

**RENATA ARRUDA OSSANI**

**FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Toxoplasma gondii* EM REBANHOS OVINOS COM APTIDÃO LEITEIRA E DETECÇÃO DO AGENTE EM AMOSTRAS DE LEITE DA MESORREGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA.**

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Anderson  
Barbosa de Moura

**LAGES - SC  
2014**

O84f

Ossani, Renata Arruda

Frequência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em rebanhos ovinos com aptidão leiteira e detecção do agente em amostras de leite da mesorregião Oeste de Santa Catarina / Renata Arruda Ossani. – Lages, 2014.

90 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Anderson Barbosa de Moura

Bibliografia: p. 62-77

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Ovinos leiteiros. 3. RIFI.  
4. Santa Catarina. 5. Leite. 6. PCR. I. Ossani, Renata Arruda. II. Moura, Anderson Barbosa de. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: 636.3 – 20.ed.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do CAV/ UDESC

**RENATA ARRUDA OSSANI**

**FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Toxoplasma gondii* EM REBANHOS OVINOS COM APTIDÃO LEITEIRA E DETECÇÃO DO AGENTE EM AMOSTRAS DE LEITE DA MESORREGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA.**

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**Banca Examinadora:**

Orientador: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antonio Pereira de Souza  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dra. Silvia Cristina Osaki  
Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina

**Lages, SC 07/11/2014**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, ao qual sempre me deu forças.

Aos meus pais, Márcia e Manoel, por me darem a educação, me ensinando os valores, princípios e a ética da vida, e por sua paciência em me acompanhar nessa minha caminhada, amo vocês, ao meu mano Emanuel, que há dezessete anos atrás deixou meus dias mais felizes, porque quem tem um irmão nunca vai se sentir só, te amo também. Ao meu namorado, meu amor Edson pela ajuda nesta caminhada, paciência e carinho, muito obrigada, te amo.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr. Anderson Barbosa de Moura, por ter me proporcionado a realização deste projeto de mestrado, com os ovinos, muito obrigada pelo ensinamento e paciência.

A CAPES, pela concessão da bolsa de pós-graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelo apoio financeiro por meio da Chamada Pública FAPESC N<sup>o</sup> 06/2013 - Apoio a infraestrutura para grupos de pesquisa da UDESC.

A Michelle Federle, uma amiga que ganhei para a vida, meu braço direito nesta pesquisa. Nossa quantas horas juntas, coletas, análises, cuidados com os camundongos, suor e lágrimas e chegamos ao resultado juntas, torço muito por você. Um muito obrigada seria pouco, te adoro!

Ao Paulo Henrique Exterchoter Weiss, um amigo que construí, desde o primeiro momento que o conheci já se mostrou uma ótima pessoa, chama-se empatia, sem você a parte molecular do meu projeto não teria



acontecido, muito obrigada pelo conhecimento que você me passou, por todas as horas destinadas ao meu projeto, pelas risadas, pelo chá com conversa jogada fora, muito obrigada mais uma vez, porque você meu amigo vai longe, New York será pouco, foco fé e força!

As gurias Jú, Márcia e Natascha pela amizade e auxílio, muito obrigada.

Aos bolsistas João e Humberto muito obrigada pela ajuda prestada.

Aos animais utilizados neste experimento, sem eles nada teria acontecido.





“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar. Porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

(Cora Coralina)



## RESUMO

OSSANI, Renata Arruda. **Frequência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em rebanhos ovinos com aptidão leiteira e detecção do agente em amostras de leite da mesorregião Oeste de Santa Catarina.** 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Parasitologia Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

A toxoplasmose ovina apresenta implicações sanitárias importantes por causar desordens reprodutivas nesta espécie e por ser uma zoonose. Os objetivos do presente trabalho foram determinar a ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* e detectar o agente no leite de rebanhos ovinos leiteiros na região Oeste de Santa Catarina. De março a julho de 2013, foram colhidas 298 amostras de sangue de ovinos leiteiros em duas propriedades em Chapecó, SC. As amostras foram processadas pela RIFI ( $\geq 1:64$ ). Do total, 37 (12,4%) foram positivas para *T. gondii* com títulos de 1:64 (32) e 1:256 (cinco). Para a pesquisa da presença do agente no leite, foram coletadas 128 amostras de sangue das ovelhas em período de lactação, que foram processadas pela RIFI ( $\geq 1:64$ ) das quais 42 (32,8%) foram positivas, com títulos 1:64 (26), 1:256 (12), 1:1024 (três) e 1:4096 (um). Para a pesquisa do parasito no leite foram empregadas as técnicas do bioensaio em camundongos (22 amostras de leite de oito ovelhas com títulos de anticorpos contra *T. gondii*  $\geq 256$ ) e da PCR, para a



pesquisa de *T. gondii* nos cérebros dos camundongos inoculados no bioensaio e também diretamente do leite (108 amostras obtidas de 42 ovelhas soropositivas ( $\geq 64$ ) em diferentes períodos de lactação - 40, 90 e 120 dias). Foram utilizados os primers SAG2R4 e SAG2F4. Das 42 ovelhas lactantes e soropositivas para *T. gondii* foi possível detectar DNA do parasito no leite de 30,95% (13/42) dos animais. No bioensaio não foi possível o isolamento, entretanto DNA do agente foi detectado no cérebro dos camundongos inoculados com leite de oito ovelhas (uma amostra do 45º dia de lactação e sete na coleta do dia 90). Diretamente do leite, DNA do parasito foi detectado em amostras da segunda coleta (90 dias de lactação) em cinco animais. As amostras positivas na PCR foram sequenciadas e os resultados confirmaram identidade  $\geq 97\%$  com o antígeno de membrana gene P22 de *T. gondii*. Verificou-se que a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos com aptidão leiteira, do Oeste de Santa Catarina é menor quando comparada com a observada em ovinos de corte no Estado e que o DNA de *T. gondii* está presente no leite de ovelhas, representando uma possível via de transmissão para o ser humano, por meio do consumo do leite “in natura” e/ou derivados, além da possibilidade da transmissão via lactogênica para cordeiros.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Ovinos leiteiros; RIFI; Santa Catarina; leite; PCR.



## ABSTRACT

OSSANI, Renata Arruda. **Frequência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em rebanhos ovinos com aptidão leiteira e detecção do agente em amostras de leite da mesorregião Oeste de Santa Catarina.** 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Parasitologia Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

Ovine toxoplasmosis has important implications by causing reproductive disorders in this species and for being a zoonosis. This study aimed to determine the occurrence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and to detect the agent in the dairy sheep flocks in western of state of Santa Catarina. From March to July 2013, 298 blood samples were collected from dairy sheep on two farms in Chapecó, SC. Samples were processed by IFI ( $\geq 1: 64$ ). From the total, 37 (12.4%) were positive for *T. gondii* with titers of 1:64 (32) and 1: 256 (five). For the animals selection, which were studied looking for the presence of the agent in the milk, 128 blood samples from sheep in lactation period were collected, which were processed by IFI ( $\geq 1: 64$ ) of which 42 (32.8%) were positive, with titers 1:64, (26) 1 256 (12), 1: 1024 (three) and 1: 4096 (one). For the detection of parasites in milk, techniques of mouse bioassay were employed (22 milk samples from eight sheep with antibody titers against *T. gondii*  $\geq 256$ ) and PCR, for the detection of *T. gondii* in the brains of mice inoculated bioassay and also directly from milk (108 samples from 42 seropositive sheep ( $\geq 64$ ) in different lactation periods - 40, 90 and 120 days).





SAG2R4 SAG2F4 primers were used. In 42 ewes in lactation period and seropositive for *T. gondii* it was possible to detect DNA of the parasite in the milk of 30.95% (13/42) of the animals. The isolation was impossible in bioassay, however the agent DNA was detected in mice brains inoculated with milk from eight sheep (a sample of the 45th day of lactation and seven in the collection of 90th day). The parasite DNA was detected directly from the milk in samples of the second collection (90 days of lactation) in five animals. Positive PCR samples were sequenced and the results confirmed  $\geq 97\%$  identity with the membrane antigen P22 gene of *T. gondii*. The results showed that the occurrence of antibodies against *T. gondii* in dairy sheep in western of state of Santa Catarina is lower when compared with that observed in steak sheep in the state and that the DNA of *T. gondii* is present in the milk of sheep, representing a possible source of infection to humans through the consumption of milk "in natura" and / or derivatives, besides the possibility of lactogenic transmission to lambs.

**Key-words:** *Toxoplasma gondii*; Dairy sheep; IFI; Santa Catarina; milk; PCR



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mesorregião Oeste de Santa Catarina – origem das amostras de sangue e de leite de Ovinos leiteiros ..... 38
- Figura 2** - Eletroforese em gel de agarose 2%. Visualização das bandas (332 pb) de DNA de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite de ovelha [1 = padrão de tamanho molecular (100bp); 2 a 6 = amostras de leite positivas; 7 = controle negativo (água ultrapura) e 8 = controle positivo (cepa VEG de *T. gondii*)]. ..... 50
- Figura 3** - Eletroforese em gel de agarose 2%. Visualização das bandas (332 pb) de DNA de *Toxoplasma gondii* em amostras de cérebro de camundongos do bioensaio [1 e 10 = padrão de peso molecular (100bp); 2 a 9 e 11 = cérebros positivos; 12 = controle negativo (água ultrapura) e 13 = controle positivo (cepa VEG de *T. gondii*)] ..... 55



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite de ovelhas da mesorregião Oeste de Santa Catarina (Bioensaio e PCR). Lages, 2014 .. 51



## LISTA DE ABREVIATURAS

bp	Pares de bases
mL	Mililitro
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPM	Rotações por minuto
µL	Microlitro





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
3.1 GERAL .....	36
3.2 ESPECÍFICOS .....	36
<b>4 TRABALHO 1- FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Toxoplasma gondii</i> EM OVINOS COM APTIDÃO LEITEIRA NO OESTE DE SANTA CATARINA.....</b>	<b>37</b>
4.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	37
4.1.1 Comitê de Ética em experimentação animal .	37
4.1.2 Colheitas das Amostras de Sangue .....	37
4.1.3 Reação de Imunofluorescência Indireta .....	38
4.1.4 Análise Estatística .....	39
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.3 CONCLUSÃO.....	42
<b>5 TRABALHO 2- DETECÇÃO DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM AMOSTRAS DE LEITE OVINO .....</b>	<b>43</b>
5.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
5.1.1 Comitê de Ética em Experimentação Animal	43
5.1.2 Colheitas das Amostras de Leite para Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	43
5.1.3 Detecção do <i>T. gondii</i> em Amostras de Leite Ovino (PCR) .....	44
5.1.4 Detecção do <i>T. gondii</i> em Amostras de Leite Ovino (Bioensaio em Camundongos).....	46
5.1.5 Sequenciamento .....	47
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	48



5.3 CONCLUSÃO.....	61
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>78</b>



# 1 INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose, é um parasito intracelular obrigatório e possui uma ampla distribuição mundial. Por acometer animais e o ser humano, tem grande importância na saúde pública, por se tratar de uma zoonose, e na medicina veterinária, pois acarreta perdas econômicas no rebanho.

