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG, a fim de que se possa estabelecer a fase da infecção, embora também seja utilizada na medicina humana a detecção de IgA como indicador de fase aguda (UCHÔA, 1999).

Além disso, a presença dos anticorpos anti-*Toxoplasma* no curso da infecção permite a análise de perfis sorológicos, seja de infecção recente, em fase aguda, ou de infecção antiga, em fase de latência ou crônica (CONTRERAS et al., 2000).

Quando um hospedeiro se infecta com o parasito, após a multiplicação na porta de entrada, segue-se a sua disseminação por todo o organismo pelas vias sangüínea e linfática. Durante este período, inicia-se a formação de anticorpos específicos e o desenvolvimento de mecanismos imunocelulares que são responsáveis pela destruição dos taquizoítos extracelulares. Durante a fase crônica da toxoplasmose, somente os bradizoítos ou taquizoítos intracelulares persistem e são responsáveis pela manutenção de títulos sorológicos que podem durar toda a vida do hospedeiro (KAWAZOE, 2002).

Ainda na vigência da parasitemia, observada nas primeiras semanas da primoinfecção, surgem anticorpos específicos representados por isotipos IgM, IgA, IgE e IgG e os taquizoítos extracelulares são lisados por anticorpos específicos quando esses estão combinados com o complemento. No início da infecção do hospedeiro as imunoglobulinas da classe IgM, IgA e IgE aparecem primeiro, podendo ser detectadas pelas reações sorológicas dentro de oito a 12 dias após a infecção aguda pelo *T. gondii* (CAMARGO, 2001).

Na evolução da infecção configura-se um perfil sorológico de transição, com níveis elevados de anticorpos IgG, de afinidade crescente pelo antígeno. Estão ausentes os anticorpos IgA e IgE, podendo os anticorpos IgM ocasionalmente estarem presentes em baixos títulos. Progressivamente, este quadro sorológico dá lugar ao perfil de infecção latente ou crônica, que em geral se mantém por toda a vida, com níveis de IgG em baixos títulos e ausência dos anticorpos de outros isotipos, ainda que ocasionalmente se encontrem resíduos de IgM. A transição do perfil sorológico de infecção recente para o perfil de infecção latente é mais ou menos lenta, em semanas ou meses, dependendo do estado imunitário do hospedeiro (CAMARGO et al., 1977).

O método de aglutinação direta modificado tem sido amplamente utilizado em alguns laboratórios, como teste confirmatório para diagnóstico de infecção aguda em mulheres gestantes. A interpretação do teste é realizada comparando-se os títulos de anticorpos obtidos com a utilização de antígenos fixado pela acetona com aqueles obtidos com a utilização de antígenos fixados pela formalina (MONTROYA et al., 2007).

Soros de pacientes com infecção recém-adquirida tendem a aglutinar tanto as suspensões com antígenos fixados com formalina quanto antígenos fixados com acetona. Enquanto que os soros de pacientes com infecção adquirida em um passado mais distante, tendem a apresentar títulos mais elevados no teste de aglutinação pela formalina e títulos mais baixos ou negativos no teste de aglutinação pela acetona. Esse fenômeno tem sido atribuído à variação nos perfis de IgG, em resposta ao deslocamento de antígenos de superfície quando a infecção pelo *T. gondii* progride de uma fase aguda para uma fase mais crônica (MONTROYA et al., 2007).

Atualmente sua utilização está sendo incorporada na medicina veterinária. No laboratório de zoonoses da FMVZ-UNESP, Silva et al. (2007) verificaram melhores resultados ao substituir a acetona pelo metanol na inativação de antígenos de fase aguda. Portanto, no presente estudo, adotou-se o uso de antígenos fixados com metanol, substituindo-se a acetona.

Utilizando-se dos critérios interpretativos propostos por Montoya et al. (2007), todas as ovelhas do estudo demonstraram evidência sorológica compatível com estágio crônico da infecção pelo *T. gondii*, desde a primeira coleta do experimento. Com exceção da ovelha 404, que exibiu perfil sorológico ambíguo até a quarta coleta, mas que pode ser claramente definido na quinta coleta, como infecção crônica.

Observa-se (Figura 5) que os títulos sorológicos no MAD-AF e na RIFI-IgG sofreram oscilações ao longo dos 12 meses de acompanhamento sorológico, e mesmo nos períodos de elevações dos títulos, o perfil sorológico permaneceu compatível com cronicidade da infecção. Isto torna evidente que o estágio da infecção não deve ser estabelecido apenas pela observação de títulos obtidos por uma única prova sorológica, mesmo que seguida pela elevação dos títulos dos animais.

A partir deste conceito fica claro ao analisar, por exemplo, a ovelha 510, individualmente (Tabela 4). Na primeira até a terceira coleta este animal apresentou título de 1024 pela MAD-AF, seguido pela ascensão do título sorológico para 4096 durante a quarta, quinta e sexta coleta. Porém, a elevação observada pela MAD-AF não foi acompanhada por títulos altos na MAD-AM, que permaneceu até a sexta coleta com o título 64 e a partir de então decresceu para o título 16. Conclui-se que a interpretação de uma única prova sorológica pode facilmente induzir ao erro, portanto é mais indicado a combinação de dois métodos sorológicos concomitantemente, neste estudo, verificou-se que o MAD-AF e MAD-AM pode se constituir em método de escolha na diferenciação do estágio da infecção toxoplásmica em ovinos.

Comparando-se os dois métodos diagnósticos, MAD-AF e RIFI-IgG, empregados neste estudo, encontrou-se alto coeficiente de correlação ( $r= 0,92$ ,  $p < 0,0001$ ) entre as técnicas, porém com diferenças estatísticas significativas nos títulos sorológicos obtidos pelas duas técnicas, pelo teste t de Student, observando-se uma maior sensibilidade do MAD. Estes dados assemelham-se

aos encontrados por Shaapan et al. (2008), ao analisarem vários testes sorológicos na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em ovelhas naturalmente infectadas, encontrando 37% (110/300) de soropositividade pela RIFI e 43,7% (131/300) pelo MAD. Este mesmo estudo demonstrou sensibilidade de 96% que o MAD, contra 80,4% para a RIFI, em contrapartida a especificidade encontrada no MAD foi menor que da RIFI, 88,9% e 91,4%, respectivamente.

Os resultados do presente estudo são também similares aos encontrados por Marca et al. (1996), que obtiveram soroprevalência maior no MAD (35,7%) em comparação com a RIFI (33,72%) e por Silva et al. (2002), que encontraram 23% de ovinos reagentes na RIFI e 27% reagentes ao MAD, com coeficiente de concordância de 0,84.

Por outro lado, os resultados deste estudo são inferiores aos obtidos por Ljungstrom et al. (1994), que verificaram especificidade e sensibilidade de 100%, demonstrando concordância perfeita entre os resultados da RIFI e do MAD no exame de 58 amostras de soros ovinos, onde 31 (53,44%) foram positivas.

As diferenças nos resultados entre os vários pesquisadores devem ser avaliadas tanto quanto ao número de amostras pesquisadas e metodologia empregada, pois estas variáveis podem interferir no resultado quanto ao título de anticorpo obtido. Outro aspecto a ser levantado é a interpretação do resultado pelo técnico que está examinando, além de características dos reagentes, antígenos e conjugados que são utilizados nos diferentes laboratórios.

Os resultados desta pesquisa estão de acordo com o verificado em vários trabalhos, com diferentes espécies. Normalmente o MAD resulta em maior número de resultados positivos e títulos ligeiramente superiores quando comparados com a RIFI. Segundo Dubey et al (1997), entre os testes sorológicos, o MAD é o que apresenta maior sensibilidade, com a vantagem de ser de fácil realização e não exigir equipamentos sofisticados.

Em ovelhas experimentalmente infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, pela via intravenosa, a imunoglobulina IgM foi detectada um mês após a infecção, com permanência de títulos por três meses, quando reinfectadas, não havendo ascensão dos títulos de IgM (McCOLGAN et al., 1988). A partir disto, pode-se inferir que as ovelhas deste estudo, na possibilidade da reinfecção ou

na recrudescência de cistos na infecção latente, demonstraram padrão sorológico compatível com infecção crônica, uma vez, que não apresentaram títulos ascendentes de IgM.

Na recrudescência da infecção, o animal é reexposto ao antígeno, produzindo uma resposta imune secundária ou resposta imune anamnésica, obtendo-se níveis maiores de anticorpos específicos IgG, produzidos pelas células B de memória (CUNNIGHAM e KLEIN, 2008), porém, como exposto anteriormente, não há ascensão de títulos IgM, da mesma forma que no presente estudo, pois nos momentos em que houve ascensão dos títulos de IgG, estes não foram acompanhados pela ascensão de títulos de IgM.