A ovinocultura no Brasil possui alto potencial de crescimento já que a produção atual não atende a demanda do mercado consumidor, gerando a necessidade de melhorias nas técnicas de exploração (FAOSTAT, 2012).

Entre 2004 e 2011 o rebanho ovino brasileiro aumentou 14,77%, passando de 15.057.838 cabeças em 2004 para 17.668.063 cabeças em 2011 (IBGE, 2013).

No Brasil os primeiros ovinos com aptidão leiteira foram trazidos em 1992. A raça introduzida foi a Lacaune, da França, que atualmente está bem adaptada às condições de clima e alimentação no Sul do Brasil. Uma fêmea Lacaune pode produzir 4,5 litros de leite/dia no pico da lactação, que ocorre ao redor dos 30 dias pós-parto, durando um período de lactação de aproximadamente 150 dias. O estado de Santa Catarina tem uma população de ovelhas leiteiras estimada em 2.800 cabeças, com uma produção diária de 4,5 litros de leite por ovelha no pico da lactação (Dados Pessoais).

Apesar do leite cru não ser a principal via de transmissão da toxoplasmose, ele pode veicular o parasito durante a fase aguda da doença, portanto deve ser ingerido somente após a pasteurização ou fervura (SUARÉZ-HERNÁNDEZ et al., 2005).

Normalmente o leite de ovelha é consumido na forma de queijos, iogurte, sorvetes e, em menor proporção, na forma de leite fluido. Possui o dobro do rendimento na produção de queijo, em comparação com o leite de vaca. O iogurte é mais fino, mais leve e em torno de 50% mais nutritivo. O leite de ovelha possui alto teor de cálcio, muito sólidos totais e é rico em Ácido Linoléico Conjugado (CLA), que lhe confere propriedades terapêuticas, além de ter um teor reduzido de lactose, o que favorece as pessoas que possuem intolerância a esta proteína (CASA DA OVELHA, 2013).

Considerando-se a relevância da enfermidade, tanto nos animais, quanto na saúde pública, e a carência de dados referentes à infecção toxoplásmica em ovinos com aptidão leiteira na região Oeste do estado de Santa Catarina, realizou-se o presente estudo, com os objetivos de estimar a soroprevalência da infecção por *T. gondii*, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e a detecção do agente em amostras de leite, por meio do bioensaio em camundongos e da PCR.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O *Toxoplasma gondii*, única espécie existente no seu gênero, é um parasito de ampla distribuição mundial, que infecta animais endotérmicos e seres humanos, causando a doença chamada de toxoplasmose (AMENDOEIRA et al., 1999). Os hospedeiros definitivos são os felídeos, sendo que estes eliminam os oocistos nos fezes, uma das formas infectantes da doença (DUBEY e JONES, 2008).

A primeira descrição do *T. gondii* foi na Tunísia, no ano de 1908, por Nicole e Manceaux em um roedor (*Ctenodactylus gondi*) e no mesmo ano, no Brasil, por Splendore, em um coelho (*Oryctolagus cuniculus*). A descrição dos sinais clínicos, lesões e formas típicas da toxoplasmose, ocorreu em 1942, nos Estados Unidos por Olason e Monlux, em um ovino.

É um protozoário de ciclo de vida heteroxeno facultativo e pode infectar todas as espécies de animais homeotérmicos, incluindo mamíferos, aves e o ser humano. Apresenta alta prevalência em muitas áreas do mundo, tendo importância nas medicinas humana e veterinária (TENTER et al., 2000).

O *T. gondii* pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Família Sarcocystidae e Subfamília Toxoplasmatinae (MONTROYA e LIESENFELD, 2004). No seu ciclo evolutivo, o *T. gondii* apresenta três formas principais, 1) taquizoítos, de rápida multiplicação e que ocorrem na infecção aguda; 2) bradizoítos, localizados em cistos teciduais e presentes na infecção crônica e 3) os oocistos, produto final da reprodução sexuada que ocorre somente no trato digestivo dos felídeos, seus hospedeiros definitivos (MILLER et al., 1972) sendo

então eliminados para o meio juntamente com suas fezes onde, após esporulação, tornam-se infectantes.

Os oocistos resistem a grandes variações de temperatura. Vários autores relatam viabilidade de oocistos após a exposição a  $-21^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 28 dias,  $30^{\circ}\text{C}$  por 107 dias,  $40^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (DUBEY et al., 1970; FRENKEL et al., 1972) e  $50^{\circ}\text{C}$  por uma hora (DUBEY, 1998). Os oocistos também demonstraram resistência ao etanol 95% e ao ácido acético 5% por uma hora (FRENKEL et al., 1972), formalina 10% por 48 horas, ácido sulfúrico 63% e dicromato 7% por 30 minutos (DUBEY et al., 1970), lauril sulfato de sódio 0,1% por 24 horas e amônia líquida 5,5% por uma hora (ITO et al., 1975).

Após a ingestão pelos hospedeiros intermediários, a parede do oocisto ou do cisto se rompe por ação enzimática liberando as formas infectantes (esporozoítos e bradizoítos, respectivamente) no trato digestório. Eles então penetram nas células epiteliais do intestino onde, após multiplicação, transformam-se em taquizoítos. A disseminação ocorre pelo rompimento das células infectadas e conseqüente invasão das células vizinhas. A infecção distribui-se praticamente por todo organismo através da circulação sanguínea, se difundindo de uma célula a outra ou, ainda, o parasita pode ser disseminado por macrófagos, linfócitos ou granulócitos, além de circular na corrente sanguínea na sua forma livre.

Os taquizoítos são encontrados somente em células nucleadas, com maior afinidade pelos sistemas muscular e nervoso, onde se multiplicam com rapidez até destruí-las.

Com o avanço da infecção, o hospedeiro começa a desenvolver resposta imune que atua sobre a multiplicação dos taquizoítos que passam a se dividir



mais lentamente, sendo então denominados bradizoítos e que se encontram confinados num cisto no interior da célula parasitada, protegidos contra a ação do sistema imune e de drogas. É a infecção latente ou crônica, que pode se perpetuar por vários anos (SWANGO et al., 1989).

A forma evolutiva de taquizoítos já foi encontrada e relatada na saliva, urina e no leite de caprinos (VITOR et al., 1991), no sêmen de bovinos (SCARPELLI et al., 2009), de ovinos (TEALE et al., 1982; AGANGA et al., 1988; LOPES, 2007) e de suínos (MOURA et al., 2007), no leite de cabra (CHIARI; NEVES, 1984) e de ovelha (CAMOSSO, 2010).

O *T. gondii* desde 1954, é apontado com um dos fatores de abortamento na espécie ovina, sendo a maior causa de problemas reprodutivos desta espécie (SILVA et al., 2003). A contaminação da espécie ovina com o *T. gondii* normalmente acontece pela ingestão de água ou de alimento (pastagem, ração, silo) contaminados com oocistos que estão presente nas fezes de felídeos (ESCOPELLI, 2004; PUGH, 2004).

Em vários estados brasileiros existem estudos relatando a sorologia de *T. gondii* em rebanhos ovinos, que apontam entre 7,7% e 54,6% a prevalência (GARCIA et al., 1999; GONDIM et al., 1999; SILVA e LANGONI, 2001; MEIRELES et al., 2003; OGAWA et al., 2003; ROMANELLI et al., 2007; SOARES et al., 2009; LOPES et al., 2010).

No Brasil as taxas de infecção em ovinos de corte são significativas, acometendo 39% dos ovinos abatidos no Estado do Rio Grande do Sul; 30,4% no Estado de São Paulo e, no Estado da Bahia, 18,7% das amostras revelaram resultados positivos (QUEIROLO, 2009). No estado do Paraná, na cidade de Londrina, em um estudo com ovinos, foi observada uma soroprevalência de

54,6% para *T. gondii*, com títulos variando entre 64 a 65.536 (OGAWA et al., 2003)

Fatores de risco associados à infecção em ovinos parecem estar relacionados com alimentação, sexo, sistema de criação e a presença de gatos na fazenda (MASALA et al., 2003; KLUN et al., 2006; SAMRA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009; LOPES et al., 2010).

Clinicamente a toxoplasmose ovina é assintomática, porém ovelhas não imunes que adquirem a infecção durante a gestação podem desenvolver distúrbios reprodutivos causados pelo *T. gondii*, ocorrendo graves problemas econômicos.

O diagnóstico de toxoplasmose pode ser realizado através de testes sorológicos (RIFI, ELISA, MAT), necropsias de fetos abortados, exames histopatológico e imunoistoquímico e da reação em cadeia da polimerase (PCR) (PEREIRA-BUENO et al., 2004).

Em humanos, a toxoplasmose é considerada uma das enfermidades parasitárias mais comuns do mundo (TONELLI, 2000). O *T. gondii* infecta mais de um bilhão de pessoas ao redor do mundo (EL-ON e PEISER, 2003), sendo sua infecção em adulto geralmente assintomática, com o parasito persistindo por toda a vida no hospedeiro. Em recém-nascidos, infectados congenitamente, e em indivíduos imunodeprimidos, a infecção se manifesta de forma mais grave, provocando doenças oculares e psiquiátricas (DUBEY, 1996; PASSOS et al., 2000; SORRENTINO, 2005).

Nos últimos anos o interesse sobre a prevalência da toxoplasmose em pequenos ruminantes, devido ao seu papel na transmissão do protozoário ao ser humano através do consumo de produtos de origem animal, tem aumentado (UENO et al., 2009; LOPES et al., 2010; OPSTEEGH et al., 2010; ALVARADO-ESQUIVEL et al.,

2011; ROSSI et al., 2011). O agente pode ser transmitido pelo consumo de carne crua ou mal cozida e de leite “in natura”, procedentes de animais contaminados (DUBEY, 1980; SACKS et al., 1982; CHIARI e NEVES, 1984; SKINNER et al., 1990; VITOR et al., 1991; LUFT e REMINGTON, 1992; DUBEY, 1996; FIGUEIREDO et al., 2001).

A maioria dos casos de toxoplasmose humana é atribuída ao consumo de carnes cruas ou água e alimentos infectados por oocistos. Contudo, Skinner et al. (1990) enfatizam que o consumo de leite contaminado pode causar sérios distúrbios clínicos em crianças imunossuprimidas e gestantes.

A presença de traquizoítos de *T. gondii* foi relatada no leite de ovelhas, cabras, vacas e camundongos (RAGOZO et al., 2009; REMINGTON et al., 2001). Apesar do leite cru não ser a principal via de transmissão da toxoplasmose, ele pode veicular o parasito durante a fase aguda da doença, portanto deve ser ingerido somente após a pasteurização ou fervura (SUARÉZ HERNÁNDEZ et al., 2005). Tenter et al. (2000) relataram soroconversão para a infecção por *T. gondii* em crianças que tinham o leite caprino como base da alimentação.

Apesar da toxoplasmose clínica em seres humanos ter sido associada ao consumo de leite de cabra não pasteurizado, através da excreção de taquizoítos no leite, relatada por Chiari e Neves (1984), a similaridade biológica que existe entre ambas as espécies, permite supor que o leite de ovelha também seja considerado uma potencial via de transmissão para seres humanos (CAMOSSO et al., 2011). Assim, torna-se evidente a importância de pesquisa do *T. gondii* em amostras de leite ovino.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Verificar a frequência de anticorpos contra *T. gondii* em rebanhos ovinos leiteiros na região Oeste de Santa Catarina e detectar o agente em amostras de leite ovino.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a soroprevalência por meio da detecção de anticorpos da classe IgG em amostras de sangue de ovelhas com aptidão leiteira do Oeste de Santa Catarina.

Identificar fatores de risco para a infecção toxoplásmica em ovinos com aptidão leiteira da mesorregião Oeste de Santa Catarina.

Detectar a presença do agente em leite ovino por meio das técnicas de bioensaio e da PCR.

## **4 TRABALHO 1 - FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Toxoplasma gondii* EM OVINOS COM APTIDÃO LEITEIRA NO OESTE DE SANTA CATARINA**

### **4.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1.1 Comitê de ética e experimentação animal**

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do CAV/UDESC sob protocolo - 1.03.12.

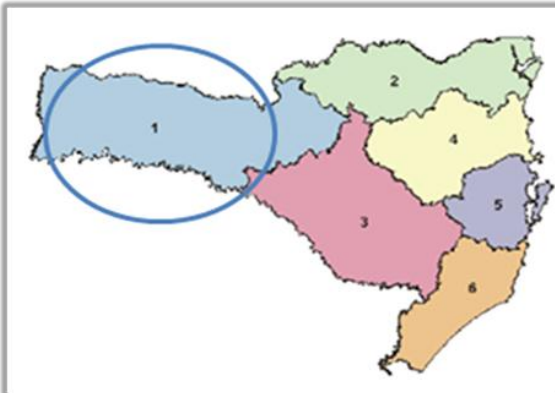
#### **4.1.2 Colheitas das amostras de sangue para RIFI**

Foram colhidas, no período de fevereiro a abril de 2013, 298 amostras de sangue de ovinos (128 fêmeas em lactação da raça Lacoune, 155 fêmeas secas e 15 machos) em duas propriedades na mesorregião Oeste do estado de Santa Catarina (figura 1). A amostragem foi constituída considerando-se uma prevalência esperada de 50%, erro de 5,0% e nível de confiança de 90% (OPAS, 1979). Na data da colheita do sangue foi aplicado questionário epidemiológico (Anexo IV) contemplando manejo e possíveis fatores de risco como raça, sexo, idade, dieta principal, contato com gatos, contato com outros animais, fonte de água, problemas reprodutivos e/ou neurológicos, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III).

O sangue (cinco mL) foi obtido por venopunção da veia jugular, recolhido em tubos a vácuo, sem anticoagulante, devidamente identificados e mantidos

sob refrigeração (4 a 8°C) durante o deslocamento para o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages/SC. No laboratório, o sangue foi centrifugado a 2.500RPM durante 15 minutos para obtenção dos soros, que foram armazenados a -20°C até realização dos exames.

**Figura 1** – Mesorregião Oeste de Santa Catarina – origem das amostras de sangue e de leite de Ovinos leiteiros.



Fonte: [cepa.epagri.sc.gov.br/agroturismo/mapa\\_meso.htm](http://cepa.epagri.sc.gov.br/agroturismo/mapa_meso.htm)

#### 4.1.3 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Os soros foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii*, conforme técnica descrita por Camargo (1964) utilizando-se como antígenos taquizoítos da cepa RH do protozoário. Os soros dos ovinos foram diluídos em PBS, utilizando 1:64 como ponto de corte (FIGLIUOLO et al., 2004). As amostras positivas foram submetidas a titulação por

diluição sequencial, em múltiplos de quatro, até a máxima diluição reagente.

#### 4.1.4 Análise estatística

Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente pelos testes exato de Fisher e qui-quadrado ( $p \leq 0,05$ ) (R Development Core Team, 2009) para correlacionar os resultados da sorologia com as variáveis analisadas (Raça, Sexo, Idade, Dieta Principal, Contato com gatos, Contato com outros animais, Fonte de Água, Problemas Reprodutivos e/ou neurológicos).

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de ovinos avaliados sorologicamente por meio da RIFI para pesquisa de anticorpos da classe IgG contra *T. gondii*, 12,41% (37/298) foram positivos. Os títulos de anticorpos foram 1:64 (32), 1:256 (5).

Apesar da ocorrência de possíveis reações cruzadas, muitos autores utilizam a diluição 1:16 como ponto de corte para a RIFI (CHIARI et al., 1985; CHIARI et al., 1987; SERRA-FREIRE et al., 1994; MAINARD et al., 2003; SILVA et al., 2003; UZÊDA et al., 2004). No presente trabalho foram considerados positivos os soros ovinos que apresentam reação na diluição  $\geq 1:64$  (FIGLIUOLO et al., 2004). Esta diluição aumenta a especificidade da reação, diminuindo assim, possíveis resultados falso positivos, sendo utilizada frequentemente por vários autores (VAN DER PUIJE et al., 2000; CAVALCANTE, 2004; FIGLIUOLO et al., 2004).

A amostragem foi constituída somente por animais adultos para evitar a detecção de anticorpos colostrais (WEST et al., 1998) que poderia influenciar na prevalência observada.

Verificou-se que a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos com aptidão leiteira, do Oeste de Santa Catarina, é menor quando comparada com aquela observada em ovinos de corte no estado de Santa Catarina (56,9% - SAKATA et al., 2012 e 57,86% - Dados não publicados).

No Brasil, em diversas regiões, estudos demonstram soroprevalência em ovinos de corte variando de 7,7% a 61% (GARCIA et al., 1999; GONDIM et al., 1999; SILVA et al., 2001; MEIRELES et al., 2003; OGAWA et al., 2003; ROMANELLI et al., 2007; SOARES et al., 2009; LOPES et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2013; ROSSI et al., 2011). A amplitude dos resultados relatados pode ser consequência da idade, do manejo aplicado aos animais amostrados, do meio ambiente e das técnicas sorológicas empregadas.

No estado do Rio de Janeiro, em um estudo em três regiões, com caprinos e ovinos, utilizando a técnica de RIFI, a prevalência de anticorpos IgG contra *T. gondii* foi de 38,05% (137/360) nos ovinos e de 29,12% (60/206) nos caprinos, com títulos variando de 1:64 à 1:256 para ambas as espécies (LUCIANO et al., 2011).

Em estudo realizado no México com rebanho ovino de corte, utilizando a técnica modificada de aglutinação (MAT) encontrou-se soropositividade de 15,1% (77/511), verificando que houve relação com o aumento da idade, o que indica uma transmissão pós-natal (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2011).

Em rebanho ovino, no estado de Minas Gerais, foi realizada a pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* e *N. caninum*, e os resultados demonstraram positividade de



61% para *T. gondii* e de 23% para *N. caninum* (ROSSI et al., 2011).

Rossi e Cabral (2008) determinaram a frequência de anticorpos contra *T. gondii* em 155 amostras de soros ovinos de corte em duas propriedades rurais, no município de Uberlândia, Minas Gerais. Pela RIFI constatou-se 46,4% de animais soropositivos e, através do ELISA, 63,2%.

Os estudos acerca da prevalência da toxoplasmose em ovinos exclusivamente com aptidão leiteira, são escassos. Valores superiores aos do presente estudo foram relatados na Grécia por Tzanidakis et al. (2012), que observaram, utilizando a técnica de ELISA, alta prevalência (48,6%) em rebanhos ovinos leiteiros. Esses autores identificaram o manejo intensivo ou semi-intensivo, ao qual os animais eram submetidos, como fator de risco. O oferecimento de concentrado e de água de poço (ou seja, água não corrente) favoreceria a contaminação destes por oocistos. Ainda, a alta densidade poderia contribuir para uma maior taxa de infecção entre esses animais. Também na Grécia, Diakou et al. (2013), detectaram 53,71% de positividade (ELISA) em ovelhas de leite. Embora concordem com Tzanidakis et al. (2012), sugerindo que o manejo semi-intensivo possa ser o responsável pelos altos índices observados, os autores não fizeram análise de fatores de risco. Na região da Toscana na Itália, investigando 33 rebanhos de ovinos leiteiros, através da técnica de RIFI ( $\geq 1:64$ ), Cenci-Goga et al. (2013) encontraram 33,3% % de positivos. Esses autores não identificaram os fatores de risco para a infecção.

Na Argentina, em um estudo com rebanho ovino leiteiro (RIFI, 1:50), anticorpos contra *T. gondii* foram detectados em 17,3% (122/704) dos animais (HECKER

et al., 2013). Esse resultado, embora semelhante ao do presente estudo (12,4%), foi obtido com o emprego de um ponto de corte menor e, ao contrário do observado no presente estudo, a maioria das amostras positivas para *T. gondii* (42,6% - 52/122) apresentavam títulos de anticorpos  $\geq 1:400$ , indicando uma infecção ativa.

Não foi observada correlação ( $P > 0,05$ ) entre a sorologia positiva para *T. gondii* e as variáveis analisadas (raça, sexo, idade, dieta principal, contato com gatos, contato com outros animais, fonte de água, problemas reprodutivos e/ou neurológicos). Embora 91,9% dos animais positivos sejam fêmeas, a distribuição dos sororreagentes de acordo com o sexo (13% dos machos e 12,4% das fêmeas foram positivos) não configura associação, e somente 7,72% dos animais avaliados eram do sexo masculino, podendo este resultado (maioria dos positivos serem fêmeas) ser reflexo da amostragem. Com relação à idade, embora 94,6% (35/37) dos animais positivos tinham entre um e dois anos, este grupo representou 89,93% dos animais testados (268/298), não indicando associação. As demais variáveis analisadas apresentaram resultados distribuídos de forma uniforme.

### 4.3 CONCLUSÃO

A soroprevalência de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos leiteiros da mesorregião Oeste do estado de Santa Catarina é de 12,41%, menor que aquela observada em ovinos destinados ao abate, no estado de Santa Catarina, e em ovinos com aptidão leiteira em outras regiões do mundo.

## 5 TRABALHO 2 - Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite ovino

### 5.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.1.1 Comitê de ética e experimentação animal

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do CAV/UDESC sob protocolo - 1.03.12.

#### 5.1.2 Colheitas das amostras de leite para detecção de *Toxoplasma gondii*

Após o estudo de prevalência (Trabalho 1), foram coletadas amostras de sangue de 128 ovelhas durante o período de lactação, que foram processadas por meio da RIFI, conforme descrito anteriormente.

Foram coletadas, no total, 108 amostras de leite (42, 37 e 29 amostras aos 45, 90 e 120 dias de lactação, respectivamente) de 42 ovelhas lactantes positivas para *T.gondii*, com títulos de anticorpos de 1:64 (26), 1:256 (12), 1:1024 (três) e 1:4096 (uma), por ordenha manual e individual, para a pesquisa do agente por meio da PCR e do bioensaio. As amostras foram colhidas em frascos estéreis, identificados e mantidos sob refrigeração (4° a 8°C) até a chegada ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages/SC.