Para interpretação dos títulos sorológicos obtidos pela RIFI-IgM e RIFI-IgG, utilizou-se os perfis sorológicos proposto por Camargo et al. (1991), utilizados na detecção das diferentes fases da infecção pelo *Toxoplasma* no homem. Critérios semelhantes foram adotados para interpretação dos resultados sorológicos nos animais (LAPPIN, 1996). São reconhecidos três perfis na infecção pelo *T. gondii*:

Perfil I – Infecção recente ou aguda: Definido pela presença de anticorpos IgM, com títulos maiores que 1:64, associados a presença de anticorpos IgG em títulos baixos ou crescentes.

Perfil II – Fase de transição: Definido pela presença de anticorpos IgG detectados em altos títulos e ausência ou baixos títulos de anticorpos IgM.

Perfil III – Infecção crônica: Definido pela presença de anticorpos IgG e total ausência de anticorpos IgM.

A principal vantagem da detecção da IgM é que um resultado negativo pode descartar a possibilidade de infecção recente, mas sua principal desvantagem está no fato de que pode persistir no soro, em níveis detectáveis, por muitos meses, de modo que um resultado positivo nem sempre pode ser interpretado como indicativo de infecção recente (LAPPIN, 1996). Semelhante ao observado no MAD, pela RIFI, os animais se encontravam na fase crônica da infecção, pois nenhuma das ovelhas apresentaram títulos sorológicos maior que 64 na RIFI-IgM.

A definição mais precisa destes perfis sorológicos e, conseqüentemente, o diagnóstico correto da infecção devem ser feitos com base na combinação de diferentes métodos, para a pesquisa de diferentes imunoglobulinas

(CAMARGO et al., 1991). A RIFI e, principalmente, o MAD são excelentes opções diagnósticas, por apresentarem alta sensibilidade e especificidade. São ferramentas importantes para estudos de inquéritos soropidemiológicos e de fácil interpretação quando é possível associar a epidemiologia e clínica da toxoplasmose tanto nos homens como nos animais.

### **6.2.2. PCR**

A presença do protozoário *T. gondii* nos produtos de origem ovina, destinados à alimentação humana, é de especial interesse em saúde pública, considerando-se que estes alimentos, carne e leite, quando inadequadamente preparados, podem facilitar a transmissão zoonótica (LUNDÉN e UGGLA, 1992; TENTER et al., 2000; JITTALAPONG, 2005).

Neste experimento a presença do DNA do *T. gondii* foi constatada no leite das ovelhas, infectadas naturalmente. A verdadeira importância de estudos nas infecções naturais é que eles retratam o que de fato ocorre nas propriedades rurais, de valor relevante principalmente nas propriedades menores que utilizam leite para subsistência de suas famílias. Ressalta-se o fato de que o leite é um importante alimento, essencial para o crescimento humano, principalmente nos primeiros anos de vida, fonte protéica de alto valor biológico, daí sua importância econômica e social. Além da possível presença do *T. gondii* no produto *in natura*, deve se considerar os sub-produtos do leite ou derivados lácteos que são preparados com leite cru, hoje fato comum no que se refere à produção de queijos com o leite de ovelhas.

A presença do *T. gondii* já foi detectada no leite de cabras e algumas ocorrências da toxoplasmose humana foram atribuídas ao consumo de seu leite não pasteurizado. Não há relatos na literatura de surtos ou casos isolados de toxoplasmose em relação ao consumo de leite de ovelha, embora seja muito consumido mundialmente. Pela similaridade entre as espécies supõe-se que o leite de ovelha também possa constituir em potencial via de transmissão da toxoplasmose para o homem (SPALDING, 2005).

Um estudo desenvolvido em ovelhas leiteiras da região da Campania, sul da Itália (FUSCO et al., 2007), investigaram ao total 117 propriedades, coletando-se sangue e leite de 10 ovelhas adultas, por propriedade, totalizando

1170 animais. Para cada propriedade, avaliou-se o pool de leite das dez ovelhas, totalizando 117 amostras. O DNA do parasito foi detectado pela PCR em 4 amostras de leite, representando 3,4% do total analisado, demonstrando a potencialidade de transmissão a partir do leite e produtos lácteos oriundos de ovelhas.

As modificações de natureza endócrina que acompanham a gestação causam imunossupressão inespecífica, destinadas a favorecer a tolerância materna aos aloantígenos paternos. Durante a gestação há um aumento na concentração de hormônios, incluindo estrogênio, testosterona e mais significativamente, a progesterona, este último, envolvido na inibição da produção de interleucina-12, fator de necrose tumoral e óxido nítrico pelos macrófagos, inibição da atividade celular das células natural killer, supressão do desenvolvimento da resposta celular Th1 e estímulo ao desenvolvimento da resposta Th2 (MILLER et al., 2009).

Pode-se inferir, então, que essa queda fisiológica da imunidade no periparto também é passível de promover a recrudescência de cistos teciduais de *T. gondii*, tornando-os novamente circulantes, podendo ser eliminados no leite.

Esta relação entre eventos imunossupressores, infecção crônica e reativação de cistos de *T. gondii* é bem documentada na literatura. O vírus da imunodeficiência humana, causador da AIDS, assim como o vírus da imunodeficiência felina, que acomete gatos domésticos, estão associados às síndromes de imunossupressão, devido ao tropismo por células linfóides do sistema imune. A interação destes agentes em infecções simultâneas pode resultar na reativação da toxoplasmose. A importância da imunossupressão ficou estabelecida quando verificou-se que cepas não virulentas de *T. gondii* produziram doença quando inoculadas em animais com deficiência de linfócitos T (DUA et al., 1994). O mesmo tipo de raciocínio é válido para outras espécies em situações de imunossupressão.

Os mecanismos imunológicos que estão por trás da manutenção da vigilância sobre os cistos teciduais e a eventual reativação dos mesmos interessam particularmente o presente estudo, pois a presença do DNA do parasita foi detectada no leite de ovelhas com perfil sorológico de cronicidade da infecção. O escape de taquizoítos na reativação da infecção pode ter

favorecido a detecção molecular pela PCR em alguns momentos da infecção. Porém, na hipótese de reagudização, esta não foi acompanhada por elevação nos títulos de anticorpos obtidos pela MAD-AM ou RIFI-IgM, permanecendo a evidência sorológica de cronicidade da infecção.

Em um experimento anterior realizado pelo grupo de pesquisa em zoonoses da Unesp Botucatu, Costa (2008) verificou a eliminação de *T. gondii* pelo leite de ratas cronicadas bem como a transmissão galactogênica para os neonatos, já que tanto o leite desta fêmea como amostras de tecidos dos neonatos mostraram-se positivas na PCR, refutando-se a hipótese de que o agente somente pode ser eliminado pelo leite de animais com infecção aguda.

Pettersen (1984) demonstrou experimentalmente que camundongos lactantes cronicamente infectados, excretaram cistos pelo leite, mostrando que, apesar da transmissão ser comumente atribuída à eliminação de taquizoítos, também pode ocorrer pela excreção de cistos teciduais. Segundo Hiramoto (2001), a contaminação do leite pelo parasita pode ocorrer de maneira endógena, na glândula mamária, quando células da glândula mamária estiverem abrigando cistos de *T. gondii*. Durante a lactação estes cistos revestidos pela membrana celular do hospedeiro podem ser secretados por exocitose, assim como ocorre fisiologicamente, com os glóbulos de gordura presentes no leite liberados para o lúmen pela exocitose das células para produção de leite (DEYRUP-OLSEN e LUCHTEL, 1998).

Com base nestes dados, aventa-se uma segunda hipótese para justificar os resultados do presente estudo quanto ao encontro do DNA do *T. gondii*, com a possibilidade de excreção de cistos pelo leite das ovelhas. Este dado apresenta maior valor epidemiológico, pois os cistos, ao contrário dos taquizoítos, são dificilmente inativados por enzimas gástricas, aumentando as chances de transmissão ao homem.

A proporção de ovelhas com eliminação de *T. gondii* pelo leite é alta, considerando que pelo perfil sorológico, são animais cronicamente infectados. Estes dados ainda podem estar subestimados, uma vez que resultados negativos pela PCR não excluem a possibilidade da amostra de leite examinada ser positiva, uma vez que somente 200 µl da amostra de leite são analisados, quantidade muito pequena quando comparada ao volume de leite produzido que é ao redor de 500 mL/dia. Acrescenta-se a este dado, que as

amostras de leite eram obtidas em semanas intercaladas, a cada 14 dias, e não diariamente, e a eliminação do agente pode ser intermitente.