No laboratório foram retiradas duas alíquotas (3 mL), armazenadas a -20C° para a realização da PCR. O

restante da amostra foi utilizado para a realização do bioensaio.

### 5.1.3 Detecção do *T. gondii* em amostras de leite ovino (PCR)

Para a extração de DNA foi utilizado o método de fenol-clorofórmio, baseado nos protocolos de Ausubel et al. (1999) com modificações. Às amostras de leite (250 µL) e da cepa VEG de *T. gondii* (250 µL), utilizada como controle positivo, foram adicionadas o tampão de extração calculado para um volume final de 500µL (Tris HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%) e 10µL de proteinase K.

Após homogeneização, as amostras foram incubadas durante a noite em banho-seco a 37°C. Na sequência foi adicionado fenol tamponado e as amostras foram agitadas por inversão, delicadamente, por 10 minutos, e então centrifugadas sob refrigeração (12.000 rpm/5 min / 4° C). Na sequência, procedeu-se à recuperação do máximo de sobrenadante (fase aquosa), evitando-se a contaminação com fenol.

Em seguida, foi adicionado fenol (250µL) e clorofórmio (250µL) às amostras, que foram novamente agitadas por inversão por 10 minutos, e então centrifugadas (12.000 rpm/5min) recuperando-se o máximo de sobrenadante.

Adição de clorofórmio, em seguida foi homogeneizado e invertido por 10 minutos, e então centrifugado (12.000 rpm/5min), recuperando-se o máximo de sobrenadante, sendo este o volume final de DNA obtido da amostra.

O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e acrescentado o acetato de sódio 3M

(250µL), para ocorrer a precipitação, e duas vezes e meia o volume de isopropanol 100% gelado (625µL). Após a homogeneização, as amostras foram mantidas a -20°C por uma noite.

As amostras foram centrifugadas a 4°C (14.000rpm/30 min). O sobrenadante foi desprezado e adicionado 500µL de etanol a 70% gelado. A centrifugação foi repetida por duas vezes. O sobrenadante foi descartado e os microtubos ficaram em posição invertida, até secarem completamente, em temperatura ambiente. Depois de secas, as amostras foram eluídas com 30µL de água ultrapura, mantidas em temperatura ambiente até quantificação do DNA através do Nanodrop® (Anexo I).

A técnica de PCR foi realizada utilizando-se 4µl do DNA extraído adicionado à 21µl de uma mistura de 3,0mM de cada Primer, 1,0mM de dNTPs, 1,0mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,2U de Taq DNA polimerase. A amplificação do DNA do parasito foi realizada em 35 ciclos em um termociclador, sob as seguintes condições: cinco minutos a 94°C para desnaturação em um ciclo único, seguindo-se 35 ciclos de um minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a 60°C para anelamento e um minuto a 72°C para extensão, seguido por uma extensão final de sete minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com “gel red” e fotodocumentados. Foi utilizado o DNA da cepa VEG de *T. gondii* como controle positivo, e água ultrapura como controle negativo da PCR (MOURA et al., 2011). Foram utilizados os primers SAG2R4 (59GCATCAACAGTCTTCGTTGC39) e o SAG2F4 (59GCTACCTCGAACAGGAACAC39) que amplificam um segmento de DNA de 332 Kd (HOWE, 1997).

#### 5.1.4 Detecção do *T. gondii* em amostras de leite ovino (Bioensaio em camundongos)

Das 108 amostras de leite obtidas, utilizaram-se 23, provenientes de oito ovelhas lactantes (Tabela 1), selecionadas por apresentarem maiores títulos de anticorpos [1:256 (seis), 1:1024 (um) e 1:4096 (um)], foram utilizadas no bioensaio.

Para realização do bioensaio foram empregados camundongos albinos Swiss, ambos os sexos, com idade superior a dois meses, provenientes do Biotério da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC).

As amostras de leite foram centrifugadas a 2.500 rpm, por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado antibiótico [Benzilpenicilina benzatina 3.000,000UI, Benzilpenicilina procaína 1.500.000UI, Benzilpenicilina potássica 1500.000UI, Diidroestreptomicina base (sulfato) 1.250mg e Estreptomicina base (sulfato) 1.250mg], na dose de 0,5mL/2mL amostra. Após breve homogeneização manual, cada amostra foi dividida em duas partes iguais (aproximadamente 1,0 mL) e inoculadas intraperitonealmente em dois animais, que foram devidamente identificados (ácido pícrico) e mantidos em caixas apropriadas, com água e ração “ad libitum”.

Os camundongos inoculados foram observados diariamente para a verificação dos sinais clínicos da infecção aguda. Após oito semanas os sobreviventes foram eutanasiados (deslocamento cervical, conforme princípios de Bem Estar Animal) e destes foram colhidos sangue, diretamente do coração, para a realização da RIFI, e órgãos (coração, pulmão, rins, fígado, cérebro e músculo esquelético). O cérebro foi dividido em três

alíquotas: uma encaminhada, com os demais órgãos, para o Laboratório de Patologia para realização de histopatológico (HE); outra foi utilizada para a pesquisa de cistos cerebrais de *T. gondii*, pela técnica de “squash”, que consiste em colocar um fragmento de tecido (cérebro) entre uma lâmina e uma lamínula de microscopia e observar, após compressão manual, em microscópio óptico, se há a presença de cistos, e uma última alíquota foi armazenada para a realização da PCR, conforme descrito anteriormente.

### 5.1.5 Sequenciamento

Das amostras (leite e cérebro) positivas na PCR, o DNA foi purificado e ligado ao pGem Easy Vector® seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 1µL de pGem, 1µL de T4 DNA ligase, 7µL do produto da PCR purificado e 1µL de água ultrapura. Estes foram ligados por 16 horas a 16°C e posteriormente transformados em DH10B cálcio competentes. As colônias foram triadas diretamente por PCR e as positivas foram multiplicadas em meio líquido e posteriormente extraído o DNA plasmidial para o sequenciamento.

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LacTad) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP, utilizando o sequenciador automático ABI 3730XL (Genetic Analyze). Os DNA-moldes 250ng foram marcados utilizando-se 2,5pmol do primer T7 promoter AAT ACG ACT CAC TAT AGG e 3mL do reagente BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) em um volume final de 10mL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador

com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 min, seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 55°C por 5 seg e 60°C por 4 min. Os produtos precipitados foram diluídos em 10mL de formamida, desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. As sequências foram analisadas pela ferramenta NucleotidBlast®, disponível em:

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), utilizando os parâmetros de “Highly similar sequences (megablast)”.

## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 42 ovelhas lactantes e soropositivas para *T. gondii* DNA do parasito foi detectado no leite de 13 (30,95%) dos animais e em 13 (12,04%) de 108 amostras de leite.

Diretamente do leite, o agente foi detectado somente nas amostras da segunda coleta (90 dias de lactação) em cinco animais. Das amostras das primeira (42) e terceira (29) coletas de leite, em nenhuma foi detectado DNA de *T. gondii*.

Por meio do bioensaio, DNA do agente foi detectado no cérebro dos camundongos inoculados com leite de todas as oito ovelhas (uma na primeira coleta, dia 45, e sete na segunda coleta, dia 90) (Tabela 1).

Todas as amostras apresentaram identidade entre 97-100% com o antígeno de membrana gene P22 de *T. gondii* (GenBank: AB667972.1.) – Anexo II

Na presente pesquisa optou-se por trabalhar com animais naturalmente infectados. Estudos em condição de infecção natural são importantes, pois refletem o que

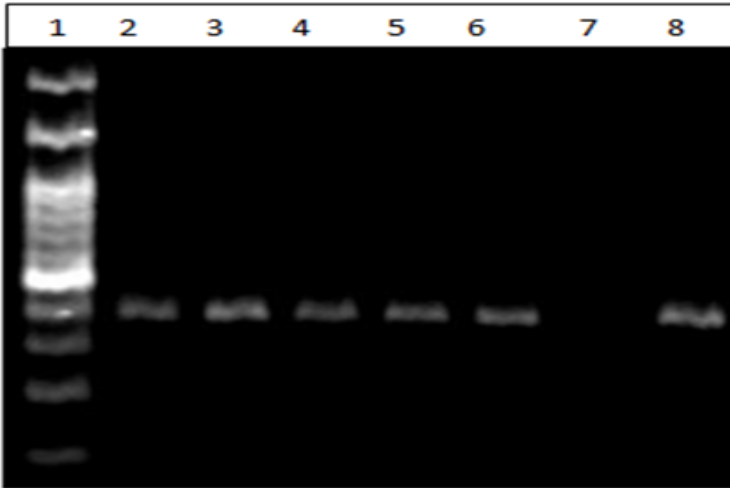


realmente acontece nas propriedades (CAMOSSO et al., 2011).

A técnica de PCR foi empregada para pesquisa do agente no leite, pois, mesmo não demonstrando taquizoítos ou cistos viáveis, é um bom indicador da presença do parasito no material analisado (MANCIANTI et al., 2013). Ainda, Moura et al. (2007) mostraram que a detecção de *T. gondii*, por meio da PCR, apresenta vantagens sobre os métodos tradicionais (bioensaio). Em adição, outros relatos mostram boa correlação entre a PCR e o bioensaio (HOMAN et al., 2000; DEHKORDI et al., 2013).

Das 108 amostras de leite analisadas diretamente pela PCR, referentes às três coletas realizadas durante o os diferentes períodos de lactação (45, 90 e 120 dias), cinco (4,63%) foram positivas para *T. gondii* (Figura 2). O baixo número de amostras positivas pode estar relacionado à sensibilidade da técnica, proporcional a quantidade da amostra utilizada para a extração de DNA (OPSTEEGH et al., 2010). No presente estudo foram utilizados 250µL de leite de cada uma das amostras analisadas.

**Figura 2** – Eletroforese em gel de agarose 2%. Visualização das bandas (332 pb) de DNA de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite de ovelha [1 = padrão de molecular (100bp) ; 2 a 6 = amostras de leite positivas; 7 = controle negativo (água ultrapura) e 8 = controle positivo (cepa VEG de *T. gondii*)].



Fonte: Próprio autor.

Camossi et al. (2011) analisaram (PCR) 69 amostras de leite de ovelhas soronegativas e não constatararam a presença do agente e, por isso, no presente estudo, *T. gondii* foi pesquisado somente no leite de ovelhas soropositivas. Entretanto, Bezerra et al. (2103), em Pernambuco, Brasil, detectaram o DNA de *T. gondii* em 15 amostras de leite de cabras naturalmente infectadas, das quais somente cinco apresentavam anticorpos (RIFI,  $\geq 1:64$ ) contra o agente. A explicação dos autores para o ocorrido (animais soronegativos, mas com presença de DNA do agente no leite) é que estes animais poderiam estar na fase inicial da infecção e os níveis de anticorpos circulantes talvez não fossem suficientes para serem detectados na sorologia. Nenhum

teste sorológico é prova definitiva da infecção e a soroconversão envolve diversos fatores (DUBEY e FRENKEL, 1998).

**Tabela 1.** Detecção de *Toxoplasma gondii* (Bioensaio e PCR) em amostras de leite de ovelhas, da mesorregião Oeste de Santa Catarina, coletadas aos 45, 90 e 120 dias de lactação, (coletas 1, 2 e 3).

Número	Número Ovin	RI FI	BIOENSAIO			PCR DO LEITE		
			Coleta 1 n/S/PCR c	Coleta 2 n/S/PCR c	Coleta 3 n/S/PCR c	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
1	2	1:2 56	2/-/ +	2/-/	2/-/	-	-	-
2	3	1:1 024	2/-/	2 <sup>1</sup> /-/ +	2/-/	-	-	-
3	42	1:2 56	NR	NR	NR	-	+	-
4	5	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
5	6	1:6 4	NR	NR	NR	-	NR	NR
6	7	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
7	8	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
8	110	1:6 4	NR	NR	NR	-	+	-
9	10	1:6 4	NR	NR	NR	-	NR	NR
10	11	1:2 56	2 <sup>1</sup> /0/-	2 /0/ +	2/0/-	-	-	-
11	13	1:2 56	2/0/-	2/0/ +	2 <sup>1</sup> /0/-	-	-	-
12	14	1:2 56	NR	NR	NR	-	-	-
13	17	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
14	19	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
15	39	1:1	NR	NR	NR	-	+	-

## Continuação

16	23	024 1:2 56	NR	NR	NR	-	-	-
17	24	1:4 096	2/0/-	2 <sup>1</sup> /0/ +	NR	-	-	NR
18	28	1:2 56	2/0/-	2/0/ +	2/0/-	-	-	-
19	31	1:2 56	NR	NR	NR	-	-	-
20	32	1:6 4	NR	NR	NR	-	NR	NR
21	102	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
22	91	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
23	131	1:2 56	2/0/-	2 <sup>1</sup> /0/ +*	2/0/-	-	-	-
24	61	1:1 024	NR	NR	NR	-	-	-
25	86	1:6 4	NR	NR	NR	-	+	-
26	67	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
27	54	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
28	52	1:6 4	NR	NR	NR	-	NR	NR
29	79	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
30	99	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
31	45	1:6 4	NR	NR	NR	-	NR	NR
32	147	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
33	56	1:2 56	2/0/-	2/0/ +	2 <sup>1</sup> /0/-	-	-	-
34	102	1:2 56	NR	NR	NR	-	-	NR
35	120	1:6 4	NR	NR	NR	-	NR	NR
36	136	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
37	150	1:6 4	NR	NR	NR	-	NR	NR
38	149	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-

continuação

39	129	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
40	78	1:6 4	NR	NR	NR	-	+	-
41	124	1:6 4	NR	NR	NR	-	-	-
42	133	1:6 4	NR	NR	NR	-	NR	NR

---

Fonte: Próprio autor.

n: número de camundongos inoculados com leite

S: +/- = Resultado pesquisa cistos cerebrais por meio da técnica de "Squash"

PCRc: +/- = Resultado da PCR dos cérebros dos camundongos inoculados com leite (\* = dois camundongos com cérebro positivo na PCR)

1: camundongo veio a óbito durante o bioensaio.

NR = não realizado

Do total de 46 camundongos inoculados com as amostras de leite, cinco morreram ao longo do bioensaio. As mortes foram provocadas por canibalismo, não sendo possível pesquisar a presença de formas evolutivas de *T. gondii* nestes. Dos 41 camundongos sobreviventes, nenhum apresentou sinais clínicos da infecção aguda e todos foram eutanasiados oito semanas PI para a pesquisa de cistos e coleta de sangue para sorologia.

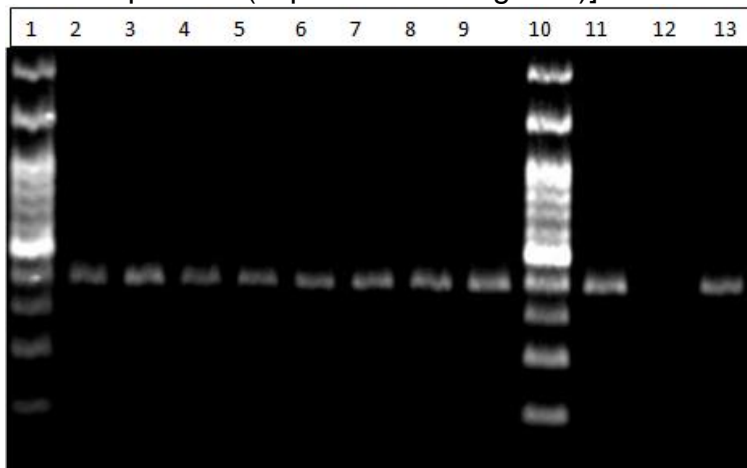
Em nenhum dos camundongos inoculados foi verificada a presença de cistos pela metodologia de "squash". Este resultado deve-se, provavelmente, à baixa concentração de taquizoítos neste fluido (leite), insuficiente para causar doença clínica nos camundongos e/ou induzir a formação de cistos cerebrais em quantidade necessária para sua detecção pela técnica de "squash". No bioensaio, os resultados podem ser considerados positivos quando se detecta o parasito (taquizoítos no exsudato peritoneal ou cistos cerebrais, revelados pela técnica de "squash" ou pela histopatologia neste e em outros tecidos como fígado,

pulmão e musculaturas estriada e cardíaca dos camundongos inoculados), seu DNA (nos mesmos tecidos) e/ou anticorpos contra *T. gondii*.

Todos os camundongos foram soronegativos para *T. gondii* (RIFI,  $\geq 1:64$ ). Este resultado pode ser reflexo da baixa carga parasitária encontrada no leite, da virulência da cepa e da resposta imune individual dos animais que podem gerar níveis de anticorpos não detectáveis na diluição de 1:64, estabelecida como “cut off” no presente trabalho, a fim de evitar falsos positivos. O fenômeno denominado pró-zona (RICHTZENHAIN e SOARES, 2006), segundo o qual a positividade de uma reação sorológica depende de proporções ótimas entre antígeno e anticorpo, também pode influenciar os resultados obtidos no presente estudo. Outros autores (NAVARRO et al., 1992, TREVISANI, 2013) empregaram 1:16 como ponto de corte para a infecção toxoplásmica em camundongos. Ainda, Rosa et al. (2001) e Trevisani (2013) observaram alguns camundongos inoculados no bioensaio que, mesmo apresentando cistos cerebrais e/ou taquizoítos, não soroconverteram, enquanto que outros foram soropositivos (RIFI, 1:16), porém sem a detecção de cistos teciduais (TREVISANI, 2013). Divergências entre resultados de isolamento do agente pelo bioensaio e sorologia dos camundongos inoculados também foram observadas por Holsback et al. (2012) e Cademartori et al. (2014). Dubey (2010), ao estudar a toxoplasmose em roedores e pequenos mamíferos, citou que o método utilizado para a pesquisa direta ou indireta de *T. gondii* em roedores é considerado crítico.

DNA do protozoário (Figura 3) foi detectado no cérebro de nove dos 41 camundongos inoculados no bioensaio de todas as oito ovelhas testadas, demonstrando que as amostras de leite continham o parasito, possivelmente na forma de taquizoítos.

**Figura 3** – Eletroforese em gel de agarose 2%. Visualização das bandas (332 pb) de DNA de *Toxoplasma gondii* em amostras de cérebro de camundongos do bioensaio [1 e 10 = padrão de tamanho molecular (100bp) ; 2 a 9 e 11 = cérebros positivos; 12 = controle negativo (água ultrapura) e 13= controle positivo (cepa VEG de *T. gondii*)].



Fonte: Próprio autor.

No presente estudo 30,95% dos animais (13/42) eliminaram *T. gondii* no leite. Resultado superior ao observado por Camossi et al. (2011), em São Paulo, que identificaram 25% (5/20) das ovelhas excretando *T. gondii* pelo leite. Em jumentas, valores superiores foram observados por Haridy et al. (2010), no Egito, e por Mancianti et al. (2014), na Itália, que relataram 46,3% e 50% dos animais excretando o protozoário no leite, respectivamente.

Em 12,04% (13/108) das amostras de leite ovino, no presente estudo, DNA de *T. gondii* foi detectado. Resultados semelhantes aos obtidos por Camossi et al. (2011), em São Paulo, e Moura et al. (2011), no Sul da

Bahia, que relatam 10% (7/70) e 10,5% (21/200) das amostras de leite de ovelhas com a presença do parasito. Resultado também similar, porém em cabras, foi relatado por Mancianti et al. (2013) que detectaram DNA de *T. gondii* (nested PCR) em 13% (10/77) das amostras de leite de animais naturalmente infectados, na Itália. Valores inferiores foram relatados por Fusco et al. (2007), na Itália, e por Tavassoli et al. (2013), no Irã, que encontraram 3,4% e 4,6%, respectivamente, das amostras de leite de ovelhas com a presença de *T. gondii*.

*T. gondii* já foi isolado e/ou detectado de diversos fluidos, em diferentes espécies animais, experimental e naturalmente infectados utilizando técnicas de bioensaio e/ou pesquisa do DNA do parasito (PCR). Poucos são os estudos envolvendo leite ovino.

Os trabalhos demonstram que taquizoíto é a fase evolutiva normalmente presente no leite e, embora possam ser inativados pelo suco gástrico, Cook et al. (2000) apresentaram resultados que indicam que a ingestão de leite cru e/ou seus derivados, pode causar infecção humana. Isto é possível se estes penetrarem na mucosa oral e/ou faríngea antes de atingir o estômago (RIEMANN et al., 1975; SACKS et al., 1982). Dubey (1998) demonstrou que taquizoítos podem resistir até duas horas em soluções de pepsina e tripsina e que gatos podem adquirir a infecção com a ingestão de grande número de taquizoítos. Além disso, Walsh et al. (1999) observaram que taquizoítos mantêm-se viáveis no leite caprino de três até sete dias a 4°C, indicando o risco de consumo “in natura” do produto. Ainda, em leite de vaca, artificialmente infectado, trofozoítos (SAARI e RÄISÄNE, 1974) e cistos (HIRAMOTO et al., 2001) de *T. gondii* permaneceram viáveis e, possivelmente, constituem fonte de infecção para o ser humano. Uma



hipótese, não avaliada, pode ser que a gordura do leite confira certa proteção ao taquizoíto de *T. gondii* frente à ação dos sucos gástricos.

Mancianti et al. (2013), na Itália, detectaram DNA de *T. gondii* (nested PCR) em 13% (10/77) das amostras de leite de cabras soropositivas, naturalmente infectadas, de uma população total estudada de 127 animais dos quais 60,6% foram positivas (MAT,  $\geq 1:20$ ).