O sequenciamento documentou que os produtos amplificados pela PCR se tratavam de DNA de *T. gondii*, excluindo a possibilidade de diagnóstico cruzado com protozoários relacionados, o que reforça a importância deste estudo quanto aos aspectos de saúde pública.

Apesar do significado desses achados, sobretudo relativo à possível transmissão da toxoplasmose a partir do leite e produtos lácteos oriundos de ovelhas, consideramos que novos estudos são necessários, incluindo-se a pesquisa molecular do agente diariamente, especialmente nos momentos em que se considerar a reagudização da infecção, pelos resultados dos exames sorológicos.

# **C**onclusão

## 7. CONCLUSÃO

Em relação a diferenciação dos estágios agudo e crônico da infecção pelo *T. gondii* e ao encontro do DNA do agente no leite, as conclusões deste estudo foram as seguintes:

1 - Pela análise seqüencial das imunoglobulinas IgM e IgG pelos métodos diagnósticos MAD-AM, MAD-AF, RIFI-IgG e RIFI-IgM foi possível diferenciar os estágios da infecção nas ovelhas estudadas.

2 - Observou-se uma sensibilidade maior do MAD, com títulos ligeiramente mais elevados.

3 - É adequada a combinação de dois métodos diagnósticos para diferenciação do estágio da infecção toxoplásmica.

4 - A presença do DNA do *T. gondii* foi detectada pela análise molecular, constituindo-se em resultado relevante quanto aos aspectos de saúde pública.

5 - O DNA de formas evolutivas do agente foi encontrado em alta proporção de ovelhas cronicamente infectadas pelo *T. gondii*, admitindo-se como provável reagudização e reativação da infecção.

# *R*eferências Bibliográficas

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, E.; LEMOINE, M.; POULLE, M.L.; RAVAT, M.C.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; VILLENA, I.; AUBERT, D.; RABILLOUD, M.; RICHE, B.; GILOT-FROMONT, E. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.8-9, p.1017-1023, 2008.

AHMED, Y.F.; SOKKAR, S.M.; DESOUKY, H.; SORO, A.H. Abortion due to toxoplasmosis in small ruminants. **Global Veterinaria**, v.2, n.6, p.337-342, 2008.

ALVES, J.A.B.; DE OLIVEIRA, L.A.R.; DE OLIVEIRA, M.F.B.; ARAÚJO, R.M.; SANTOS, R.C.S.; ABUD, A.C.F.; INAGAKI, A.D.M. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres grávidas. **Revista de Enfermería**, v.17, n.1, p.107, 2009.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Oesp Gráfica, 2000. 359p.

ARAÚJO, F.R.; SARTI, E.C.; CROCCI, A.J.; SEABRA, V.M.S.; AMORIM, J.H.; CUSINATO, F.Q.; ARAÚJO, C.P.; CARVALHO, C.M.E. Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em estudantes de Medicina Veterinária de Campo Grande, MS, BRASIL. **Ciência Rural**, v.30, n.6, p.1017-1019, 2000.

ASPINALL, T.V.; MARLLE, D.; HYDE, J.E.; SIMS, P.F.G. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polimerase chain reaction- food for thought. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1193-1199, 2002.

AVELINO, M.M.; CAMPOS Jr., D.; PARADA, J.C.B.; CASTRO, A.M. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. **European Journal of**

**Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v.108, n.1, p.19-24. 2003.

BAHIA, M.T.; VITOR, R.W.A.; CALDAS, R.P.; ANTUNES, C.M.F.; CHIARI, C. Avidéz de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma* da classe IgG e sua utilização na diferenciação entre toxoplasmose recente e crônica em caprinos. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.32, n.1, p.11-16, 1995.

BERTOZZI, L.C.; SUZIKI, L.A.; ROSSI, C.L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, n.3, p.175-177, 1999.

BOOTHROUD, J.C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the Field. **International Journal for Parasitology**, v.39, n.8, p.935-946, 2009.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K. da; BORTOLIERO, A.L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.1, p.21-25, 1997.

BOREL, N.; DOHERR, M.G.O.; VRETOU, E.O.; PSARROU, E.; THOMA, R.; POSPISCHIL, A. Seroprevalence for ovine enzootic abortion in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.65, p.205-216, 2004.

BRASIL, 2002. Ministério da Saúde. Fundação nacional de Saúde (FUNASA). Surto de Toxoplasmose no Município de Santa Isabel do Ivaí – Paraná. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.2,n.3, p.2-9, 2002.

BRASIL, 2006. Ministério da Saúde. Surto intrafamiliar de toxoplasmose, Santa Vitória do Palmar-RS, julho de 2005. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.6, n.3, 2006.

BRASIL, 2006. Ministério da Saúde. Investigação do surto de toxoplasmose associado ao consumo de prato a base de carne crua (Steak tartar), nos municípios de São Paulo e Guarujá, SP – Novembro de 2006. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.4, n.41, 2007.

BRESCIANI, K.D.S.; TONIOLLO, G.H.; COSTA, A.J.; SABATINI, G.A.; MORAES, F.R. Clinical, parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1039-1043, 2006.

BRITO, M. A. A ovinocultura leiteira no Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n.39, p.66-69, 2006.

BUXTON, D.; FINLAYSON, J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. **Journal of Comparative Pathology**, v.96, p.319-333, 1986.

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.

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.E.; RODGER, S.; BARTLEY, P.; INNES, E.A. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.25–88, 2007.

CANTOS, G.A.; PRANDO, M.D.; SIQUEIRA, M.V.; TEIXEIRA, R.M. Toxoplasmose: Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.4, 2000.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, p.143-169, 1974.

CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.; GUARNIERI, D.B.; ROCCA, A. Padronização de testes sorológicos para toxoplasmose, problema urgente da patologia clínica. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.13, p.1-5, 1977.

CAMARGO, M.E. SILVA, S.M.; LESER, P.G.; GRANATO, C.H. Avides de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, n.3, p.213-218, 1991.

CAMARGO, M.E. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editors. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 278-286. 2001.

CARMO, E.L.; SILVA, M.C.M.; XAVIER, U.A.M. Inquérito sorológico de toxoplasmose em candidatos a transplante renal no Hospital Ofir Loyola, Belém, Pará, Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.6, n.4, p.15-17, 2004.

CAVALCANTE, A. C. R. **Epidemiologia e caracterização do *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) em caprinos no Ceará**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2004, 145 f. Dissertação (Dissertação em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CAVALCANTE, G.T.; AGUIAR, D.M.; CHIEBAO, D.P.; MEIRELES, L.R.; ANDRADE Jr, H.F.; CAMARGO, L.M.A.; LABRUNA, M.B.; RUIZ, V.L.A.; GENNARI, S.M. 2004. Ocorrência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em humanos e animais domésticos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.217, 2004.

CAVALCANTE, G.T.; AQUAR, D.M.; CAMARAO, L.M.A.; LABRUNA, M.B.; ANDRADE, H.F.; MEIRELES, L.R.; DUBEY, J.P.; THULLIEZ, P.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans

from rural western amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.92, n.3, p.647-649, 2006.

CHANTON, G.H.; THOMA, R.; CORBOZ, L.; BOREL, N.; POSPISCHIL, A. Abortion in small ruminants in Switzerland: Investigations during two lambing seasons with special regard to Chlamydiae. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v.144, n.9, p.483-492, 2002.

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

CLEMENTINO, M.M.; SOUZA, M.F.; ANDRADE NETO, V.F. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.146, n. 3-4, p.199-203, 2007.

CONDE, M.; MOLINA CABALLERO, J.M.; RODRÍGUES-PONCE, E.; RUIZ, A.; GONZÁLEZ, J. Analysis of IgG response to experimental infection with RH *Toxoplasma gondii* in goats. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.24, n.3, p.197-206, 2001.

CONTRERAS, M.D.; SANDOVAL, M.L.; SALINAS, P.; MUNOZ, P.; VARGAS, S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG/IgM/IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y crônica. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.55, n.1/2, p.1-10, 2000.

COOK, A.J.; GILBERT, R.E.; BUFFOLANO, W. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. **British Medical Journal**, v.321, p.142-147, 2000.

COSTA, T.L.; SILVA, M.G.; RODRIGUES, I.M.X.; BARBARESCO, A.A.; AVELINO, M.M., CASTRO, A.M. Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose. **NewsLab**, v.85, 2007.

COSTA, V. M. **Transmissão galactogênica de *Toxoplasma gondii* na infecção experimental de ratas wistar**. 2008. 100f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Saunders Elsevier. 4<sup>a</sup> edição. 2008. 710 p.

CURRENT, W.L.; UPTON, S.J.; LONG, P.L. Taxonomy and life cycle. In: LONG, P.L. Coccidiosis of man and domestic animals. Boston, **CRC Press**, 1990. p.7-8.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, p.562-568, 1980.

DEYRUP-OLSEN e LUCHEL, D.L., Secretion of mucous granules and other membrane bound structures: a look beyond exocytosis. **International Review of Cytology**, v.183, p.95-141, 1998.

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

DUA, N.; REUBEL, G.; MOORE, P.F. An experimental study of primary feline immunodeficiency virus infection in cats and a historical comparison to acute simian and human immunodeficiency virus diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.43, p.337-335, 1994.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v.19, p.155-177, 1972.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in cat. **Feline Practice**, v.16, n.4, p.12-45, 1986.

DUBEY, J.P. Lesions in transplacentally induced toxoplasmosis in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p.905-909. 1988.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: **CRC Press**, 1988. 220p.

DUBEY, J.P.; KIRKBRIDE, C.A. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.195, p.1715-1716, 1989.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, p.1593-1598, 1994.

DUBEY, J.P. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. **Veterinary Parasitology**, v.71, p.397-310, 1997.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.1257-1278, 2008.

DUBEY, J.P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.2, p.190-195, 2009.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in sheep – the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.1-14, 2009.

ENTRICAN, G.; WHEELHOUSE, N.M. Immunity in the female sheep reproductive tract. **Veterinary Research**, v.37, p.295-309, 2006.

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**, v.28, p.1459-1466, 1998.

FALCON, F.; FREYRE, A. *Toxoplasma gondii*: Prototype immunization of lambs against formation of muscle and brain cysts. **Veterinary Parasitology**, v.66, n.1-2, p.15-20, 2009.

FIALHO, C.G.; ARAÚJO, F.A.P. Comparação entre os testes de imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta para a detecção de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em soros de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.3, p.185-189, 2002.

FIGLIUOLO, L.P.C.; KASAI, N.; RAGOZO, A.M.A.; DE PAULA, V.S.O. ; DIAS, R.A.; SOUZA, S.L.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.161–166, 2004.

FIGUERÓ-FILHO, E.A.; LOPES, A.H.A.; SENOFONTE, F.R.A.; SOUZA JUNIOR, V.G.; BOTELHO, C.A.; FIGUEIREDO, M.S.; DUARTE, G. Toxoplasmose aguda: estudo da freqüência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, n.8, p.442-449, 2005.

FRANCISCO, F.M.; SOUZA, S.L.P.; GENNARI, S.M.; PINHEIRO, S.R.; MURADIAN, V.; SOARES, R.M. Seroprevalence of Toxoplasmosis in a low-income community in the São Paulo municipality, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, p.167-170, 2006.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v.167, p.893-896, 1970.

FREYRE, A.; BONINO, J.; CASTELLS, D.; CORREA, O.; CASSARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.13-15, 1997.

FUSCO, G.; RINALDI, L.; GUARINO, A.; PROROGA, Y.T.R.; PESCE A.; GIUSEPPINA, D.M., CRINGOLI, G. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). **Veterinary Parasitology**, v.149, p. 271–274, 2007.

GALISTEU, K.J.; MATTOS, C.B.; LELIS, A.G.L.; OLIVEIRA, M.P.; SPEJORIM, L.F.; JORDÃO, P.; ZAGO, A.P.; CURY, P.M.; MATTOS, L.C.; ROSSIT, A.R.B.; CAVASINI, C.E.; MACHADO, R.L.D. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.9, n.4, p.24-29, 2007.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C.; KOBILKA, E. Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapita (Paraná), Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.6, n.3, p.157-63, 1999.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, v.29, p.91-97,1999.

GONDIM, L.F.P.; BARBOSA, H.V.; RIBEIRO FILHO, C.H.A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, shep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273-276, 1999.

HARTLEY, W.J.; JEBSON, J.L.; McFARLANE, D. New Zealand type II abortion in ewes. **Australian Veterinary Journal**, v.30, p.216-218, 1954.

HARTLEY, W.J.; MARSHALL, S.C. Toxoplamosis as a cause of ovine perinatal mortality. **Veterinary Journal**, v.5, p.119-124, 1957.

HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, n.10, p.634-640, 2002.

HIRAMOTO, R.M.; MAYRBAURL-BORGES, M.; GALISTEO JR, A.J.; MEIRELES, L.R.; MACRE M.S.; ANDRADE JR, H.F. Infeciosidade de cistos de *Toxoplasma gondii* ME-49 em leite bovino e queijo caseiro. **Revista de Saúde Pública**, v.35, n.2, p.113-118, 2001.

HURTADO, A.; ADUREZ, G.; MORENO, B.; BARANDIKA, J.; GARCIA-PEREZ, 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.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal, v.35, 2007.

ISHAG, M.; MAGZOUN, E.; MAJID, M. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating she camels. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.5, n.6, 456-458, 2006.

JACOBS, L. et al. The prevalence of Toxoplasmosis in New Zealand sheep and cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.24, p.673-675, 1963.

JITTAPALAPONG, S.; SANGVARANOND, A.; PINYOPANUWAT, N.; CHIMNOI, W.; KHACHAERAM, W.; KOIZUMI, S.; MARUYAMA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in Satun Province, Thailand. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 895-901. 2005.

KAWAZOE, U. 2002. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. **Parasitologia Humana**. 10 ed., São Paulo, Atheneu: p. 149-156.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.1359-1370, 2008.

KIJLSTRA, A., JONGERT, E. Toxoplasma safe meat: close to reality? **Trends in Parasitology**, v.25, p.8 -22, 2009.

KIM, K.; WEISS, L.M. Toxoplasma: the next 100 years. **Microbes and Infection**, v.10, p.978-984, 2008.

KLUN, I.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; KATIC-RADIVOJEVIC, S. ; NIKOLIC, A. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia : Seroprevalence and risk factors. **Veterinary Parasitology**, v.135, n.2, p.121-131, 2006

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

LAPPIN (M.R.) - Feline toxoplasmosis: interpretation of diagnostic test results. **Semin Vet Med Surg (Small Anim.)**, v.11, p.154-160, 1996.

LEÃO, P.R.D.; MEIRELLES FILHO, J.; MEDEIROS, S.F. Toxoplasmose: soroprevalência em puérperas atendidas pelo Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** v.26, n.8, 2004.

LOPES, W.D.Z.; SANTOS, T.R.; SILVA, R.S.; ROSSANESE, W.M.; SOUZA, F.A.; RODRIGUES, J.F.; MENDONÇA, R.P.; SOARES, V.E.; COSTA, A.J. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.88, n.1, p.104-106, 2010.

LJUNGSTROM, B.L.; LUNDÉN, A.; HOGLUND, J.; ZAKRISSON, G. Evaluation of a direct agglutination test for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cat, pig, sheep sera. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.35, p.213-216, 1994.

LUNDEN, A.; UGGLA, A. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, 357-63, 1992.

MACÊDO, V.O. Toxoplasmose. In: \_\_\_\_ CASTRO, L.P.; CUNHA, A.S.; RESENDE, J.M. **Protozooses Humanas**. Fundação BYK. 10 ed. 1994 p.153-170.

MAGALDI, C.; ELKIS, H.; PATTOLI, D.; QUIRÓZ, J.C.; COSCINA, A.L.; FERREIRA, J.M. Surto de toxoplasmose em seminário de Bragança Paulista (Estado de São Paulo). Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.1, n.2, p.141-171, 1967.

MAINAR-JAIME, R.C.; BARBERÁN, M. Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. . **Veterinary Parasitology**, v.148, p.122-129, 2007.

MARCA, M.C.; RAMOS, J.J.; LOSTE, A.; SFIEZ, T.; SANZ, M.C. Comparison of indirect immunofluorescent antibody test and modified direct agglutination test methods for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in adult sheep in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 99-103, 1996.

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**, v.117, p.15-21, 2003.

MCALLISTER, M.M. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of “subclinical” toxoplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v.132, n.3-4, p.241-247, 2005.

MCCOLGAN, C.; BUXTON, D.; BLEWETT, D.A. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non pregnant sheep and effects of subsequent challenge during pregnancy. **Veterinary Research**, v.123, p.467-470. 1988.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in

the United States. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.5, p.607-624, 1999.

MEIRELES, L.R. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo State. *Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.40, p.267–271, 2003.

MEIRELES, L.R. **Padronização e aplicações da avidéz de anticorpos IgG no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose animal**. 2005. 117p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MILLER, C.M.; BOULTER, N.R.; IKIN, R.J.; SMITH, N.C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.23-39, 2009.

MINHO, A.P.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S.M.; MARANA, E.M.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in experimentally infected pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.4, p.199-202, 2004.