No Cairo, Egito, em animais utilizados para trabalho, Haridy et al. (2010) revelaram *T. gondii* (metodologia não descrita) no leite de sete (46,3%) de 15 jumentas prenhas. Mancianti et al. (2014), na mesma espécie, detectaram DNA do parasito em leite de três jumentas (*Equus asinus*), saudáveis, naturalmente infectadas, na região da Toscana, Itália. Os autores concluíram que a presença de DNA do *T. gondii* no leite sugere que a ingestão de leite cru de animais soropositivos pode ser uma potencial via de transmissão para o ser humano quando o consumo de leite “in natura” de jumenta é indicado, por razões nutricionais e terapêuticas.

No Irã, Dehkordi et al. (2013) isolaram e/ou detectaram *T. gondii* do leite de cabras, ovelhas, búfalas, vacas e camelas, pelos métodos de cultivo celular, bioensaio em gatos e técnicas de PCR e relataram que 51 de 889 amostras de leite (5,73%) continham o parasito (tanto no cultivo celular quanto no bioensaio em gatos). Pela PCR, os resultados revelaram índice ligeiramente inferior: 46 amostras positivas (5,17%). A espécie caprina foi a que apresentou maior taxa de contaminação (10%).

Toxoplasmose humana por ingestão leite cru de cabra (SKINNER et al., 1990) já foi registrada, inclusive no Brasil (CHIARI e NEVES, 1984) e, em Minas Gerais, Chiari et al. (1987) encontraram correlação entre a

infecção humana e o consumo de leite caprino. Embora epidemiologicamente esses relatos não tenham impacto, em termos de saúde humana representam uma preocupação, mesmo os casos isolados. Além disso, a similaridade entre as espécies caprina e ovina permite supor que o mesmo possa ocorrer com o leite ovino.

Ainda, a contaminação de leite ovino com taquizoítos de *T. gondii* não deve ser menosprezada, pois alguns queijos caseiros, produzidos a partir desta matéria prima, são normalmente consumidos frescos e podem representar um risco para a saúde humana se forem produzidos a partir de leite não pasteurizado (FUSCO et al., 2007).

No presente estudo, a maioria dos animais possivelmente apresenta a infecção na fase crônica, conforme demonstram os resultados da sorologia. Das cinco ovelhas das quais foi detectado DNA do agente, diretamente do leite, três apresentaram títulos de anticorpos contra *T. gondii* de 1:64, uma 1:256 e a última, 1:1024. Dos oitos animais, dos quais as amostras de leite foram positivas por meio da PCR do cérebro dos camundongos inoculados no bioensaio, somente dois apresentam títulos de anticorpos compatíveis com infecção ativa ( $\geq 1024$ ), porém sem manifestações clínicas da enfermidade no momento da colheita das amostras. Estes resultados demonstram então que ovelhas, mesmo saudáveis, podem excretar o parasito no leite.

No Brasil, Camossi et al. (2011) detectaram DNA de *T. gondii* no leite de 10% (7/70) de ovelhas naturalmente infectadas, na fase crônica (conforme demonstrou a curva sorológica) da enfermidade.

Ao contrário, Vitor et al. (1991) relataram que cabras inoculadas com taquizoítos da cepa C4 eliminaram *T. gondii* pela saliva, urina e leite, na fase

aguda. Somente em uma amostra de leite os autores demonstraram o parasito na fase crônica da infecção (434 DPI). Esses autores deduziram que cistos presentes na glândula mamária podem ser rompidos durante a ordenha e seriam os responsáveis pela infecção uma vez que os taquizoítos são eliminados por um período muito curto da fase aguda. Os resultados de Bezerra et al. (2013), em cabras, indicam que também na fase inicial da infecção *T. gondii* pode estar presente no leite.

A presença do agente no leite pode ser efeito de alterações fisiológicas sob o sistema imune, na época do parto, que favoreceriam a conversão de bradizoítos em taquizoítos (processo de interconversão que pode ter origem em diversos fenômenos de ordem imunológica, principalmente imunidade celular) e, desta forma, poderiam atingir o leite (CAMOSSO et al., 2011).

Costa e Langoni (2010) recuperaram DNA de *T. gondii* em amostras de leite de ratas, experimentalmente infectadas, tanto na fase aguda quanto crônica da infecção.

No presente trabalho, DNA de *T. gondii* foi observado em amostras de leite de 13 animais somente em uma das três coletas de leite avaliadas ao longo do período (45, 90 e 120 dias de lactação) não caracterizando intermitência. Powell et al. (2001) detectaram (PCR) e/ou isolaram (Bioensaio) *T. gondii* em amostras de leite de cinco de seis gatas, experimentalmente infectadas com cistos de diferentes cepas do parasito, de forma intermitente. Esses resultados, segundo os autores, poderiam estar relacionados com o volume das amostras ou a liberação esporádica do parasito. Ainda, a presença de *T. gondii* no leite das gatas ao longo de três semanas da lactação pode ser responsável pela

infecção de gatinhos que nascem saudáveis, mesmo congenitamente infectados, mas adoecem e morrem. Mantendo-se as diferenças entre as espécies, o mesmo talvez possa ocorrer com cordeiros.

Tavassoli et al. (2013), no Irã, encontraram DNA de *T. gondii* em 16 (4,63%) e três (1,07%) amostras de leite de 345 e 280 ovinos e caprinos, respectivamente, infectados naturalmente. Menores índices de infecção das cabras, em relação às ovelhas, podem ser atribuídos à diferença na suscetibilidade ao *T. gondii* e aos hábitos alimentares de cada espécie (BAHRIENI et al., 2008).

Em leite de ovelha, Fusco et al. (2007), na Itália, encontraram 3,4% das amostras com presença de DNA de *T. gondii*, por meio da PCR, utilizada para amplificar o gene B1, e os resultados foram confirmados por sequenciamento. Os autores utilizaram um “pool” composto por amostras de leite de 10 animais em cada uma das 117 propriedades avaliadas.

No Sudão, continente africano, Ishag et al. (2006) detectaram *T. gondii* no leite de duas de três camelas infectadas experimentalmente ( $5 \times 10^5$  oocistos por animal, via oral, cepa não informada). No isolamento (por meio de bioensaio em camundongos) foram observados cistos e taquizoítos nos tecidos e fluídos dos camundongos inoculados com o leite das camelas. Também foi constatada a infecção dos bezerros de camelo, que possivelmente contraíram o parasito via ingestão do leite, pois os mesmos soroconverteram para *T. gondii* entre sete e nove dias após a inoculação das camelas e apresentaram enfartamento de linfonodos mesentéricos, inguinal e subescapular, petéquias hemorrágicas em cérebro e pulmão além da presença de cistos teciduais no cérebro e de taquizoítos em pulmão, fígado, rim e coração.

### 5.3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que *T. gondii* pode ser excretado, possivelmente na forma de taquizoítos, no leite de ovelhas naturalmente infectadas e saudáveis, representando uma possível fonte de infecção para o ser humano, por meio do consumo do leite “in natura” e/ou derivados, além da possibilidade de transmissão via lactogênica para cordeiros.

## 6 REFERÊNCIAS

AGANGA, A.O. et al. Comparative experimental transmission studies with Nigerian isolates and TS-I strain of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Journal of Animal Production Advances**, v.8, p.104-120, 1988.

ALVARADO-ESQUIVEL, C. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Durango State, Mexico. **Journal Parasitology**, v. 98, p. 271-273, 2011.

AMENDOEIRA, M.R.R. et al. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**, v. 1, p. 15-35, 1999.

AMENDOEIRA, M.R.R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v.155, p. 224-225, 1995.

AUSUBEL, F.M. et al. **Short protocols in molecular biology**. 4 ed. New York: Wiley, p. 2-7, 1999.

BAHRIENI, M. et al. Risk Factors Analysis Associated with Seropositivity to *Toxoplasma gondii* in Sheep and Goats in Southeastern Iran Using Modified Agglutination Test (MAT). **Iranian Journal of Parasitology**, v. 3, p.38-43, 2008.

BEZERRA, M.J. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 2, 2013.

CADEMARTORI, B.G. et al. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.203, p.207-211, 2014.

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

CAMOSSI, L.G. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v.177, p.256–61, 2011.

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***. 2010. 131p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

CASADA OVELHA. **Leite de Ovelha**. Disponível em: <<http://www.casadaovelha.com.br/leite-de-ovelha>>

CAVALCANTE, A.C.R. et al. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. **Revista Small Ruminant**, v. 69, p. 79-82, 2007.

CAVALCANTE, A.C.R. **Toxoplasmose Caprina no Ceará: Soroepidemiologia e Caracterização de Cepas de *Toxoplasma gondii***. 2004. 129 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

CENCI-GOGA, BT. et al. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. **BMC Veterinary Research**, v.9, p. 9-25, 2013.

CHIARI, C.A. et al. Soro-epidemiologia da Toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia**. v. 39, p.587-609, 1987.

CHIARI, C.A. et al. Reações de imunofluorescência indireta e de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.37, p.121-129, 1985.

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

COOK, A.J. et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. **British Medical Journal**, v.15, p.142-7, 2000.

COSTA, V.M; LANGONI, H. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected Wistar female rats. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.16, p.368-374, 2010.

DEHKORDI, F.S. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR



methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, p. 120-125, 2013.

DIAKOU, A. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 387-390, 2013.

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p.65-70, 1996.

DUBEY, J.P. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.267-299, 1998.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses Public Health**, v.57, p.60-73, 2010.

DUBEY, J.P; SHARMA, S.P. Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v.66, p.111-114, 1980.

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

DUBEY, J.P. et al. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of Experimental Medicine**, v.132, p.636-662, 1970.

EDVINSSON, B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, p.131-136, 2006.

EL-ON, J.; PEISER, J.; EL-ON, J. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. **Harefuah**, v.142, p. 55-77. 2003.

ESCOPELLI, K.S. **Avaliação sorológica de anticorpos da classe IgG para *Toxoplasma gondii* em soros de ovinos da região da Grande Porto Alegre/RS, através das técnicas de hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI)**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 18/08/2014.

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

FIGUEIREDO, J.F. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the Indirect Haemagglutination, Immunofluorescence and Immunoenzymatic Tests in the Region of Uberlândia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.687-692, 2001.

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

FRENKEL, J. et al. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. **Journal of Infectious Diseases**, v.126, p. 664-673, 1972.

FUSCO, G. et al. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 271–274, 2007.

GARCIA, J.L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos 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.et al. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273-276, 1999.

GUIMARÃES, L.A. et al.Prevalence and risk factors associated with anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in sheep from Bahia state, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veteterinária**, v.22, p. 220-224, 2013.

HARIDY, F.M. et al. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in working donkeys and donkey's milk in Greater Cairo, Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.40, p.459-464, 2010.

HECKER, Y. P. et al. First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy sheep from Humid Pampa, Argentina. **Tropical Animal Health and Production**, v.45, p.1645-1647, 2013.

HIRAMOTO, R.M. et al. Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Revista Saúde Pública**, v.35, p.113–118, 2001.

HOLSBACK, L. et al. Serologic and molecular diagnostic and bioassay in mice for detection of *Toxoplasma gondii* in free ranges chickens from Pantanal of Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,v. 32,p. 721-726,2012.

HOMAN, W.L. et al. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p.69-75, 2000.

HOWE, D.K. et al. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411-1414, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**, 2011. Capturado 26/04/2014. On line. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>.

ISHAG, M.Y. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the milk of experimentally infected lactating she-camels. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.5, p.456-458, 2006.

ITO, S. et al. Detection and confirmation of *Toxoplasma* oocysts in the soil. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.37, p.549-554, 1975.

KLUN, I. et al. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. **Veterinary Parasitology**, v.135, p. 121-131, 2006.

LOPES, W.D.Z. **Aspectos da infecção toxoplásmica no sistema reprodutor de ovinos (*Ovis aries*) machos experimentalmente infectados.** 2007. 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

LOPES, W.D.Z. et al. 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, p.104-106,2010.

LUCIANO, D.M. et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose em caprinos e ovinos de três municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p.569-574, 2011.

MANCIANTI, F. et al. Seroprevalence, Detection of DNA in Blood and Milk, and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in a Goat Population in Italy. **BioMed Research International**, v.1, p.1- 6, 2013.

MANCIANTI, F. et al. Detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* DNA in the blood and milk of naturally infected donkeys (*Equus asinus*). **Parasites and Vectors**, v.7, p.165, 2014.

MAINARD, R.S. et al. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no Estado de São Paulo.

**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.759-761, 2003.

MASSALA G. et al. Survey of ovine and caprino toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia Italy. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.15-21, 2013.

MEIRELES, L.R. et al. 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.

MILLER, N.L. et al. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal Parasitology**, v. 58, p. 928-937, 1972.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Seminar**, v.363, p.1975-1976, 2004.

MOURA, A.B. et al. *Toxoplasma gondii* no sêmen de suínos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.430-434, 2007.

MOURA, R.L.S. et al. Identificação de *Toxoplasma gondii* em leite de ovelhas do Sul da Bahia, In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 38, 2011.

NAVARRO, I.T. et al. *Toxoplasma gondii* isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 13, p. 32-34, 1992.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une ecorda a corps de *Leishmania* (ou du ecorda voisins) du gondi.

**Comptes Rendus Academy Science**, v.147, p. 763-766.1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une protozoaire nouveau du gondii, *Toxoplasma*. **Archives de L'institut Pasteur de Tunis**.v.2, p. 216-218, 1909.

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

OLAFSON, P.; MONLUX, W.S. *Toxoplasma* infection in animals. **Cornell Veterinary Medicine Research**, v.32, p.316-326, 1942.

OPAS. Organizacion Panamericana de la Salud. **Bioestadística**: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires: Organizacion Panamericana de la Salud, v.18, 1979.

OPSTEEGH, M. et al. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 193–201, 2010.

PASSOS, L.N. et al. Toxoplasmosis encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.42, p.141-145,2000.

PEREIRA-BUENO, J. et al. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.33-43, 2004.

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

POWELL, C.C. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p.29-33, 2001.

PUGH, D.G. **Clinica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca,p. 528, 2004.

QUEIROLO, M.T.C. Toxoplasmose é assunto serio. **Revista O Berro**, v.119, p. 120-122, 2009. R DEVELOPMENT CORE TEAM (2009). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: < <http://www.R-project.org>.> Acesso em: 18/08/2014.

RAGAZO, A.M.A. et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from brazil. **Journal Parasitology**, v.95, p. 323-326, 2009.

REMINGTON, J.S. et al. Recent developments for diagnosisof toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.941-945, 2001.

RICHTZENHAIN, L.J; SOARES, R.M. Técnicas sorológicas e de biologia molecular. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Org.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, v. 60, p. 967-979,2006.

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



ROMANELLI, P.R. et al. 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.

ROSA, C. et al. Comparação das técnicas de imunohistoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 68, p.13-17, 2001.

ROSSI, G.F.; CABRAL, D.D. **Frequência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ovinos do município de Uberlândia, Minas Gerais**.In: Seminário de Iniciação Científica, Uberlândia, 2008.

ROSSI, G.F. et al. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**. v 175, p.252-259, 2011.

SAARI, M.; RÄISÄNE, N. Transmission of acute toxoplasma infection. The survival of trophozoites in human tears, saliva, and urine and in cow's. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 52, p. 847–852,1974.

SACKS, J.J. et al. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **The Journal of the American Medical Association**, v.248, p.1728-1732, 1982.

SAKATA, F.B.L.S. et al. *Toxoplasma gondii* antibodies sheep in Lages, Santa Catarina, Brazil, and comparison

using IFA and ELISA. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.21,p. 197-198, 2012.

SAMRA, N.A. et al. Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.78, p.116-120, 2007.

SCARPELLI, L. et al. *Toxoplasma gondii* em sêmen e tecidos de *Bos taurus* e *Bos indicus* experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.59-64, 2009.

SERRA-FREIRE, N. M. et al. Toxoplasmose caprina no Rio de Janeiro. **Parasitologia al Día**, v.18, p.77-81, 1994.

SILVA, K.L.M.V. **Análise de transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos em duas propriedades no município de Rosário do Sul, Santa Maria – RS.** 2001. 16f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Santa Maria, 2001.

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. et al. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**. v.33, p.115-119, 2003.

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

SOARES, H.S. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 160, p.211-214,2009.

SORRENTINO, A.H. HLA class II involvement in HIV-associated Toxoplasmic encephalitis development. **Clinical Immunology**, v.115, p. 133-137, 2005.

SUÁREZ-HERNÁNDEZ, M. et al. Infección y enfermedad por *Toxoplasma gondii* en animales y humanos en 23 años de observación en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. **Revista Biomédica**,v. 16, p. 21-27, 2005.

SPLENDRE, A. Um nuovo protozoo ecorda de' conigli – incontrato nelle lesioni anatomiche d'une mallatia che ecorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. **Revista da Sociedade de Ciencias**.v. 3, p.109-112, 1908.

SWANGO, L.J. et al. Bacterial, rickettsial, protozoan and miscellaneous infections. In: ETTINGER, S.J. (Ed.), **Textbook of veterinary internal medicine**. 3 ed. Philadelphia: W.B, p. 265-297, 1989.

TAVASSOLI, M. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Sheep and Goat Milk in Northwest of Iran by PCR-RFLP. **Jundishapur Journal Microbiology**,v. 6,p. 1-4, 2013.

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

TENTER, A.M. et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1217-1258, 2000.

TONELLI, E. Toxoplasmose. In: \_\_\_\_ (Ed.), **Doenças Infecciosas na Infância e na Adolescência**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, p.1327-1339,2000.

TREVISANI, N. **Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de *gallus gallus* naturalmente infectados no Estado de Santa Catarina**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages-SC, 2012.

TZANIDAKIS, N. et al. *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: Seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 340-348, 2012.

UENO, T.E. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from federal District, central region of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p.547- 552,2009.

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

VITOR, R.W.A. et al. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.147-154, 1991.

WALSH, C.P. et al. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk:potential source of human toxoplasmosis. **Journal Eukaryot Microbiology**, v.46, p.73-75, 1999.

WEST, M. et al. Seroconversion against *Toxoplasma gondii* in 3- to 4-month-old female dairy sheep.**Veterinaria Argentina**, v.15, p.176-179, 1998.

## **ANEXOS**

## ANEXO I

**Quadro 1-** Resultado da Quantificação de DNA (Nanodrop®) das amostras de leite ovino e de cérebro de camundongos inoculados, positivas para a presença de *T. gondii*.

<b>Amostra leite</b>	<b>Quantidade de DNA</b>
39 II	22,4 ng/μL
42 II	117,1 ng/μL
78 II	28,1 ng/μL
86 II	39,9 ng/μL
110 II	32,0 ng/μL
<b>Amostras de cérebro</b>	<b>Quantidade de DNA</b>
2 I	36,7 ng/μL
3 II	89,0 ng/μL
11 II	120,0 ng/μL
13 II	22,0 ng/μL
24 II	45,0 ng/μL
28 II	26,0 ng/μL
131 II	33,0 ng/μL
56 II	51,2 ng/μL

## ANEXO II

Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra C II 13 de cérebro do bioensaio.

Download ▾ GenBank Graphics					
Toxoplasma gondii ME49 surface antigen P22, mRNA					
Sequence ID: <a href="#">reflXM_002365730.1</a> Length: 1669 Number of Matches: 1					
Range 1: 170 to 463 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▾ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
532 bits(288)	8e-148	291/294(99%)	0/294(0%)	Plus/Minus	
Query 21	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAAGCCCGT				80
Sbjct 463	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAAGCCCGT				404
Query 81	GAGCGCTAGMGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCACAAGACAAAG				140
Sbjct 403	GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCACAAGACAAAG				344
Query 141	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCCTAG				200
Sbjct 343	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCCTAG				284
Query 201	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTCGCAGATG				260
Sbjct 283	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTCGCAGATG				224
Query 261	GGTCACTGCAGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTGTTTCGAGGT				314
Sbjct 223	GGTCACTGCAGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTGTTTCGAGGT				170

Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra C II 131 de cérebro do bioensaio.

Download ▾ GenBank Graphics					
T.gondii surface antigen P22 mRNA, complete cds, clones c(86,88, 120,122)					
Sequence ID: <a href="#">gb M33572.1 TOXP22</a> Length: 1404 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 283 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▾ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
512 bits(277)	1e-141	280/283(99%)	0/283(0%)	Plus/Minus	
Query 21	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAAGCCCGT				80
Sbjct 283	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAAGCCCGT				224
Query 81	GAGCGCTAGMGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCACAAGACAAAG				140
Sbjct 223	GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCACAAGACAAAG				164
Query 141	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCCTAG				200
Sbjct 163	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCCTAG				184
Query 201	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTCGCAGATG				260
Sbjct 103	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTCGCAGATG				44
Query 261	GGTCACTGCAGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTGTTTCGAGGT				303
Sbjct 43	GGTCACTGCAGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTGTTTCGAGGT				1



## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra C II 11 de cérebro do bioensaio.

Download ▾ GenBank Graphics

T.gondii surface antigen P22 mRNA, complete cds, clones c(86,88, 120,122)  
Sequence ID: [gb|M33572.1|TOXP22](#) Length: 1404 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 283 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
512 bits(277)	1e-141	280/283(99%)	0/283(0%)	Plus/Minus
Query 21	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAGCCCGT	80		
Sbjct 283	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAGCCCGT	224		
Query 81	GAGCGCTAGMSGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAG	140		
Sbjct 223	GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCGACAAGACAAG	164		
Query 141	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG	200		
Sbjct 163	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG	104		
Query 201	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	260		
Sbjct 103	AACTGCAACCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	44		
Query 261	GGTCACTGCAGCAACTGAAACATTCTGTCCCTTTGTGTTCC 303			
Sbjct 43	GGTCACTGCAGCAACTGAAACATTCTGTCCCTTTGTGTTCC 1			

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra C II 24 de cérebro do bioensaio.