MONTOYA, J. G.; BERRY, A.; ROSSO, F.; REMINGTON, J. S. The differential agglutination test as a diagnostic Aid in cases of toxoplasmic lymphadenitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.5, p.1463-1468, 2007.

MORISSETTE, N.S.; AJIOKA, J.W. The early years of *Toxoplasma* research: What's past is prologue. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.865-869, 2009.

MOURA, A.B.; OSAKI, S.C.; ZULPO, D.L.; MARANA, E.R.M. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR. Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.54-56, 2007.

OGAWA, L.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; OLIVEIRA, R.C.; VIDOTTO, O. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos da região de Londrina no Estado do Paraná. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 57-62, 2003.

OLBRICH NETO, J.; MEIRA, D.A. Soroprevalência de vírus linfotrópico de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana, sífilis e toxoplasmose em gestantes de Botucatu – São Paulo – Brasil. Fatores de risco para vírus linfotrópico de células T humanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.1, 2004.

PANADERO, R.; PAINCEIRA, A.; LÓPEZ, C.; VÁZQUEZ, L.; PAZ, A.; DÍAZ, P.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; FERNÁNDEZ, G.; LAGO, N.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Research in Veterinary Science**, v.88, n.1, p.111-115, 2010

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÈREZ-PÈREZ, V.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.33-43, 2004.

PESCADOR, C.A.; OLIVEIRA, E.C.; PEDROSO, P.M.O.; BANDARRA, P.M.; OKUDA, L.H.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.167-171, 2007.

PETTERSEN, E.K. Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.92, n.3, p.175-176, 1984.

PORTO, A.M.F.; AMORIM, M.M.R.; COELHO, I.C.N.C.; SANTOS, L.C. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes atendidas em maternidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, n.3, p.242-248, 2008.

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

REICHEL, E.M.V.; MORIMOTO, H.K.; FARIAS, G.N.; HISATSUGU, K.R.; GELLER, L.; GOMES, A.C.L.F.; INOUE, H.Y.; RODRIGUES, G.; MATSUO, T. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.6, p.519-527, 2000.

REIS, M.M.; TESSARO, M.M.; AZEVEDO, P.A..Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.28, n.3, p.158-64, 2006.

REMINGTON, J.S.; McLEOD, R.; THULLEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S.; KLEIN, J.O.; WILSON, C.B.; BAKER, C.J. (Eds.) **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006, p.947-1091.

REY, L.C.; RAMALHO, L.C. Seroprevalence of Toxoplasmosis in Fortaleza. Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, n.3, p.171-174, 1999.

ROBERTS, T.; MURREL,K.D.; MARKS, S. Economic losses caused by foodborn parasitic diseases. **Parasitology Today**, v.10, 419-423, 1994.

ROMANELLI, P.R.A.; FREIRE, R.L.B.; VIDOTTO, O.B.; MARANA, E.R.M.B.; OGAWA, L.C.; DE PAULA, V.S.O.D., GARCIA, J.L.E.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs

from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.82, p.202–207, 2007.

SHAAPAN, R.M.; EL-NAWAWI, F.A.; TAWFIK, M.A.A. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.359-362, 2008.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of American Medical Association**, v.116, p.801-807, 1941.

SABIN, A.B.; FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v.108, p.660-663, 1948.

SACKS, J.J.; ROBERTO, R.R.; BROOKS, N.F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.248, n.14, p.1728-1732, 1982.

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, p.191-198, 2001.

SILVA, A.V.; CUTOLO, A.A.; LANGONI, H. 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**, v.69, p.7-11, 2002.

SILVA, A.V.; CUNHA, E.L.P.; MEIRELES, L.R., GOTTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, p.115-119, 2003.

SILVA, K.L.M.V.; DE LA RUE, M.L. Possibilidade da transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município

de Rosário do Sul, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.892-897, 2006.

SILVA, R.C.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. **Serological differentiation between acute and chronic stages in experimental toxoplasma infection of normal and immunosuppressed rats (*Rattus norvegicus*)**. In: XIII International Congress in Animal Hygiene, 2007, Tartu. Proceedings of the XIII international Congress in Animal Hygiene, 2007. v.2 p.885-888.

SILVA, R.C.; SU, C.; LANGONI, H. **First identification of clonal type II isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil**. 10th International Congress on Toxoplasmosis. Proceedings of 10th International Congress on Toxoplasmosis. Kerkrade, 2009. p.152.

SIMPLÍCIO, A. A.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: Desafios e oportunidades. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n.39, p.07-18, 2006.

SOARES, H.S.; AHID, S.M.M.; BEZERRA, A.C.D.S.; PENA, H.F.J.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.211–214, 2009.

SOUZA, W.; DaMATTA, R.A.; ATTIAS, M. Brazilian contribution for a better knowledge on the biology of *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n.2, p.149-154, 2009.

SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; KLEIN, C.H.; RIBEIRO, L.A. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.173-177, 2005.

SUZUKI, L.A.; ROCHA, R.J.; ROSSI, C.L. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n.1, p. 62-70, 2001.

SWITAJ, K.; MASTER, A.; SKRZYPCZAK, M.; ZABOROWSKI, P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. **Clinical Microbiology and Infectious**, v.11, n.3, p.170-176, 2005.

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

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n.2, p.364-369, 2009.

THULLIEZ, P.; REMINGTON, J. S.; SANTORO, F.; OVLAQUE, G.; SHARMA, S.; DESMONTS, G. Une nouvelle réaction d' agglutination pour le diagnostic du stade évolutif de la toxoplasmose acquise. **Zoological Society of London**, v.34, n.3, p.173-177, 1986.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária, uma introdução**. Editora Roca. 6<sup>a</sup> edição. 2002. 532 p.

UCHÔA, C.M.A.; DUARTE, R.; SILVA, V.L.; ALEXANDRE, G.M.C.; FERREIRA, H.G.; AMENDOEIRA, M.R. Padronização 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**, v.32, n.6, p.661-669, 1999.

UENO, T.E.H.; GONÇALVES, V.S.P.; HEINEMANN, M.B.; DILLI, T.L.B.; AKIMOTO, B.M., SOUZA, S.L.P.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal

District, central region of Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v.41, p.547-552, 2009.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: Epidemiologia e importância da doença na Saúde Animal. **Semina Agrária**, v.13, n.1, p.66-69, 1992.

VITOR, R.W.A.; PINTO, J.B.; CHIARI, C.A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, n.2, p.147-154, 1991.

WALSH, C. P.; HAMMOND, S. E.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.46, n.5, p.73-74, 1999.

WARNEKULASURIYA, M.R., JOHNSON ,J.D., HOLLIMAN, R.E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **International Journal Food Microbiology**, v.45, p.211-215, 1998.

WHEELER, R.; WILMORE, H.; SAVVA, D. Diagnosis of ovine toxoplasmosis using PCR. **Veterinary Research**, v.126, p.249, 1990.

WILSON, M.; WARE, D.; JURANEK, D. Serologic aspects of toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association.**, v.196, n.2, p.277-281, 1990.

**A**rtigo científico

O artigo apresentado abaixo foi redigido de acordo com as normas do periódico científico “Veterinary Parasitology”.

1 **Differentiation between acute and chronic stages in toxoplasmic infection by**  
2 **modified agglutination test and DNA research of *Toxoplasma gondii* in milk from**  
3 **naturally infected ewes.**

4

5 Camossi,L.G.; Greca, H.; Corrêa, A.P.F.L.; Richini-Pereira, V.B.; Silva, R.C.; da Silva,  
6 A.V.; H. Langoni<sup>a\*</sup>

7 <sup>a</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Higiene Veterinária e  
8 Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, CEP  
9 18618-000, Brazil.

10 \*Corresponding author. Tel: +55 14 3811 6270; fax: +55 14 3811 6273

11 E-mail address: hlangoni@fmvz.unesp.br

12

13 **Abstract**

14 Toxoplasmosis is a major parasitary disease in sheep, due its importance in  
15 veterinary medicine and animal science and in public health, causing reproductive and  
16 economic losses to the herd, and also the prejudice to human health for the consumption  
17 of contaminated meat and milk, which can facilitate the zoonotic transmission. The  
18 detection of *Toxoplasma gondii* in sheep milk and the inexistence of literature  
19 describing the differentiation between acute and chronic illness in this species were the  
20 motivation for elaborating this research project. To accomplish the goal of this study,  
21 naturally infected by *T. gondii* lactating ewes were used, divided in two groups: G1,

22 serologically positive, and G2, serologically negative, each group were composed by 20  
23 ewes. The differentiation between the acute and chronic stages of the illness was made  
24 by the modified direct agglutination test (MAT) with antigens fixed with formaline  
25 (MAT-AF) and methanol (MAT-AM). The detection of the parasite in milk was made  
26 by the polymerase chain reaction (PCR) and the molecular identity of the amplified  
27 products was confirmed by sequencing.

28 **Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, natural infection, PCR, sheep, serology.

29

## 30 **1. Introduction**

31

32 *Toxoplasma gondii* is an obligate, intracellular, apicomplexan protozoan parasite  
33 widely distributed, which can infect many species of warm-blooded animals and is a  
34 significant zoonotic and veterinary pathogen (Weiss and Dubey, 2009). Toxoplasmosis  
35 in sheep is a parasitic disease of great veterinary, husbandry and public health  
36 importance, causing productive and economic losses, besides the implication in human  
37 health, as the consumption of contaminated meat and milk can facilitate the zoonotic  
38 transmission (Jittapalalong et al., 2005). The disease has major economic importance in  
39 livestock because, it is a frequent cause of early embryonic death and resorption, fetal  
40 death and mummification, abortion, stillbirth, and neonatal death in sheep (Buxton et  
41 al., 2007).

42 Sheep are important to the economy of many countries because they are an  
43 important source of meat and milk products. The Brazilian ovine flock is estimated  
44 around 15 million sheep (IBGE, 2006), destined for meat production. There is no data  
45 on the consumption ovine milk in Brazil, but the ovine milk trade market is at its very  
46 beginning, even though it is very exploited in the world.

47 Ingestion of unpasteurized goat milk is known as a source of infection in humans  
48 (Sachs et al, 1982; Chiari e Neves, 1984; Skinner et al., 1990). The excretion of

49 tachyzoites in the milk of naturally infected goats was reported by Chiari and Neves  
50 (1984). Although reports of infection are associated with goat milk, other authors  
51 declare feeding of raw milk products to other animals (and humans) might also play a  
52 role in the horizontal transmission of *T. gondii* infection (Spalding, 2005; Kijlstra and  
53 Jongert, 2008). Recently a large-scale screening of sheep farms has shown that 3.4% of  
54 the sheep farm presented *T. gondii* DNA in their milk (Fusco et al., 2007). These facts  
55 justify the concern to obtain a product harmless to human health.

56 This study was motivated by the use of sheep with natural infection by *T. gondii*,  
57 as a prerequisite for further investigations on the possible participation of this species in  
58 the epidemiology of the disease as a potential route of transmission of toxoplasmosis  
59 related to the consumption of milk from infected sheep.

60 The present study aimed to determine the *T. gondii* infection in sheep, establish  
61 the acute or chronic stage of infection, and to detect the presence of the parasite's DNA  
62 in milk samples of lacting ewes.

63

## 64 **2. Materials and Methods**

### 65 2.1. Animals and sampling

66 This study was carried out from March to October 2008 at the Experimental  
67 Edgárdia Experimental Farm -São Paulo State University, located in Botucatu  
68 (Latitude = 22°47'30" - 22°50' S; Longitude = 48°22'30" W), São Paulo State, Brazil.  
69 The experimental works were performed in the Laboratory of Researches on Zoonoses,  
70 Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine  
71 and Animal Science, São Paulo State University. This study was developed after  
72 receiving an authorization from the Animal Research Ethics Committee (CEEA),  
73 protocol number 13/2008.

74 Twenty Bergamácia-breed ewes, naturally seropositive for *T. gondii* (Group 1),  
75 and a second control group of 20 seronegative ewes presumed as uninfected animals  
76 (Group 2), were monitored clinically and serologically from the mating season until the  
77 end of lactation period. Blood samples were collected from each animal fortnightly, by  
78 jugular puncture, separated in the same day and the serum was stored at -20 °C until  
79 tested. Sheep sera were tested for anti-*T. gondii* antibodies using the modified  
80 agglutination test with antigens fixed formalin and metanol (MAT). In the present  
81 study, MAT at a cut-off value of 1:16 was used as indicative of seropositivity, sera were  
82 serially 2-fold diluted.

83 Milk samples were collected from lactating ewes, in the same intervals  
84 (fortnightly), from each sheep. For this study were collected 139 milk samples from  
85 adult lactating ewe (Bergamácia breed).

86

## 87 2.2 Serology

88 The MAT for the detection of *T. gondii* specific immunoglobulin IgG antibodies  
89 was performed as described by Desmonts and Remington (1980) with formalin and  
90 methanol fixed whole RH tachyzoites used as antigen. Sera were serially 2-fold diluted  
91 starting at 1:16, both two tests.

92

## 93 2.3. Molecular detection

94 For DNA isolation, a commercial Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA (GE  
95 Healthcare) kit was used according to the supplier's instructions. DNA concentration  
96 was measured with a spectrophotometer (NanoVue, GE Healthcare). The molecular  
97 detection was carried out by PCR using primer pair TOX4  
98 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) and TOX5

99 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) at the annealing temperature of 60°C [Ref  
100 Homan].

101 The reactions were performed in a final volume of 25µl at the following  
102 reagents: 10mM Tris HCl pH 8.0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTP, 10µmol  
103 of each primer, 0,2 unidades de *Taq* DNA polymerase and 10ng template DNA.  
104 Amplification mixture was incubated in Mastercycler Gradient (Eppendorf).

105 Aliquots of the PCR products, along with a 100 bp DNA ladder (Invitrogen),  
106 were loaded into 2% agarose gel (Invitrogen) stained with containing SYBR® safe  
107 (Invitrogen) and submitted to electrophoresis in TBE buffer (0.09 M Tris–HCl, 0.09 M  
108 boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3) for 60 min at 80 V (Electrophoresis Power Supply  
109 Model EPS 301; GE Healthcare.). The amplified DNA fragments were visualized with  
110 an image analyzer (GelDoc-IT™ Imaging System), using Vision Works®LS Software.

111 The amplicons were purified by the commercial GFX™-PCR-DNA and Gel-  
112 Band Purification kit (GE-Healthcare) kit and the sequencing reactions were carried out  
113 on both strands in a MegaBace™ 1000 (GE-Healthcare) and the reaction were  
114 performed according to DYEnamicET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE-  
115 Healthcare). The sequences were analyzed using Chromas 2.3 and Mega 4 software and  
116 compared to the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

117

## 118 2.2. Statistical analysis

119 The results of DNA detection of *T. gondii* were compared with the antibody titer  
120 in each test by G test. The same results of tests for antibodies were compared with the  
121 results of DNA detection considering as a cutoff point for MAD-AF titer 64, and MAD-  
122 16 AC titer. For all calculations were considered significant  $P < 0.05$  values.

123

124 **3. Results**

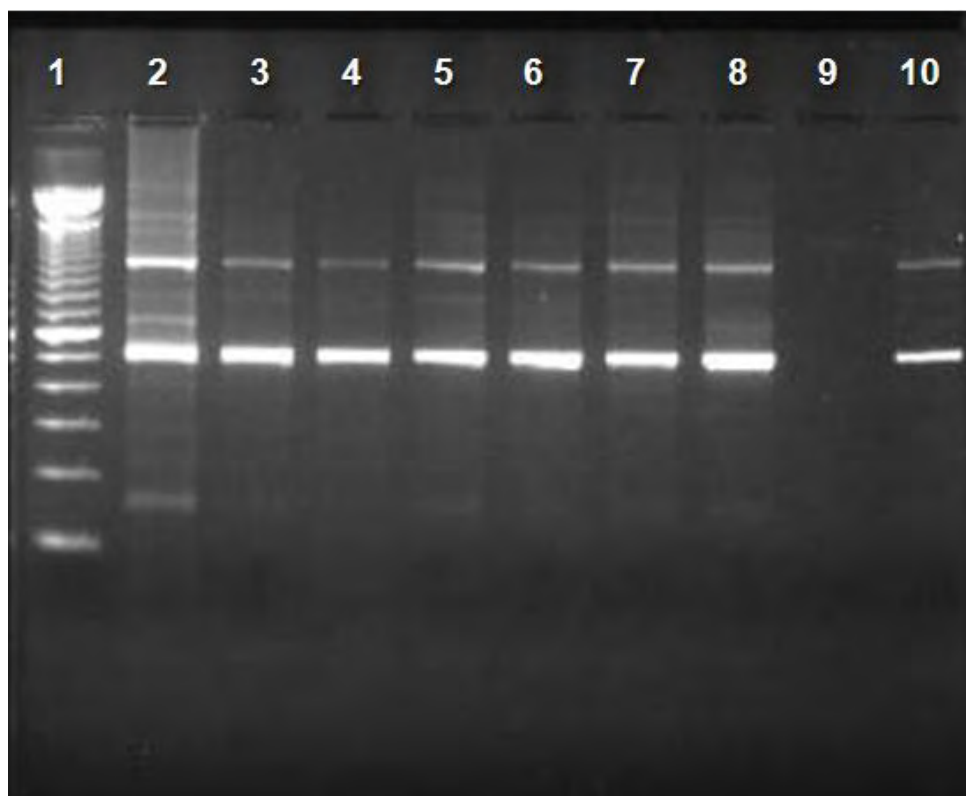
125 Molecular detection

126 Positive amplifications of predictive amplicons of *T. gondii* were detected in  
127 seven of the 139 milk samples tested. (Figure 1).

128 The molecular identities of the amplicons were confirmed by direct double-  
129 strand sequencing which showed 98% - 100% similarity with *T. gondii* DNA sequences  
130 deposited at Gen Bank (GenBank DQ779193.1).

131 A total of 70 milk samples from seropositive sheep were analyzed, *T. gondii*  
132 DNA was detected in milk from five sheep (group 1) with antibody titer 1:256. Parasite  
133 DNA were detected twice from two sheep, all out seven positive samples (Figure 1).

134 From the group of seronegative sheep, 69 milk samples were tested and the  
135 DNA from *T. gondii* was not found.



136

137 **Figure 1.** Visualization of bands of 529 base pairs, agarose gel 2%, showing amplicons  
138 of *T. gondii* in the milk samples 1) 100 bp DNA-Ladder (Invitrogen); 2-8) milk  
139 template; 9) negative control; 10) positive control. Botucatu, 2009.

140 Serology

141 The moments of the milk sampling and the result of the PCR, correlating with the  
 142 serological antibody titres of individual seropositive sheep by different serological tests,  
 143 are presented in tables 1 and 2. The dynamic of the seric antibodies titers, detected by  
 144 MAT (AM-AF) can be observed in the Figure 2, according to the moment when the  
 145 samples were collected.

146

147 **Table 1.** Absolute (n) and relative (%) frequencies of negative and positive in the  
 148 polymerase chain reaction for the detection of *T. gondii* in samples of milk from sheep,  
 149 according to the antibody titers to the method of direct agglutination antigen fixed by  
 150 formalin. Botucatu.2009.

MAT-AF	Negative PCR		Positive PCR		TOTAL	
	n	%	N	%	N	%
<b>0</b>	16	94,1	0	0,0	16	22,9
<b>16</b>	14	100,0	0	0,0	14	20,0
<b>64</b>	12	100,0	0	0	12	17,1
<b>256</b>	18	72,0	7	28,0	25	35,7
<b>1024</b>	3	100,0	0	0,0	3	4,3
<b>TOTAL</b>	63	90,0	7	10,0	70	100,0

151 Statistic: G test = 15,86; p=0,0032.

152

153

154

155

156

157

158

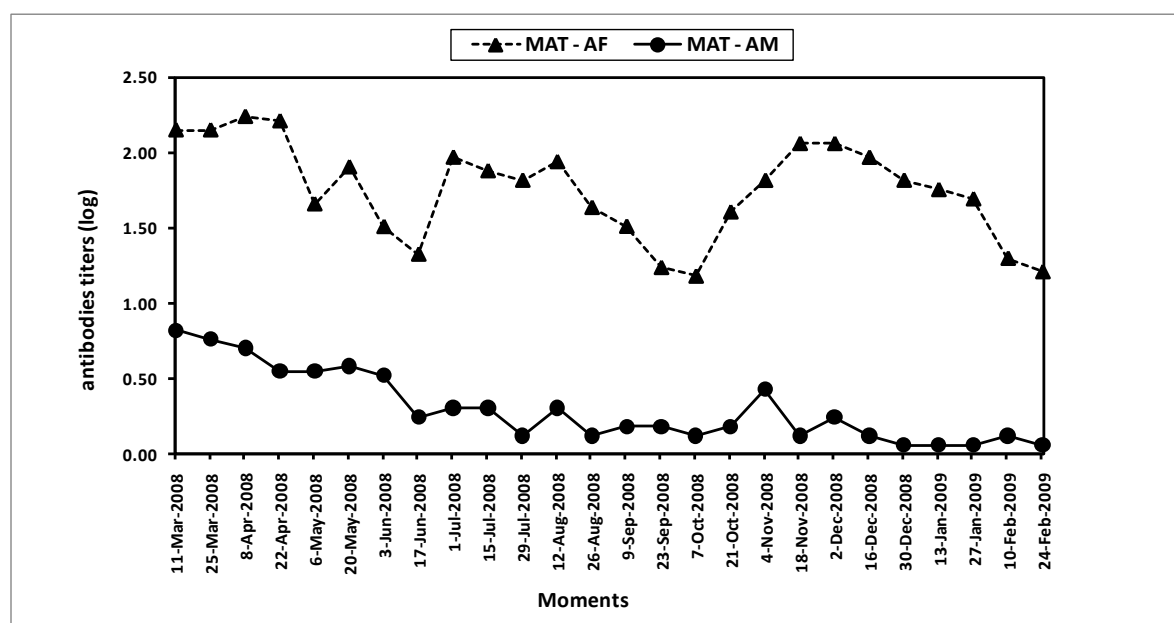
159 **Table 2.** Absolute (n) and relative (%) frequencies of negative and positive in the  
 160 polymerase chain reaction for the detection of *T. gondii* in samples of milk from sheep,  
 161 according to the antibody titers to the method of direct agglutination antigen fixed by  
 162 ethanol. Botucatu, 2009.

MAT-AM	Negative PCR		Positive PCR		TOTAL	
	n	%	N	%	N	%
0	53	91,4	5	8,6	58	82,9
16	10	83,3	2	16,7	12	17,1
<b>TOTAL</b>	<b>63</b>	<b>90,0</b>	<b>7</b>	<b>10,0</b>	<b>70</b>	<b>100,0</b>

163 **Statistic:** G test=0,63; valor de P=0,4266.

164

165



166

167 **Figure 2:** Seric anti-*T. gondii* antibodies titers dynamic, detected by the MAT (AM -  
 168 AF), in naturally infected ewes (G1). Botucatu, SP, 2010.

169

#### 170 4. Discussion

171 No clinical evidence of toxoplasmosis was observed in the sheep from the group

172 1, during the monitoring twelve months period. Seronegative animals did not

173 seroconverted during the experimental period, no antibodies against *T. gondii* has been  
174 detected by serological serological techniques used in the study.

175 In this experiment the presence of the parasite`s DNA was found in five milk  
176 samples of 20 sheep with positive serology for *T. gondii*, naturally infected. The  
177 importance of the studies in natural infections is that they portray what actually occurs  
178 in farms, value-relevant especially in family farms that use milk for subsistence of their  
179 families.

180 The excretion of tachyzoites in the milk of naturally infected goats was reported  
181 by Chiari and Neves (1984) in Brazil and some occurrence of human toxoplasmosis have  
182 been attributed to consumption of goat milk. Furthermore, an epidemiological survey  
183 carried out in the region of Belo Horizonte, MG, showed that there was a statistically  
184 significant correlation between positive serology for *T. gondii* in humans and ingestion  
185 of goat milk (Chiari et al., 1987). Thus far, clinical toxoplasmosis in humans has been  
186 associated only with the consumption of unpasteurised goat's milk (Riemann et al. 1975,  
187 Sacks et al. 1982, De Andrade et al. 1984, Skinner et al. 1990). However, it cannot be  
188 excluded that any type of milk is a potential source of infection, in particular if  
189 consumed raw (Tenter, 2009) as tachyzoites of *T. gondii* have been found in the milk of  
190 several intermediate hosts (Dubey and Beattie, 1988). By the similarity between both  
191 species it can be assumed that the sheep's milk can also be a potential source of  
192 infection to man.

193 The consumption of unpasteurised milk or milk products, whether from goats,  
194 sheep, or cows, was an unexplained risk because tachyzoites, the most likely stage  
195 present in milk, are thought to be destroyed immediately by gastric juice (Dubey et  
196 al., 1998).<sup>5</sup> However, evidence indicates that ingested tachyzoites can cause infection  
197 (Cook et al., 2000). There has also been a case of acute toxoplasmosis in a breast fed

198 infant (Bonametti et al.,1997). Presumably, milk contains tachyzoites, a part of which  
199 are not destroyed by the gastric juice because of its rapid passage through this digestive  
200 compartment (Cosoroaba, 2005).

201 Toxoplasmosis transmission by milk or fresh cheese, unpasteurized or  
202 inadequately processed, can be one of the important ways of contamination for this  
203 agent, as they are important food source in rural areas (Hiramoto, 2001).

204 A study conducted in dairy sheep in the region of Campania, Southern Italy  
205 (Fusco et al., 2007) investigated 117 properties, collecting blood and milk of 10 ewes,  
206 the property, in a total of 1170 animals. For each property, was assessed the pool of  
207 milk at ten sheep, resulting in a single sample of milk per farm, a total of 117 pools of  
208 samples. The parasite`s DNA was detected by PCR in 4 samples of milk, representing  
209 3,4% of the total analyzed, demonstrating the potential transmission from milk and  
210 dairy products come from sheep.

211 There is evidence that the changes of a disruption that accompany childbirth and  
212 lactation cause nonspecific immunosuppression, termed the phenomenon of postpartum,  
213 "spring rise", or weakened immune peripartum, whose mechanism has not been  
214 completely identified, but may be related the immune response to T lymphocyte  
215 dependent (LLYOD, 1983).

216 According to Soulsby (1987), several factors have been described in animals as  
217 the cause of immunosuppression during the peripartum period, of which the  
218 glucocorticoid hormones, prolactin and adrenocorticotropic are cited as causing the  
219 suppression of lymphocyte reactivity. We can infer, then, that the physiologic decrease  
220 in peripartum immunity is also likely to promote the resurgence of tissue cysts of *T.*  
221 *gondii* tachyzoites becoming again circulating, and can be eliminated in the milk, but

222 further studies are needed to confirm the reactivation of cysts by the phenomenon of  
223 peripartum.

224         The immunological mechanisms behind the maintenance of surveillance over the  
225 tissue cysts and possible reactivation of these are of particular interest to our study,  
226 mainly cyst reactivation and reverse conversion from bradyzoites back into tachyzoites,  
227 since the presence of parasite DNA was detected in the milk of sheep with serological  
228 profile of chronic infection. The factors that influence interconversion between the  
229 bradyzoite and the tachyzoite stages are very complex and so far poorly understood  
230 (Jones et al., 1986; Soete et al., 1993). An understanding of the mechanism of  
231 interconversion between either of these *Toxoplasma* stages would improve the control  
232 of toxoplasmic reactivation (Gross et al.,1996).

233         Pettersen (1984) demonstrated experimentally that lactating mice chronically  
234 infected with cysts excreted in breast milk, showing that despite the transfer is  
235 commonly attributed to the elimination of tachyzoites may also occur by the excretion  
236 of tissue cysts. According Hiramoto (2001), the contamination of milk by the parasite  
237 can occur endogenously, in the mammary gland, when mammary gland cells are  
238 harboring cysts of *T. gondii*. During lactation these cysts lined by the host cell  
239 membrane can be secreted by exocytosis, as occurs physiologically with the fat globules  
240 in milk released into the lumen by exocytosis of cells for milk production (DEYRUP-  
241 OLSEN e LUCHTEL, 1998). Based on these data, consideration will be given a second  
242 chance to justify the finding of DNA *T. gondii* in this study, with the possibility of  
243 excretion of cysts in the milk of sheep. This finding has epidemiological value higher,  
244 because the cysts, unlike tachyzoites, are hardly inactivated by gastric enzymes,  
245 increasing the chances of transmission to humans.

246 In the present study, the proportion of ewes that were eliminating *T. gondii* in  
247 the milk is high, whereas the serological profile, are chronically infected sheep, these  
248 data may still be underestimated, since the negative PCR results do not exclude the  
249 possibility of milk subjected to molecular analysis to be positive, since only 200 mL of  
250 the milk sample is processed in the analysis, a very small measure compared the amount  
251 of milk produced by an ewe/day, about 500 mL, is added to this figure, the milk  
252 samples were obtained at weeks merged, the every 14 days rather than daily.

253 Sequencing documented that the amplicons are treated DNA of *T. gondii*,  
254 excluding the possibility of diagnosis crossed with related protozoa.

255 The results presented, especially the detection of DNA of *T. gondii* in the milk  
256 of sheep with serological evidence of chronic infection, provide important information  
257 for future investigations.

## 258 **Acknowledgements**

259 This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo  
260 (FAPESP, Grant number 2008/07876-8). L.G. Camossi (Grant number 2008/05854-1)  
261 received financial support from FAPESP.

262

## 263 **References**

264

265 Bonametti, A.M., Passos, J.N., Koga de Silva, E.M., Macedo, Z.S., 1997. Probable

266 transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. *J. Trop. Ped.*43,

267 116.

268 Buxton, D., Maley, S.W., Wright, S.E., Rodger, S., Bartley, P., Innes, E.A., 2007.

269 *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. *Vet.*

270 *Parasitol.* 149, 25–28.

271

- 272
- 273 Camargo, M.E., 1964. Improved technique of indirect immunofluorescence for  
274 serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 6, 117-  
275 118.
- 276 Chiari, C.A., Neves, D.P., 1984. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão  
277 de leite de cabra. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 337-340.
- 278 Chiari, C.A., Lima, W.S., Antunes, C.M.F., Lima, J.D., 1987. Soro-epidemiologia da  
279 toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 39,  
280 587-609.
- 281 Cook, A.J.C., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Peterse, E., Jenum,  
282 P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T. 2000. Sources of toxoplasma  
283 infection in pregnant women: European multicentre case-control study. BMJ.  
284 321,142–147.
- 285 Cosoroaba, I. Zoonoze parazitare. Edit. First, Timisoara, 2005.
- 286 De Andrade Chiari, C., Pereira Neves, D., 1984. Toxoplasmose humana adquirida  
287 através da ingestão de leite de cabra. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 337-340.
- 288 Dubey, J.P., Beattie, C.P., 1988. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press Inc.,  
289 Boca Raton, FL, USA. 220p.
- 290 Dubey, J.P., 1998. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and  
291 bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. Parasitol. 116, 43–50.
- 292 Dubey, J.P., 2004. Toxoplasmosis—a waterborne zoonosis. Vet. Parasitol. 126, 57–72.
- 293 Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. Vet. Parasitol. 163, 1-14,
- 294 Fusco, G., Rinaldi, L., Guarino, A., Proroga, Y.T.R., Pesce, A., Giuseppina, D.M.,  
295 Cringoli, G., 2007. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region  
296 (Italy). Vet. Parasitol. 149, 271–274.

- 297 Gross, U., Bohne, W., Soète, M., Dubremetz, J.F., 1996. Development differentiation  
298 between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Today, 12,  
299 30–32.
- 300 Hiramoto, R.M., Mayrbaurl-Borges, M., Galisteo, A.J., Meireles, L.R., Macre, M.S.,  
301 Andrade Jr, H.F., 2001. Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii*  
302 strain in bovine milk and homemade cheese. Rev. Saúde Pública 35, 113-118.
- 303 IBGE. Censo agropecuário 2006. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.  
304 <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/200](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuaria.pdf)  
305 <a href="http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuaria.pdf">6/agropecuaria.pdf>
- 306 Jittapalapong, S., Sangvaranond, A., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Khachaeram, W.,  
307 Koizumi, S., Maruyama, S., 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*  
308 infection in domestic cats in Satun Province, Thailand. Vet. Parasitol. 127, 895-  
309 901.
- 310 Jones, T.C., Bienz, K.A., Erb, P., 1986. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts  
311 in astrocytes in the presence of gamma interferon. Infection and immunity, 51,  
312 147–156.
- 313 Kijlstra, A., Jongert, E., 2008. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted  
314 by meat. Int. J. Parasitol. 38, 1359-1370.
- 315 Riemann, H.P., Meyer, M.E., Theis, J.H., Kelso, G., Behymer, D.E., 1975.  
316 Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. J. Pediatr. 87, 573-576.
- 317 Sacks, J.J., Roberto, R.R., Brooks, N.F., 1982. Toxoplasmosis infection associated with  
318 raw goat's milk. J. Am. Vet. Med. Assoc. 248, 1728-1732.
- 319 Skinner L.J., Timperley, A.C., Wightman, D., Chatterton, J.M.W., Ho-Yen, D.O., 1990.  
320 Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family.  
321 Scand. J. Infect. Dis. 22, 359-361.

- 322 Soete, M., Fortier, B., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1993. *Toxoplasma gondii*: kinetics  
323 of bradyzoite–tachyzoite interconversion *in vitro*. *Experimental Parasitol.* 76,  
324 259–264.
- 325 Soulsby, E.J.L., 1987. The evasion of the immune response and immunological  
326 unresponsiveness: parasitic helminth infection infection. *Immunol. lett.* 16, 315-  
327 320.
- 328 Spalding, S.M., Amendoeira, M.R.R., Klein, C.H., Ribeiro, L.A., 2005. Serological  
329 screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South  
330 of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 173-177.
- 331 Tenter, A.M., 2009. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem.*  
332 *Inst. Oswaldo Cruz*, 104, 364-369.
- 333 Weiss, L.M., Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations *Int. J.*  
334 *Parasitol.*, 39, 895-901.