Download ▾ GenBank Graphics

Toxoplasma gondii strain C56 SAG2 (SAG2) gene, partial cds  
Sequence ID: [gb|KJ524441.1](#) Length: 295 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 257 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
460 bits(249)	4e-126	252/255(99%)	0/255(0%)	Plus/Minus
Query 21	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAGCCCGT	80		
Sbjct 257	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAGCCCGT	198		
Query 81	GAGCGCTAGMSGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAG	140		
Sbjct 197	GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCGACAAGACAAG	138		
Query 141	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG	200		
Sbjct 137	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG	78		
Query 201	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	260		
Sbjct 77	AACTGCAACCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	18		
Query 261	GGTCACTGCAGCAAC 275			
Sbjct 17	GGTCACTGCAGCAAC 3			

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra C II 28 de cérebro do bioensaio.

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Toxoplasma gondii isolate C56 surface antigen P22 (SAG2) gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|AF249698.1|AF249698](#) Length: 1307 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 247 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
440 bits(238)	5e-120	243/247(98%)	0/247(0%)	Plus/Minus
Query 21	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAGCCCGT	80		
Sbjct 247	GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAGCCCGT	188		
Query 81	GAGCGCTAGMGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAG	140		
Sbjct 187	GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCGACAAAGACAAG	128		
Query 141	ATTGGAAAGAGACAGAAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCTAG	200		
Sbjct 127	ATTGGAAAGAGACAGAAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCTAG	68		
Query 201	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	260		
Sbjct 67	AACTGCACCCCGTGAACAACACACAGGATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	8		
Query 261	GGTCACT 267			
Sbjct 7	GGTCACT 1			

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra C II 56 de cérebro do bioensaio.

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Toxoplasma gondii from skunk surface antigen 2 (SAG2) gene, partial sequence  
Sequence ID: [gb|DQ000461.1|](#) Length: 242 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 242 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
431 bits(233)	3e-117	238/242(98%)	0/242(0%)	Plus/Minus
Query 46	GCAAGAGCGGAAC TTGAACAACAACAACAGCCCGTGAGCGCTAGMGACGCTAGGCTCGTG	105		
Sbjct 242	GCAAGAGCGGAAC TTGAACAACAACAACAGCCCGTGAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTG	183		
Query 106	GTCTTTGAGAAACTCATAGTTCCKACAAGACAAGATTGGAACGAGACAGAAAGGTGTAC	165		
Sbjct 182	GTCTTTGAGAAACTCATAGTTCGACACAAGACAAGATTGGAACGAGACAGAAAGGTGTAC	123		
Query 166	ACCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCTAGAACTGCAMCCCGTGAACAACACAC	225		
Sbjct 122	ACCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCTAGAACTGCAMCCCGTGAACAACACAC	63		
Query 226	AGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATGGGCTACTGCAGCAACTGAAACATT	285		
Sbjct 62	AGGATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATGGGCTACTGCAGCAACTGAAACATT	3		
Query 286	TC 287			
Sbjct 2	TC 1			

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra C II 131 de cérebro do bioensaio.

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Toxoplasma gondii isolate C56 surface antigen P22 (SAG2) gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|AF249698.1|AF249698](#) Length: 1307 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 247 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
440 bits(238)	5e-120	243/247(98%)	0/247(0%)	Plus/Minus
Query 21	GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGT	80		
Sbjct 247	GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGT	188		
Query 81	GAGCGCTAGMGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAG	140		
Sbjct 187	GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCGACAAGACAAG	128		
Query 141	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCCTAG	200		
Sbjct 127	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCCTAG	68		
Query 281	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	260		
Sbjct 67	AACTGC AACCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	8		
Query 261	GGTCACT 267			
Sbjct 7	GGTCACT 1			

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra C I 2 de cérebro do bioensaio.

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Toxoplasma gondii P22 gene for surface antigen, partial cds, isolate: S7  
Sequence ID: [dbj|AB667972.1](#) Length: 303 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 297 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
538 bits(291)	2e-149	294/297(99%)	0/297(0%)	Plus/Minus
Query 21	GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGT	80		
Sbjct 297	GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGT	238		
Query 81	GAGCGCTAGMGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAG	140		
Sbjct 237	GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCGACAAGACAAG	178		
Query 141	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCCTAG	200		
Sbjct 177	ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCCTAG	118		
Query 281	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	260		
Sbjct 117	AACTGC AACCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATG	58		
Query 261	GGTCACTGCAGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTGTTCTGAGGTAAGC	317		
Sbjct 57	GGTCACTGCAGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTGTTCTGAGGTAAGC	1		

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra L II 39 de leite.

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Toxoplasma gondii strain RUB surface antigen P22 (SAG2) gene, SAG2-5 allele, complete cds  
Sequence ID: [gb|AF357581.1](#) Length: 1250 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 236 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
425 bits(230)	1e-115	233/236(99%)	0/236(0%)	Plus/Minus

```

Query 21  GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAAAGCCCGT  80
          |||
Sbjct 236  GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAAAGCCCGT  177

Query 81  GAGCGCTAGTACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAG  140
          |||
Sbjct 176  GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAG  117

Query 141 ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG  200
          |||
Sbjct 116  ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG  57

Query 201  AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA  256
          |||
Sbjct 56   AACTGCAACCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA  1
  
```

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra L II 42 de Leite.

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Toxoplasma gondii strain RUB surface antigen P22 (SAG2) gene, SAG2-5 allele, complete cds  
Sequence ID: [gb|AF357581.1](#) Length: 1250 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 236 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
425 bits(230)	1e-115	233/236(99%)	0/236(0%)	Plus/Minus

```

Query 21  GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAAAGCCCGT  80
          |||
Sbjct 236  GGGCGCTGGCGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAAACAAAGCCCGT  177

Query 81  GAGCGCTAGTACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAG  140
          |||
Sbjct 176  GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAG  117

Query 141 ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG  200
          |||
Sbjct 116  ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG  57

Query 201  AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA  256
          |||
Sbjct 56   AACTGCAACCCGTGAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA  1
  
```

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra L II 78 de leite.

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Toxoplasma gondii strain RUB surface antigen P22 (SAG2) gene, SAG2-5 allele, complete cds  
 Sequence ID: [gb|AF357581.1](#) Length: 1250 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 236 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
425 bits(230)	1e-115	233/236(99%)	0/236(0%)	Plus/Minus

```

Query 21  GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCGT  80
Sbjct 236  GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCGT  177

Query 81  GAGCGCTAGMGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAAG  140
Sbjct 176  GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCGACAAGACAAAG  117

Query 141  ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG  200
Sbjct 116  ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG  57

Query 201  AACTGCAMCCCGTAAAAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA  256
Sbjct 56  AACTGCAACCCGTAAAAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA  1
  
```

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra L II 86 de leite.

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Toxoplasma gondii strain MAS surface antigen P22 (SAG2) gene, SAG2-4 allele, complete cds  
 Sequence ID: [gb|AF357580.1](#) Length: 1253 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 236 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
425 bits(230)	1e-115	233/236(99%)	0/236(0%)	Plus/Minus

```

Query 21  GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGT  80
Sbjct 236  GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGT  177

Query 81  GAGCGCTAGMGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCKACAAGACAAAG  140
Sbjct 176  GAGCGCTAGCGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCGACAAGACAAAG  117

Query 141  ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG  200
Sbjct 116  ATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG  57

Query 201  AACTGCAMCCCGTAAAAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA  256
Sbjct 56  AACTGCAACCCGTAAAAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA  1
  
```

## Sequenciamento do *T. gondii* referente à amostra L II 110 de leite.

Download ▾ GenBank Graphics

Toxoplasma gondii strain LGE96-1 surface antigen P22 (SAG2) gene, SAG2-2 allele, complete cds  
Sequence ID: [gb|AF357578.1](#) Length: 1253 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 236 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
425 bits(230)	1e-115	233/236(99%)	0/236(0%)	Plus/Minus
Query 21	GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGT	80		
Sbjct 236	GGGCGCTGGCGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGT	177		
Query 81	GAGCGCTAGNGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAAACTCATAGTTCCACAAAGCAAAG	140		
Sbjct 176	GAGCGCTAGNGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAAACTCATAGTTCCACAAAGCAAAG	117		
Query 141	ATTGGAACGAGACGAAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG	200		
Sbjct 116	ATTGGAACGAGACGAAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCCTAG	57		
Query 201	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA	256		
Sbjct 56	AACTGCAMCCCGTGAACAACACACAGAAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCA	1		

Resultado do sequenciamento do *T. gondii* referente ao controle positivo VEG.

Download ▾ GenBank Graphics

Toxoplasma gondii P22 gene for surface antigen, partial cds, isolate: S4  
Sequence ID: [dbj|AB667973.1](#) Length: 291 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 290 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
521 bits(282)	2e-144	285/288(99%)	0/288(0%)	Plus/Minus
Query 34	CGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGTGAGCSCTW	93		
Sbjct 290	CGTCTCGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGTGAGCGCTAG	231		
Query 94	CGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAAACTCATAGTTCCSACAAGACAAGATTGGAACG	153		
Sbjct 230	CGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAAACTCATAGTTCCGACAAGACAAGATTGGAACG	171		
Query 154	AGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCAGAACTGCAAC	213		
Sbjct 170	AGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCAGAACTGCAAC	111		
Query 214	CCGTGAAAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGAGATGGGCTACTGC	273		
Sbjct 110	CCGTGAAAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGAGATGGGCTACTGC	51		
Query 274	AGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTCTGTTCGAGGTAGC	321		
Sbjct 50	AGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTCTGTTCGAGGTAGC	3		

**ANEXO III**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS -  
CEPSH**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

“*Toxoplasma gondii*: Soroprevalência em rebanhos ovinos com aptidão leiteira e detecção do agente em amostras de leite na mesorregião Oeste de Santa Catarina.”

O (a) senhor (a) está sendo convidado a participar de um estudo que fará a avaliação da ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em ovinos de sua propriedade, para se conhecer a prevalência desta doença nos rebanhos ovinos da região do Oeste de Santa Catarina e detectar o agente em amostras de leite ovino. Será realizada coleta de sangue por meio de punção da veia jugular dos mesmos e três alíquotas de leite. O material será devidamente identificado, acondicionado e transportado ao laboratório para análise. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os procedimentos adotados são mínimos, não envolvendo risco ao animal.

Sua identidade será preservada não havendo necessidade de fornecer nome ou endereço e os animais serão identificados através do número de protocolo.

Os benefícios serão o conhecimento da prevalência de *Toxoplasma gondii* entre ovinos da região do Oeste de Santa Catarina e da presença do agente no leite, informações importantes para a adoção de medidas de prevenção que implicam em melhorias na sanidade dos rebanhos ovinos. Os exames não terão custo.

Solicitamos vossa autorização para coleta de sangue e leite bem como o uso destes dados para a produção de artigos técnicos e

científicos. A sua privacidade será mantida através de não identificação do seu nome.

Agradecemos a vossa participação.

Pessoa para contato: Prof. Anderson Barbosa de Moura  
(pesquisador responsável)

Número do telefone: 049 2101 9119

Endereço: Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do  
CAV/UEDESC

Av. Luís de Camões, 2090 – Bairro Conta Dinheiro – Lages, SC.



Protocolo N<sup>o</sup>: \_\_\_\_\_

## TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos serão feitos em meu animal.

Declaro que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

---

---

Nome por extenso

---

(Localidade), \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura

