



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MADLAINE FRIGO SILVEIRA BARBOSA DE MACEDO

***Toxoplasma gondii* EM VACAS PRENHES  
NATURALMENTE INFECTADAS E SEUS FETOS**

MADLAINE FRIGO SILVEIRA BARBOSA DE MACEDO

***Toxoplasma gondii* EM VACAS PRENHES  
NATURALMENTE INFECTADAS E SEUS FETOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia.

Londrina  
2011

## Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M141t Macedo, Madlaine Frigo Silveira Barbosa de.  
*Toxoplasma gondii* em vacas prenhes naturalmente infectadas e seus fetos / Madlaine Frigo Silveira Barbosa de.  
– Londrina, 2011.  
37 f.: il.

Orientadora: João Luis Garcia.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.  
Inclui bibliografia.

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. *Toxoplasma gondii* – Teses. 3. Bovino – *Toxoplasma* – Teses. 4. Parasitologia veterinária – Teses. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.2

MADLAINE FRIGO SILVEIRA BARBOSA DE MACEDO

***Toxoplasma gondii* EM VACAS PRENHES ATURALMENTE  
INFECTADAS E SEUS FETOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Luis Garcia  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Fabiana Maria Ruiz Lopes  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 11 de março de 2011.

MACEDO, Madlaine Frigo Silveira Barbosa de. ***Toxoplasma gondii* em vacas prenhes naturalmente infectadas e seus fetos.** 2011. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório com distribuição mundial que infecta todas as espécies de animais homeotérmicos, mamíferos, aves e o homem. Esta zoonose cosmopolita de importância veterinária e médica causa abortos e doenças congênitas em várias espécies de hospedeiros intermediários, promovendo forte impacto na produção animal em saúde pública. O homem adquire a infecção por três vias principais: a ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida, a ingestão de oocistos esporulados presentes no solo ou água, e via transplacentária. O presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência e isolar cepas de *Toxoplasma gondii* em vacas prenhez de raças leiteiras e de seus fetos naturalmente infectados. No presente estudo, 60 vacas e seus respectivos fetos foram avaliados. Amostras de sangue com e sem EDTA foram coletadas na sangria em um abatedouro no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. A sorologia foi realizada através da Imunofluorescência Indireta (IFI) considerando positiva as amostras com títulos >50 para as vacas e > 25 para os fetos. Amostras de sangue foram usadas para bioensaio em camundongos. A prevalência de IgG contra o *T. gondii* foi de 13,3% nas vacas e de 3,7% dos fetos. Foram observados cistos cerebrais de camundongos infectados com amostra de sangue de uma vaca com 4 anos de idade, no 6º mês de gestação, e um camundongo infectado com sangue de um feto com 6 meses. Estes cistos foram confirmados pela PCR (reação em cadeia da polimerase) como sendo de *T. gondii*. A caracterização genotípica de ambas as cepas apresentaram o genótipo II para todos os marcadores de PCR-RFLP testados. O potencial da transmissão do *T. gondii* pelos bovinos, ainda, é desconhecida. O fato é que mais estudos devem ser realizados com o objetivo de caracterizar o real risco desses animais para o consumo humano, bem como, para manipuladores, uma vez que o isolamento do parasita, no presente estudo, foi realizado a partir do sangue dos animais.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*. Bovino. Isolamento. Caracterização genotípica.

MACEDO, Madlaine Frigo Silveira Barbosa de. ***Toxoplasma gondii* in naturally infected pregnant cows and their fetus.** 2011. 37 f. Dissertation (Master in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite with a worldwide distribution and infects all species of warm-blooded animal, including mammals, birds and man. This zoonosis of veterinary and medical importance, causes abortions and congenital diseases in various species of intermediate hosts, promoting a strong impact on animal production and public health. Man acquires the infection by three main routes, ingestion of tissue cysts in raw or undercooked meat, ingestion of oocysts sporulated in soil or water and transplacental routes. However. The present study aimed to evaluate the prevalence and isolate strains of *Toxoplasma gondii* strains from naturally infected cows and fetus. This work were evaluated 60 cows and their fetus . Blood samples with and without EDTA were colleted at bleeding from abattoir in the Santa Catarina State, southern Brazil. Serum occurrence was performed by indirect fluorescent antibody teste (IFAT) considering positive animals with titers > 50 for cows and > 25 for fetuses . The blood samples were used for mouse bioassay. Antibodies to *T. gondii* were observed in 13,3% of cows and 3,7% of fetus. *T. gondii* brain cysts were observed in a mouse infected with blood sample from a cow with more than 4 year old, pregnant (fetus with 6 month) and in a mouse infected with blood from a fetus with 6 month. These cysts by PCR were detected as being of *Toxoplasma gondii*. Genotyping characterization of both strains schowed genotype II for all PCR-RFLP markers tested. The potencial transmission of *T. gondii* in cattle, though, is unknown. The fact is that more studies should be conducted to characterize the actual risk of these animals for human consumption, as well as to handlers, since the isolation of the parasite in the present study was conducted from the blood of animals.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*. Cattle. Isolation. Genotype characterization.

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em bovinos no Brasil.....11
- Quadro 2** – Tipos genéticos de cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de galinhas de vida livre em diferentes países.....14

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1</b> – Outcome of association between variables (breed and gestational age) and presence of antibodies for <i>Toxoplasma gondii</i> (IFAT-IgG) in slaughtered dairy cows ( <i>Bos taurus</i> ) for human consume .....	22
<b>Table 2</b> – Positive results of mouse bioassay for <i>Toxoplasma gondii</i> performed in slaughtered pregnant dairy cows and their fetuses .....	23
<b>Table 3</b> – Multilocus genotyping of <i>Toxoplasma gondii</i> strains isolated from urban rats .....	24

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
1.1 INTRODUÇÃO .....	8
1.2 PREVALÊNCIA .....	10
1.3 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Toxoplasma GONDII</i> .....	12
1.4 GENÓTIPOS .....	14
1.5 CONCLUSÃO .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	17
3.1 INTRODUCTION .....	17
3.2 MATERIAL AND METHODS.....	18
3.2.2 Study Area and Sampling.....	18
3.3 BIOASSAY FOR <i>T. GONDII</i> .....	19
3.4 EXAMINATION OF MICE .....	19
3.5 INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST (IFAT) .....	20
3.6 DNA EXTRACTION AND PCR .....	20
3.7 GENOTYPING CHARACTERIZATION .....	21
3.8 STATISTICAL ANALYSIS .....	21
3.9 RESULTS .....	21
3.9.1 Seroprevalence for <i>T. Gondii</i> .....	21
3.10 MOUSE BIOASSAY EVALUATION .....	22
3.11 GENOTYPIC CHARACTERIZATION .....	23
3.12 DISCUSSION.....	24
3.13 CONCLUSION .....	26
3.14 REFERENCES.....	26
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii* protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa. O parasita encontra-se distribuído mundialmente (ACHA; SZYFRES, 1986), e pode infectar seres humanos e animais (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Os únicos hospedeiros definitivos do parasita são os felídeos (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970), onde os gatos domésticos assumem importante papel na transmissão da infecção, pelo estreito contato com os seres humanos. Nos felídeos, o parasita realiza a multiplicação enteroepitelial que culmina com a produção e eliminação de oocistos pelas fezes, os quais são resistentes às condições ambientais (DUBEY, 1977), mantendo-os viáveis durante meses e anos (FRENKEL, 1990). As fezes de um gato doméstico podem conter em torno de 10 milhões de oocistos em pico de eliminação. No meio ambiente estes oocistos tornam-se infectantes após um período de um a cinco dias, dependendo das condições de umidade e temperatura (DUBEY; BEATTIE, 1988).

A infecção é mais prevalente em países de climas quentes e úmidos do que em áreas secas. Isso, provavelmente, devido às condições favoráveis à esporulação e sobrevivência dos oocistos no meio ambiente (DUBEY; BEATTIE, 1988).

A infecção humana pode ocorrer pré ou pós-nascimento. Após o nascimento os humanos podem se contaminar pela ingestão de oocistos presentes no solo ou água e pela ingestão de carne crua e mal cozida contaminada com cistos teciduais do parasita (ANDREWS et al., 1997). Deve-se lembrar que a transfusão sanguínea e o transplante de órgãos de pessoas infectadas podem transmitir a toxoplasmose (HILL; DUBEY, 2002). A infecção pelo *T. gondii* em adultos saudáveis é normalmente assintomática, porém, a doença pode ser severa em indivíduos imunodeprimidos, como portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e transplantados (DUBEY, 2004; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

A infecção pré-natal ou congênita pode ocorrer em mulheres que têm o primeiro contato com o parasita durante a gravidez. Infecções no primeiro

trimestre de gestação são mais severas que aquelas adquiridas no segundo e terceiro trimestre. A infecção congênita pode levar a uma série de complicações, que vão desde o aborto espontâneo, até o nascimento de crianças com problemas de convulsões, retinocoroidite, hidrocefalia e calcificações intracerebrais (DUBEY, 2008; HILL; DUBEY, 2002).

O *Toxoplasma gondii* foi isolado, pela primeira vez, em tecidos bovinos por Sanger et al. (1953), no estado de Ohio nos Estados Unidos. No Brasil, Jamra, Deane e Guimarães (1969), Spósito Filha et al. (1988) isolaram *T. gondii* de tecidos de bovinos.

Dubey (1983), em trabalho experimental com bezerros e vacas prenhes, concluiu que o *T. gondii* pode permanecer viável nos tecidos dos bovinos a partir de 11 até 287 dias após a inoculação. Dubey e Thulliez (1993), verificaram a presença de cistos teciduais de *T. gondii* em bovinos até 1191 após inoculação experimental, demonstrando assim que os cistos de *T. gondii* podem permanecer viáveis até a idade de abate desses animais.

Surtos de toxoplasmose em humanos foram relatados por vários autores, a partir de consumo de carne mal cozida, verduras e águas contaminadas. (BONAMETTI et al., 1997; DIAS; FREIRE, 2005; NAVARRO et al., 1992). Em um estudo foi verificado que a proporção de humanos que adquiriram infecção pelo *T. gondii* foi mais alta na população que tem o hábito de comer carne mal-passada (AMATO NETO et al., 1995). Nos Estados Unidos (EUA) a carne suína foi considerada uma importante via de transmissão de *T. gondii*. (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989; MEAD et al., 1999). Somando-se a isso, cistos teciduais de *T. gondii* foram encontrados somente em carne suína em um estudo de prevalência em carne suína, carne bovina e carne de ave nos EUA (DUBEY; THULLIEZ, 1993). Embora o consumo de carne crua ou mal cozida seja considerado um importante fator de risco para infecção pelo *T. gondii*, o tipo de carne apontada com o maior risco varia de acordo com a situação de cada região, levando-se em conta a taxa de consumo e a soroprevalência em cada espécie animal na região estudada (COOK, et al., 2000).

Considerando que a prevalência da toxoplasmose em suínos vem diminuindo, porém, sem alterações na prevalência em seres humanos faz-se necessário o estudo de outras vias de transmissão, como por exemplo, a carne bovina.

## 1.2 PREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE EM BOVINOS NO BRASIL

Estudos soroepidemiológicos da infecção por *T. gondii* em bovinos no Brasil demonstram que esta protozoonose está amplamente disseminada, embora as porcentagens variem de acordo com a região. Dados sobre a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos apresentam valores discrepantes, variando de 1% à 71% dos animais pesquisados (GONDIM et al., 1999; SANTOS, et al., 2009).

Estudos da prevalência sorológica de bovinos, através da Imunofluorescência Indireta (IFI) na região norte do Estado do Paraná é bem conhecida. Marana et al. (1994) obtiveram 32,3% de soroprevalência em bovinos de corte abatidos em matadouros. Em rebanhos de bovinos leiteiros foram encontrados 48,5% de reagentes por Marana et al. (1995) e 26% por Ogawa et al. (2005). Já Garcia et al. (1999), descreveram 25,8% de animais positivos para anticorpos IgG. Na região sudoeste do Paraná, Daguer et al. (2004) detectaram 41,4% de soropositividade em bovinos através da IFI nos matadouros da micro região de Pato Branco.

Vários trabalhos foram realizados na região Sudeste. Costa et al. (1978) encontraram 32,3% de bovinos soropositivos em Jaboticabal, estado de São Paulo, e no mesmo ano Costa e Costa (1978), encontraram 12% de animais reagentes em Poços de Caldas, Minas Gerais. Costa et al. (2001), ao analisarem os soros de bovinos provenientes de regiões rurais de São Paulo e Minas Gerais, observaram que 49,1% dos bovinos eram sororeagentes. Já Meireles et al. (2003) pesquisando anticorpos anti-*T. gondii* pelo método de ELISA, em animais de produção do estado de São Paulo, encontrou 11% de positividade para os bovinos. Albuquerque et al. (2005) avaliando a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* pela IFI em bovinos leiteiros do vale do Paraíba, Rio de Janeiro, encontraram 14,8% de sororeagentes.

As maiores prevalências foram encontradas nas regiões Centro-Oeste e Norte. Santos et al. (2009), em um trabalho com bovinos leiteiros no estado do Mato Grosso encontrou 71% de prevalência pela IFI. Ferraroni e Marzochi (1980), detectaram através da hemaglutinação indireta (HAI), uma prevalência de 60% de bovinos soropositivos na Amazônia.

Na região Nordeste podemos destacar os trabalhos realizados no estado da Bahia, onde Gondim et al. (1999) através do teste de aglutinação em látex (LAT), encontraram 1,03% de bovinos sororeagentes. Spagnol et al. (2009) ao analisar 600 soros de bovinos abatidos nos matadouros sob Inspeção Municipal de Ilhéus e Itabuna, e no matadouro frigorífico sob Inspeção Federal em Jequié, para anticorpos anti-*T. gondii* pela IFI, encontraram uma prevalência total de 11,8% (71/600). A maioria dos animais positivos para *T. gondii* foram oriundos de granjas leiteiras e foram abatidos nos matadouros sob inspeção municipal em comparação com aqueles animais que eram oriundos de fazendas com criação extensiva e abatidos em matadouros sob inspeção federal.

Em relação ao sexo, Daguer et al. (2004) encontraram uma positividade de 42,9% e 36,8% entre machos e fêmeas, respectivamente. Não foi observada diferença estatisticamente significativa, fato este que também tem sido observado em outras literaturas (ARIAS et al., 1994; GARCIA et al., 1999).

**Quadro 1** – Prevalência de anticorpos para *anti-Toxoplasma gondii* em bovinos no Brasil

Referências	Local de estudo	Metodologia	Prevalência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>
Costa et al. (1978)	São Paulo	IFI	32,3%
Costa e Costa (1978)	Minas Gerais	IFI	12%
Ferraroni e Marzochi (1980)	Amazonas	HAI	60%
Marana et al. (1994)	Paraná	IFI	32,3%
Marana et al. (1995)	Paraná	IFI	48,5%
Gondim et al. (1999)	Bahia	LAT	1,03%
Garcia et al. (1999)	Paraná	IFI	25,8%
Costa et al. (2001)	São Paulo e Minas Gerais	IFI	49,1%
Meireles et al. (2003)	São Paulo	IFI	11%
Daguer et al. (2004)	Paraná	IFI	41,4%
Ogawa et al. (2005)	Paraná	IFI	26%
Albuquerque et al. (2005)	Paraíba e Rio de Janeiro	IFI	14,8%
Santos et al. (2009)	Mato Grosso	IFI	71%
Spagnol et al. (2009)	Bahia	IFI	11,8%

**Fonte:** autor.

### 1.3 IDENTIFICAÇÃO DE *Toxoplasma GONDII*

A pesquisa direta do *T. gondii* pode ser feita a partir de diversos componentes orgânicos como sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva, leite, escarro, medula óssea, cortes de placenta, além de conteúdos de infiltrados cutâneos, do baço, fígado, músculos e linfonodos. O material obtido pode ser utilizado para fazer diagnóstico por inoculação em camundongo ou histopatológico (NEVES, 2003).

A técnica mais sensível e específica para o isolamento é o bioensaio, o qual envolve a inoculação em camundongos, que são extremamente sensíveis à infecção por *T. gondii*, porém o sucesso do isolamento depende da dose inoculada, via de administração e virulência das cepas dos parasitos (DEROIN et al., 1987; DUBEY et al., 1988).

A PCR vem sendo amplamente utilizada para a detecção e diferenciação de parasitos. Tem sido amplamente difundida, pela sua alta sensibilidade e especificidade, e por ter a capacidade de detectar o DNA dos parasitos em diferentes tecidos, fezes e fluidos corpóreos (SINGH, 1997; SREEKUMAR et al., 2003). Este método pode ser capaz de detectar até 0,05 pg de DNA, o que corresponde aproximadamente ao conteúdo de DNA de um taquizoítio (SAVVA et al., 1990). Vários estudos tem comparado a PCR com os métodos tradicionais de diagnóstico, como a detecção de anticorpos específicos, a inoculação em camundongos e a imunohistoquímica. Nestas pesquisas a PCR apresentou uma boa correlação com estas diferentes técnicas de diagnóstico de *T. gondii* (STEUBER et al., 1995; WASTLING; NICOLL; BUXTON, 1993).

A dificuldade de se encontrar *T. gondii* em cortes de tecidos animais se deva pelo baixo número de organismos presentes, principalmente quando se trabalha com grandes animais (COLE et al., 1993; UGGLA; SJÖLAND; DUBEY, 1987). O problema do erro amostral quando se trabalha com espécies de grandes animais é inevitável e deve-se ter em mente ao tentar detectar *T. gondii*. Quando não for possível detectar *T. gondii* em bovinos utilizando-se os métodos diagnósticos citados, é possível que o parasita esteja presente em outras partes de tecido. Um resultado negativo de qualquer amostra não significa necessariamente que o tecido está inteiramente livre do parasita (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999).

Estudos no Brasil objetivando o isolamento de *T. gondii* de bovinos infectados naturalmente iniciou-se com Jamra et al. (1969), Fernandes e Barbosa (1972) e Passos (1984) os quais não tiveram muito sucesso. Costa et al. (2011) em São Paulo, conseguiu isolar *T. gondii* em fetos de bovinos naturalmente infectados ao estudar a toxoplasmose congênita natural em bovinos e infecção experimental de vacas gestantes com oocistos de *T. gondii*. Outros autores conseguiram isolar *T. gondii* de bovinos inoculados experimentalmente. Oliveira et al. (2001) isolou o parasita a partir de sangue de *Bos indicus* e *Bos taurus*, e Scarpelli et al (2009) isolaram da musculatura esquelética, linfonodos, cérebro, retina, baço, fígado, pulmão, testículo, epidídimo e vesícula seminal.

Gottstein et al. (1998), ao estudar 83 fetos bovinos abortados na Suíça, detectaram DNA de *T. gondii* em 5% dos fetos (4/83). Somando-se a isso, os autores identificaram anticorpos anti *T. gondii* em dois bezerros mortos, sugerindo infecção transplacentária. Ellis (1998) estudando 40 fetos bovinos com encefalite confirmada pela histologia, na Austrália, encontrou DNA de *T. gondii* em dois fetos.

Em estudo testando 242 fetos abortados na Suíça somente um foi positivo para *T. gondii* pela PCR (SAGER et al., 2001). Canadá et al. (2002) relataram o isolamento de *T. gondii* pelo bioensaio em camundongos em dois fetos bovinos abortados, um nos Estados Unidos e o outro em Portugal. Apesar do isolamento em fetos bovinos, o *T. gondii* não é considerado uma importante causa de aborto em bovinos (DUBEY, 1983, 1986).

Esteban-Redondo et al. (1999), encontraram DNA de *T. gondii* no sangue de bovinos inoculados pela via oral na dose  $10^5$  oocistos, mas não tiveram sucesso ao tentar isolar o parasita dos tecidos destes bovinos infectados experimentalmente.

Moré et al. (2007) detectaram DNA de *T. gondii* pela PCR em amostras de miocárdio em 2 de 20 animais soropositivos para *T. gondii*, porém, o parasita não foi detectado por imunohistoquímica. Este é o primeiro relato de detecção de DNA de *T. gondii* em bovinos da Argentina. Em estudo mais recente no Brasil, Scarpelli et al. (2009) detectaram parasitismo tecidual pela PCR em experimento com *Bos taurus* e *Bos indicus* infectados experimentalmente.

#### 1.4 GENÓTIPOS

Atualmente, adotando-se métodos de caracterização molecular, evidenciou-se a existência de linhagens bem definidas dentro da espécie *T. gondii* designadas como tipo I, II, III (DARDÉ; BOUTEILLE; PRESTE-ALEXANDRE, 1988; DARDÉ, 1996; HOWE; SIBLEY 1995). Cepas isoladas de animais, independente da condição clínica, são predominantemente caracterizadas em tipo II ou III (HOWE; SIBLEY, 1995; MONDRAGON et al., 1998).

Estudos realizados em várias partes do mundo em galinhas de vida livre, consideradas indicadores da prevalência do *T. gondii* no ambiente pelo fato de ciscarem, têm revelado a ausência do tipo II nesta espécie animal, em algumas localidades (Quadro 2).

**Quadro 2** – Tipos genéticos de cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de galinhas de vida livre em diferentes países

Localidade	Nº de isolados	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo I + III	Referências
Argentina	9	1	1	7	0	Dubey et al. (2003a)
Egito	20	0	3	17	0	Dubey et al. (2003b)
EUA	19	0	5	14	0	Dubey et al. (2003c)
Brasil (SP)	25	16	0	9	0	Dubey et al. (2002)
Brasil (RJ)	48	34	0	13	1	Dubey et al. (2003d)
Brasil (PR)	13	7	0	6	0	Dubey et al. (2003e)

**Fonte:** autor.

No município de Santa Isabel do Ivaí - Paraná, Brasil, num surto de toxoplasmose por veiculação hídrica, a percentagem de soropositivos humanos foi de 84,4% (soroaglutinação modificada - MAT). Entre os 54 gatos testados o parasita foi isolado em 37 e ao se realizar a genotipagem, 14 isolados foram caracterizados como tipo I e 23 como tipo III. A ausência do tipo II nestes animais confirma os estudos realizados em galinhas de vida livre (Quadro 2) e pode-se perceber a ocorrência deste tipo em isolados de animais em outros países (DUBEY et al., 2004).

## 1.5 CONCLUSÃO

O *T. gondii* está disseminado em todo o mundo. Vários são os estudos de prevalência provando o potencial de infecção dos bovinos com *T. gondii*, porém poucos trabalhos foram realizados com isolamento do parasita nesta espécie animal, desta forma são necessários mais estudos para avaliar a importância do *T. gondii* como causador de abortamentos em bovinos, e transmissor do agente ao homem.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

– Estudar o *Toxoplasma gondii* em fêmeas bovinas de leite prenhes, naturalmente infectadas e abatidas em frigorífico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a prevalência da toxoplasmose nas fêmeas bovinas.
- Isolar *T. gondii* de sangue de vacas e tecidos e sangue de fetos.
- Caracterizar genotipicamente as cepas de *T. gondii* isoladas.

### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### PREVALENCE, ISOLATION AND GENOTYPE CHARACTERIZATION OF *Toxoplasma gondii* FROM NATURALLY INFECTED DAIRY CATTLE (*Bos taurus*)

Madlaine Frigo Silveira Barbosa de Macedo<sup>1</sup>

**Abstract:** *Toxoplasma gondii* is a worldwide parasite recognized as one of the main zoonosis in human beings. The present study aimed to isolate *Toxoplasma gondii* strains from dairy cows slaughtered in an abattoir for human consume and their fetuses naturally infected. Blood (with EDTA) from 60 pregnant dairy cows, and blood and tissue samples (brain, lung, heart, and liver) from their fetuses were collected and used for mouse bioassay. The presence of *T. gondii* was confirmed through indirectly by immunoflorescence assay (IFAT) considering positive animals with titers > 50 for cows and > 25 for fetuses. Antibodies against *T. gondii* were observed in 13.3% of cows and in 3.7% of fetuses. Thirteen fetuses (21.6%) and six (10.0%) cows had tissues and blood detected as positive in the mouse bioassay. Brain cysts from *T. gondii* were observed in two mice, one of them infected with blood sample from a cow (N. 53) with more than 4 years old in the 6<sup>th</sup> month of pregnancy, and in a mouse infected with blood sample from a fetus (N.103) in the 6<sup>th</sup> month of gestation. By PCR these cysts were detected as being of *T. gondii*. Genotyping characterization of both strains showed genotype II for all PCR-RFLP markers tested. The potential role of beef in epidemiology of *T. gondii* for human beings is yet enigmatic, and more studies are necessary to elucidate the real risk of this food for consumers, including the potential risk for meat workers once that blood samples were detected as positive.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*. Cattle. Isolation. Genotype characterization.

#### 3.1 INTRODUCTION

*Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite that infects a variety of cell types from a wide range of mammals and birds throughout the world, including humans. Human infection occurs by two main routes, ingestion of oocysts by consumption of contaminated drinking water or fresh vegetables and undercooked or raw meat containing tissue cysts of the parasite (ANDREWS et al. 1997). Overall, less than 1% of humans and livestock acquire *T. gondii* infection transplacental<sup>^</sup>. Usually, *T. gondii* does not produce clinic signals, but the primary infection during

pregnancy in women and some animal species (pig, goat, sheep, marsupials, monkeys, cats, dogs and horse), may result in abortion, fetal abnormalities or neonatal death (GILBERT; COOK; DUNN, 2000). Despite of isolation in cattle fetuses, *T. gondii* is not an important cause of abortion in cattle (CANADA et al., 2002; DUBEY, 1983, 1986).

The proportion of the human population that becomes infected by ingesting *T. gondii* infected meat, food or water contaminated with oocysts is unknown and currently there are no tests to distinguish meat versus oocysts acquired infections. The surge of infections in teenage and low prevalence in young children suggests that transmission by meat is important in the USA (DUBEY; JONES, 2008).

The ingestion of beef or dairy products is not considered important in the epidemiology of *T. gondii* because cattle are not a good host for this parasite. However, we cannot be sure that beef does not play a role in *T. gondii* transmission as only relatively small amounts of beef have been tested for viable *T. gondii* parasite (DUBEY; JONES, 2008).

The role of beef in the prevalence of *T. gondii* for humans needs to be studied. *Toxoplasma gondii* tissue cysts can survive in tissues from experimentally infected cattle for more than three years after infection (DUBEY; THULLIEZ, 1993). However, the parasite has rarely been isolated from naturally infected cattle tissues (GILOT-FROMONT et al., 2009). The present study aimed to determine the prevalence, to isolate *Toxoplasma gondii* and characterize genotypically the strains from dairy cows slaughtered in an abattoir for human consume and their fetuses naturally infected.

## 3.2 MATERIAL AND METHODS

### 3.2.2 Study Area and Sampling

The 60 samples were obtained from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) and their respective fetuses at an abattoir located at Presidente Getúlio municipality, Santa Catarina state, southern Brazil.

---

<sup>1</sup> Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Postal Box 6001, 86050-970, Londrina, PR, Brasil.

### 3.3 BIOASSAY FOR *T. GONDII*

Blood samples with EDTA (5ml) were collected from cows after bleeding, and from their fetuses. The white blood cells were separated by centrifugation (550xg -10min), and it was diluted in 1 ml of antibiotic saline solution (1,000 U penicillin and 100  $\mu$ l of streptomycin/ ml of saline solution) and inoculated subcutaneously into 3 mice (0.3 ml/ mouse). Tissues from fetuses, approximately 10g of each tissue (brain, lung, heart, and liver) for fetuses  $\geq$  3 months of gestational age, and a pool of organs (10g) for fetuses  $\geq$  3 months were obtained. For tissue digestions the protocol described by Dubey (1998) was used. Briefly, each sample was homogenized in a blender for 30 seconds in 250 ml of saline solution (0.14M NaCl). After homogenization 250 ml of pepsin solution (this proportion was added for equivalent to 50g of tissues) was added and incubated at 37 °C for 1 hour. The homogenate was filtered through 2 layers gauze and centrifuged at 1180 x g for 10 min. The supernatant was discarded and the sediment was resuspended in 20 ml PBS (pH 7.2) and 15 ml 1.2% sodium bicarbonate (pH 8.3) was added and centrifuged at 1180 x g for 10 min. The supernatant was discarded and the sediment was resuspended in 5 ml of antibiotic saline solution (1,000 U penicillin and 100  $\mu$ l of streptomycin/ ml of saline solution) and inoculated intraperitoneally into 2 mice (1ml/ mouse) for each organ or into 3 mice for pool of tissues. All mice were treated in the drink water with dexamethazone (10  $\mu$ g/ml) per 10 days after inoculation.

### 3.4 EXAMINATION OF MICE

Impression smears of lung from the mice that died were fixed in methanol, stained with Giemsa, and examined microscopically. Blood samples were drawn from the mice that survived 45 days after post-inoculation, and the brain of each mouse was examined microscopically for *T. gondii* tissue cysts by squashing a portion of brain between a coverslip and a glass slide. Serum from each mouse was diluted at 1:16 and 1:64 and examined for *T. gondii* antibodies, using IFAT. IgG Titers  $\geq$  16 were considered positive.

### 3.5 INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST (IFAT)

The blood samples of cows and their foetus were collected after bleeding and the seras was obtained and stored at -18 °C until be tested. IFAT to detect antibodies against *T. gondii* was performed according to Camargo (1973). Cow and fetus sera were diluted twofold starting at a dilution of 1:25. Cattle IgG antibodies were detected with flurescein isothiocyanate-conjugate rabbit anti-bovine IgG (Whole molecule - SIGMA®). Sera were considered positive if the entire surface of the tachyzoites were fluorescent in titers  $\geq 50$  for cows and  $\geq 25$  for fetuses.

### 3.6 DNA EXTRACTION AND PCR

The tissues from mouse bioassayed suspected with parasite infection had DNA extracted to be tested by PCR as described previously (GARCIA et al., 2006). The amplification of *T. gondii* DNA was performed by using the method described by Homan, Vercammen e Braekeleer (2000). Primers TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) and TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) were used; these were flanking a 529bp fragment of *T. gondii* DNA. PCR reaction was performed in a mixture containing 5µl of extracted DNA with 20µl (final volume of 25µl) of mixture of 0.5mM of each primer, 100mM dNTP (Invitrogen), 60mM Tris±HCl (pH=9.0), 15mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Amplification of parasite DNA was performed over 35 cycles in thermocycler PTC-200 (MJ-Research), using the following cycling conditions: 7min at 94°C for denaturation in cycle one, followed by 33 cycles on 60s at 94°C for denaturation, 60s at 55°C for annealing and 60s at 72°C for extension, cycle 35 was followed by a final extension of 10min at 72°C. Aliquots of each PCR were electrophoresed on 1% agarose gel. Tachyzoites of the RH strain (10<sup>7</sup>/ ml) were diluted in TE, and the DNA was extracted to be used as positive control. The negative control consisted of TE without *T. gondii*.

A positive and negative control was included in each test. A nested-PCR using Np21plus 5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC-3', Np6plus 5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3' as external primers (MUELLER et al.,1996) Np9 5'-GTTGCTCTGCTGACGTGTCGTTG-3' and Np10 5'-

CCAGAGTTCAGTGTCTGTGTTGAG-3' as internal primers were used for *Neospora caninum* differentiation.

### 3.7 GENOTYPING CHARACTERIZATION

For the genotypic characterization were used eight *T. gondii* strains: GTI, PGT, CTG, TgCgCal, MAS, TgCatBr5, TgCatBr64, and TgRsCrl. PCR-RFLP markers used were SAG2-3' and SAG2-5' (HOWE et al., 1997), SAG3 (GRIGG et al., 2001), GRA6 (FAZAELI et al., 2000) and c22-8, c29-2, PK1, Apico, SAG2-alt, CS3 (SU et al., 2006; PENA et al., 2008).

### 3.8 STATISTICAL ANALYSIS

Variables were analyzed by the Chi-square test ( $\chi^2$ ) corrected by Yates and the Fisher Exact Test, using the Epi Info program (CDC, 6.04b version). Association among variables and occurrence of seropositives were estimated from values obtained by the odds ratio (OR), a confidence interval at 95%. We have considered as significant a P-value of  $\leq 0.05$ .

### 3.9 RESULTS

#### 3.9.1 Seroprevalence for T. Gondii

Samples from 41 Jersey and 19 Holstein cows and their fetuses were obtained. Cows showed 13.3% (8/60) of prevalence for *T. gondii*. Jersey and Holstein cows showed 17.1% (7/41) and 5.2% (1/19) of prevalence (Table 1). Titers for cows were 50 (n=6), 100 (n=1), and 400 (n=1). 60 fetuses were obtained, 14 were in the first trimester of gestation, 28 in the second, and 18 in the third one. However, six fetuses had less than two months of age and sera were not obtained from these animals. Therefore, the seroprevalence of fetuses was 3.7% (2/54). Positive fetuses had titers of 50 and were five and seven months of gestational age.

**Table 1** – Outcome of association between variables (breed and gestational age) and presence of antibodies for *Toxoplasma gondii* (IFAT-IgG) in slaughtered dairy cows (*Sos taurus*) for human consume

Variables	Positives (%)	Negatives (%)	Total (%)	P	OR
<i>Breed</i>					
Jersey	7 (17.1)	34(82.9)	41(68.3)		
Holstein	1(5.3)	18(94.7)	19(31.7)		
Total	8 (13.3)	52(86.7)	60(100)	0.41 <sup>1</sup>	3,71
<i>Age of Gestation (trimester)</i>					
First	1 (7.2)	13(92.8)	14(26.1)		
Second	5(17.8)	23(82.2)	28(59.8)		
Third	2(11.1)	16(88.9)	18(14.1)	0.59 <sup>1</sup>	
Total	8 (13.3)	52(86.7)	60(100)		

<sup>1</sup>Chi-square by Fisher Exact; OR = odds ratio.

**Fonte:** autor.

### 3.10 MOUSE BIOASSAY EVALUATION

Sixteen (26.6%) out of sixty (60) slaughtered pregnant cows, eleven (11) Jersey and five (5) Holstein, were considered positive in bioassay either by detection in their bloods or in their fetuses (Table 2). From these 16 cows only one (N.131, Jersey, > 4 years-old, 7<sup>th</sup> month of gestation) had antibody titers detected by IFAT, and all animals were  $\geq 4$  months of pregnancy. Brain cysts from *T. gondii* were observed in two mice, one of them infected with blood sample from a cow (N. 53) with more than 4 years old in the 6<sup>th</sup> month of pregnancy, and in a mouse infected with blood sample from a fetus (N.103) in the 6<sup>th</sup> month of gestation.

**Table 2** – Positive results of mouse bioassay for *Toxoplasma gondii* performed in slaughtered pregnant dairy cows and their fetuses

Cattle (number)	IFAT <sup>1</sup>		Pregnancy <sup>2</sup> (month)	Bioassay <sup>3</sup>				
	Cow	Fetus		Blood Cows <sup>4</sup>	Foetus <sup>5</sup>			
					BI	Br	H	PO
06	N	N	6	(0)/3	(1)/2	(0)/2	(0)/2	(0)/2
25	100	N	7	(2)/3	(0)/2	(0)/2	(0)/2	(0)/2
34	100	N	4	(0)/3	(0)/2	(1)/2	(0)/2	(0)/2
37	50	N	6	(0)/3	(1)/2	(0)/2	(1)/2	(0)/2
39	N	N	4	(1)/3	(1)/2	(0)/2	(0)/2	(0)/2
40	N	N	7	(1)/3	(0)/2	(1)/2	(0)/2	(0)/2
53	N	N	6	(2)/3*	(0)/2	(0)/2	(0)/2	(0)/2
74	N	N	6	(0)/3	(0)/2	(1)/2	(1)/2	(0)/2
75	50	N	7	(0)/3	(1)/2	(1)/2	(0)/2	(0)/2
103	50	N	6	(1)/3	(2)/2 <sup>†</sup>	(1)/2	(1)/2	(1)/2
105	50	N	7	(1)/3	(1)/2	(0)/2	(0)/2	(1)/2
119	N	N	8	(0)/3	(1)/2	(0)/2	(0)/2	(0)/2
125	25	N	7	(0)/3	(1)/2	(0)/2	(0)/2	(1)/2
126	N	N	6	(0)/3	(1)/2	(0)/2	(0)/2	(0)/2
127	N	N	5	(0)/3	(1)/2	(1)/2	(1)/2	(0)/2
131	25	N	7	(0)/3	(0)/2	(0)/2	(0)/2	(1)/2

**Fonte:** autor.

<sup>1</sup>Indirect fluorescence antibody test. <sup>2</sup>Age in months <sup>3</sup>Results are expressed as number of mice positive for *T. gondii*. Numbers in parenthesis indicate the number of mice with antibody titers  $\geq 16$  (IFA) <sup>4</sup>Mouse bioassay was performed with blood from cows. <sup>5</sup>Fetuses with  $\geq 3$  months a pool of organs were used, and fetuses with  $> 3$  months tissue samples from blood (BI), brain (Br), heart (H), and pool of liver and lung (PO). N=negative. Isolation of \*brain cysts and <sup>†</sup>tachyzoites.

### 3.11 GENOTYPIC CHARACTERIZATION

In this study, the genotyping of two *T. gondii* isolates from blood sample of a cow with more than 4 years old in the 6<sup>th</sup> month of pregnancy and from blood sample of a fetus in the 6<sup>th</sup> month of gestation, revealed that the strains were characterized as genotype II in all genetic markers.

**Table 3** – Multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from urban rats

Isolated	Genetic markers												Genotype
	SAG 1	5-3SAG2	alt.SAG 2	SAG 3	BTU B	GRA 6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3	
V53 (TgBoBr1)	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II (PGT, ME49 strains)
F103 (TgBoBr2)	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	

**Fonte:** autor.

### 3.12 DISCUSSION

Results reported in this research antibodies to *T. gondii* in 13,3% of the pregnancy cows examined (8/60). Lower (COSTA; COSTA, 1978; GONDIM et al., 1999; MEIRELES et al., 2003; SPAGNOL et al., 2009) and higher (ALBUQUERQUE et al., 2005; COSTA et al., 1978; COSTA et al., 2001; DAGUER et al., 2004; FERRARONI; MARZOCHI, 1980; GARCIA et al., 1999; MARANA et al., 1994; MARANA et al., 1995; OGAWA et al., 2005; SANTOS et al., 2009) frequencies have been observed in studies with cattle in different states of Brazil.

*Toxoplasma gondii* was firstly described in cattle from four widely separated farms in Ohio, United States, by Sanger et al. (1953). It was isolated from internal organs of two naturally infected calves and colostrum of a cow. Since then, studies were performed and unsuccessful (DUBEY; STREITEL, 1976; PASSOS et al., 1984; DUBEY et al., 2005) and successful isolation (CANADA et al., 2002; CÁTAR et al., 1969; COSTA et al., 2011) of *T. gondii* were reported in cattle infected naturally.

In the present work, we isolated by mouse bioassay *T. gondii* from naturally infected animals, one of them from blood of a pregnant cow (cow number 53, Holstein), and another one from blood of a fetus (from cow number 103, Jersey). However, Dubey and Thulliez (1993) failures to isolate the parasite from blood in calves and pregnant cows infected with high doses of oocysts. Oliveira (2001), in a comparative study of experimental infection of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* with oocysts of *T. gondii*, isolated this parasite from the blood and clinical disorders observed in all three species, being more pronounced in *Bos*

*taurus*. Scarpelii et al. (2009) detected parasitemia by the seroconversion of mice inoculated with leukocyte layers and tissue parasitism using the bioassay in all the bovines experimentally infected (*Bos taurus* and *Bos indicus*).

There is a difficulty in detection of *T. gondii* in tissues from cattle because of the size of sample examined and the possibility that the parasite may be present in unexamined parts of tissues. A negative result does not necessarily mean that the whole tissue is free of the parasite (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999). However, an experimental study showed that *T. gondii* encysts in bovine tissues as early as 11 days after infection (DAI) and may remain encysted up to 287 DAI (DUBEY, 1983). Additionally, in experimentally infected steers tissue cysts were isolated from organs from one animal after three years of infection with oocysts (DUBEY; THULLIEZ, 1993).

In this work was observed the transplacentally transmission of *T. gondii* from naturally infected cattle, according to the described Stalheim et al. (1980). Canada et al. (2002) isolated the *T. gondii* by bioassay of fetal brains in mice from two aborted fetuses checking the transplacental<sup>^</sup> transmission. Costa et al. (2011), observed in a study of naturally and experimentally infected cattle with *T. gondii* the infection transplacental<sup>^</sup>, although uncommon, occurs naturally and that the pathogenicity of the strain can influence the probability this route of infection.

Studies using a large number of *T. gondii* isolates from chickens, cats, and capybaras from Brazil were performed (DUBEY; SU, 2009; PENA et al., 2008; YAI et al., 2009), and these authors reach some conclusions, a) there is absence of type II strain, b) type I strain was rare, c) and most strains were not clonal, suggesting recombination and efficient transmission by oocysts. Interesting the fact that genotyping characterization of *T. gondii* strains from our work revealed that the strains were genotype II in all genetic markers. Da Silva et al. (2011) described the existence of type II genotype in sheep from slaughtered in São Paulo state, Brazil. Thus, considering these results, the first one conclusion is not valid for dairy cattle and sheep in Brazil. These results indicate that the *T. gondii* population in Brazil is highly diverse with a few successful clonal lineages expanded into wide geographical areas.

Further investigations need to be performed to elucidate the potential role of beef in epidemiology of *T. gondii* for human beings. Including the risk for butchers, and meat workers once that blood samples were detected as positive. This

could consider: seroprevalence of *T. gondii* in cattle from the region, seroprevalence of cats (that could show how environment are contaminated), age of animals, breed of animals, consume habits of population, number of animals in the study, organs and meat sampled, and weight of sample. Esteban-Redondo and Innes (1997) described that beef and milk cannot be ruled out as potential reservoirs of infection in the epidemiology of the disease.

### 3.13 CONCLUSION

It was observed the infection transplacentally in dairy cattle infected naturally. The *T. gondii* was isolated from bloods of a cow and one fetus by mouse bioassay and characterized genotyping by PCR-RFLP with being genotype II. These findings confirm the high diversity genotypes among Brazilian animals and further investigations are need to elucidate the epidemiology of *T. gondii*.

### 3.14 REFERENCES

- ALBUQUERQUE, G. R.; MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; SILVA, R. T.; ALMEIDA, C. R. R.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. G. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros do vale do Paraíba Sul Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 125-128, 2005.
- ANDREWS, C. D.; DUBEY, J.P.; TENTER, A. M.; WEBWRT, D. W. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens H4 and H11: use in ELISA for detection of toxoplasmosis in swine. **Veterinary Parasitology**, v. 70, p. 1-11, 1997.
- CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira Patologia Clínica**, v. 10, p. 143-171, 1973.
- CANADA, N.; MEIRELES, C. S.; ROCHA, A.; CORREIA DA COSTA, J. M.; ERYCSON, M. W.; DUBEY, J. P. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted fetuses. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1247-1248, 2002.
- CÁTAR, G.; BERGENDI, L.; HOLKOVA, R. Isolations of *Toxoplasma gondii* from swine and cattle. **Journal of Parasitology**, v. 55, n. 5, p. 952-955, 1969.
- COSTA, A. J.; COSTA, E. P. Frequência de bovinos reagentes à reação de Imunofluorescência Indireta para *Toxoplasma gondii* em Poços de Caldas, MG, Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 30, n. 1, p. 47-51, 1978.

COSTA, A. J.; KASAI, N.; PAULILLO, A. C.; SILVA, M. B.; GALESKO, H. Anticorpos anti-toxoplasma em soros de bovinos do município de Jaboticabal, S.P., Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 4, n. 45, p. 299-302, 1978.

COSTA, G. H. N.; CABRAL, D. D.; VARANDAS, N. P.; SOBRAL, E. A.; BORGES, F. A.; CASTAGNOLLI, K. C. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 61-66, 2001.

COSTA, H.N.G.; COSTA, A. J. DA; LOPES, W.D.Z.; BRESCIANI, K.D.S.; SANTOS, T.R. dos; ESPER, C.R.; SANTANA, A.E. *Toxoplasma gondii*: Infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 277-281, 2011.

DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; VIRMOND M. P.; HARMANN, W.; AMENDOEIRA, M. R. R. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1133-1137, 2004.

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SU, C.; SILVA, A. V. DA. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 173-177, 2011.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 22, n. 3-4, p. 177-202, 1986.

\_\_\_\_\_. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 199-211, 1983.

\_\_\_\_\_. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75-77, 1998.

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

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; JONES, J. L.; HIGHTOWER, A. W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. 2005. PREVALENCE of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1082-1093, 2005.

DUBEY, J. P.; STREITEL, R. H. Prevalence of *Toxoplasma* infection in cattle slaughtered at an Ohio abattoir. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 169, 1197-1199, 1976.

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

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 2, p. 270-273, 1993.

ESTEBAN-REDONDO, I; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 191-196, 1997.

ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S.W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E. A.. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 155-171, 1999.

FAZAELI, A.; CARTER, P. E.; DARDE, M. L.; PENNINGTON, T. H. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 637-642, 2000.

FERRARONI, J. J.; MARZOCHI, M. C. A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos da Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 75, 1-2, 99-109, 1980.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L; OLIVEIRA, R.C. de. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S. M.; MACHADO, R. Z. *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 267-271, 2006.

GILBERT, R.; COOK, A.; DUNN, D. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: a European multicenter case-control study. **British Medical Journal**, v.312, p. 142-147, 2000.

GILOT-FROMONT, E.; AUBERT, D.; BELKILANI, S.; HERMITTE, P.; GIBOUT, O.; GEERS, R.; VILLENA, I. *Toxoplasma gondii* in beef cattle herds from Champagne-Ardenne, France. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 36-40, 2009.

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

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 633-639, 2001.

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

HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411-1414, 1997.

MARANA, E. R. M.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; LOTT, R. Ocorrência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte, abatidos em matadouros do norte do Paraná - Brasil. **Semina**, v. 15, n. 1, p. 38- 40, 1994.

MARANA, E. R. M.; VENTURINI, A.C.H.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I.T. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em rebanhos de bovinos de leite do norte do Paraná - Brasil. **Semina**, v. 16, n. 1, p. 40-42, 1995.

MEIRELES, L. R.; GALISTEO JÚNIOR, A.J.; ANDRADE JÚNIOR, H.F. de. Levantamento sorológico de anticorpos para o *Toxoplasma gondii* em animais do estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 4, p. 267-271, 2003.

MÜELLER, N.; ZIMMERMANN, V.; HENTRICH, B.; GOTTSTEIN, B. Diagnoses of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2850-2852, 1996.

OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 312 -316, 2005.

OLIVEIRA, F. C. R. de; COSTA, A. J. da; SABATINI, G. A. Clínica e Hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 621-626, 2001.

PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D.; FIGUEIREDO, B. L. Determinação da infecção por *Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos em Belo Horizonte (MG) através da frequência de anticorpos e tentativa de isolamento a partir de musculatura diafragmática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, p. 581-589, 1984.

PENNA, H. F.J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International for Parasitology**, v. 38, p. 561-569, 2008.

SANGER, V. L.; CHAMBERLAIN, D. M.; CHAMBERLAIN, K. W.; COLE, C. R.; FARREL, R. L. Toxoplasmosis. V. Isolation of *Toxoplasma* from cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 123, n. 917, p. 87-91, 1953.

SANTOS, T. R.; COSTA, A.J.; TONIOLLO, G.H.; LUVIZOTTO, M.C.; BENETTI, A.H.; SANTOS, R. R.; MATTA, D. H.; LOPES, W. D.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVEIRA, G.P. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jaurú, micro-region, Mato Grosso, state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 324-326, 2009.

SCARPELLI, L.; LOPES, W. D. Z.; MIGANI, M. ;BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 59-64, 2009.

SPAGNOL, F. H.; PARANHOS, E. B.; OLIVEIRA, L. L. S.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. G.; ALBUQUERQUE, G. R. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos matadouros do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 42-45, 2009.

STALHEIM, O.H.V.; HUBBERT, W.T.; BOOTHE, A.D., ZIMMERMAN, W.J.; HUGHES, D.E., BARNETT, D.; RILLEY, J.L.; FOLEY, J. Experimental toxoplasmosis in calves and pregnant cows. **American Journal Veterinary Research**, v. 41, p. 10-13, 1980.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal of Parasitology**, v. 36, p. 841-848, 2006.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M. A.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 332-337, 2009.

#### 4 CONCLUSÕES

– A prevalência de anticorpos IgG contra *T. gondii* foi de 13,3% nas vacas e de 3,7% nos fetos.

– *T. gondii* foi isolado de sangue de vaca leiteira prenha e feto, demonstrando a passagem transplacentária do parasita.

– A genotipagem caracterizou as cepas isoladas como tipo II, genótipo incomum no Brasil.

– Outros estudos devem ser realizados para verificar o potencial dos bovinos na transmissão da toxoplasmose para seres humanos.

## REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Toxoplasmosis. In: ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE LA SALUD. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. Washington, 1986. p. 646-658.
- ALBUQUERQUE, G. R.; MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; SILVA, R. T.; ALMEIDA, C. R. R.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. G. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros do vale do Paraíba Sul Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 125-128, 2005.
- AMATO NETO, V.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- ANDREWS, C. D.; DUBEY, J. P.; TENTER, A. M.; WEBWRT, D. W. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens H4 and H11: use in ELISA for detection of toxoplasmosis in swine. **Veterinary Parasitology**, v. 70, p. 1-11, 1997.
- ARIAS, M. L.; REYES, L.; CHINCHILLA, M.; LINDER, E. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in meat producing animals in Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**, v. 42, n. 1/2, p. 15-20, 1994.
- BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; DA SILVA, E. M. K.; BORTOLIERO, A. L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 21-25, 1997.
- CANADÁ, N.; MEIRELES, C. S.; ROCHA, A.; CORREIA DA COSTA, J. M.; ERYCSON, M. W.; DUBEY, J. P. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted fetuses. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1247-1248, 2002.
- COLE, C.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. Detection of *Neospora caninum* in tissue sections using a murine monoclonal antibody. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 579-584, 1993.
- COOK, A. J.; GILBERT, R. E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P. A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A. E.; DUNN, D. T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: a European multicentre case-control study. **British Medical Journal**, v. 15, p. 142-147, 2000.
- COSTA, A. J.; COSTA, E. P. Frequência de bovinos reagentes à reação de Imunofluorescência Indireta para *Toxoplasma gondii* em Poços de Caldas, MG, Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 30, n. 1, p. 47-51, 1978.
- COSTA, A. J.; KASAI, N.; PAULILLO, A. C.; SILVA, M. B.; GALESCO, H. Anticorpos anti-toxoplasma em soros de bovinos do município de Jaboticabal, S.P., Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 4, n. 45, p. 299-302, 1978.

COSTA, G. H. N.; CABRAL, D. D.; VARANDAS, N. P.; SOBRAL, E. A.; BORGES, F. A.; CASTAGNOLLI, K. C. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 61-66, 2001.

COSTA, H. N. G.; COSTA, A. J.; LOPES, W. D. Z.; BRESCIANI, K. D. S.; SANTOS, T. R.; ESPER, C. R.; SANTANA, A. E. *Toxoplasma gondii*: Infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 277-281, 2011.

DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; VIRMOND, M. P.; HARMANN, W.; AMENDOEIRA, M. R. R. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1133- 1137, 2004.

DARDÉ, M. L. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. In: GROSS, U. ***Toxoplasma gondii***. Berlin: Springer, 1996. p. 27-41.

DARDE, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzimic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocalisation on polyacrylamide gels. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, p. 551-558, 1988.

DEROUIN, F.; MAZERON, M. C.; GARIN, Y. J. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1597-1600, 1987.

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

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

\_\_\_\_\_. A review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 22, n. 3/4, p. 177-202, 1986.

\_\_\_\_\_. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 199-211, 1983.

\_\_\_\_\_. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidian of man and animals. In: KREIER, J. P. (Ed.). **Parasitic protozoa-gregarines, haemogregarines, coccidian, Plasmodia and haemoproteids**. New York: Academic Press, 1977. v. 3, p. 101-237.

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

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brasil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 99-105, 2002.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. *Toxoplasma gondii* isolates of free ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 851-853, 2003d.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T.; DAVIS, M. F.; MORISHITA, T. Y. *Toxoplasma gondii* isolates from free ranging chickens from the United States. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 1060-1062, 2003c.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs isolation of the causative organism and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 1259-1263, 1988.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná Barzil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 229-234, 2003e.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animal and man**. Boca Raton: C.R.C. Press, 1989.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 2, p. 270-273, 1993.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; HILALI, M.; EL-GHAYSH, A. SREEKUMAR, C.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; LEHMANN, T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 85-89, 2003b.

DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; PISCOPO, M.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free ranging chickens from Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 1063-1064, 2003a.

ELLIS, J. T. Polimerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1053-1060, 1998.

ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S. W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tessues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 155-177, 1999.

FERNANDES, W. J.; BARBOSA, W. Toxoplasmose: Notas sobre sua ocorrência em animais domésticos em Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 2, n. 1, p. 259-265, 1972.

FERRARONI, J. J.; MARZOCHI, M. C. A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos da Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, n. 1-2, p. 99-109, 1980.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis in human beings. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 240-248, 1990.

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

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999.

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

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THÜR, B.; BUSATO, A.; STÄRK, K. D. C.; MÜLLER, N. Molecular and iminodiagnóctic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 679-691, 1998.

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

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal linages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 72, p. 1561-1566, 1995.

JAMRA, L. F.; DEANE, M. P.; GUIMARÃES, E. C. On the isolation of *Toxoplasma gondii* from human food and animals origin. Partial results in the city of São Paulo (Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 11, n. 3, p. 169-176, 1969.

MARANA, E. R. M.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; LOTT, R. Ocorrência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte, abatidos em matadouros do norte do Paraná - Brasil. **Semina**, v. 15, n. 1, p. 38- 40, 1994.

MARANA, E. R. M.; VENTURINI, A. C. H.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T. Ocorrência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em rebanhos de bovinos de leite do norte do Paraná - Brasil. **Semina**, v. 16, n. 1, p. 40-42, 1995.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MACCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 607-625, 1999.

MEIRELES, L. R.; GALISTEO JÚNIOR, A. J.; ANDRADE JÚNIOR, H. F. Levantamento sorológico de anticorpos para o *Toxoplasma gondii* em animais do estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 4, p. 267-271, 2003.

MONDRAGON, R.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 639-641, 1998.

MORE, G.; BASSO, W.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *toxoplasma gondii* infections in cattle. **Parasitology Research**, v. 102, p. 671-675, 2007.

NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, PR. **Semina**, v. 13, p. 15-18, 1992.

NEVES, D. P. **Parasitologia dinâmica**. São Paulo: Atheneu, 2003.

OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T; Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 312 -316, 2005.

OLIVEIRA, F. C. R. ; COSTA, A. J. ; SABATINI, G. A. Clínica e Hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 621-626, 2001.

PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D.; FIGUEIREDO, B. L. Determinação da infecção por *Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos em Belo Horizonte (MG) através da frequência de anticorpos e tentativa de isolamento a partir de musculatura diafragmática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, p. 581-589, 1984.

SAGER, H. I.; FISCHER, K.; FURRER, M.; STRASSER, A.; WALDVOGEL, P. BOERLIN, L.; AUDIGÉ, GODSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*- associated bovine abortions by PCR, histopatology and serology. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 1-15, 2001.

SANGER, V. L.; CHAMBERLAIN, D. M.; CHAMBERLAIN, K. W.; COLE, C. R.; FARREL, R. L. Toxoplasmosis. V. Isolation of *Toxoplasma* from cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 123, n. 917, p. 87-91, 1953.

SANTOS, T. R.; COSTA, A. J.; TONIOLLO, G. H.; LUVIZOTTO, M. C. R.; BENETTI, A. H.; SANTOS, R. R.; MATTA, D. H.; LOPES, W. D. Z.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, G.P. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 324-326, 2009.

SAVVA, D.; MORRIS, J. C.; JOHNSON, J. D.; HOLLIMAN, R. E. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 32, p. 25-31, 1990.

SCARPELLI, L.; LOPES, W. D. Z.; MIGANI, M.; BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 59-64, 2009.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 1135-1145, 1997.

SPAGNOL, F. H.; PARANHOS, E. B.; OLIVEIRA, L. L. S.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. G.; ALBUQUERQUE, G. R. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos matadouros do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 42-45, 2009.

SPOSITO FILHA, E.; AMARAL, V.; MACRUZ, R.; BARCI, L. A. G.; REBOUÇAS, M.M.; SANTOS, S. M.; RINALD, C. A. S. *Toxoplasma gondii* em bovinos: evidência do parasita a partir de retina e diafragma de animais abatidos em matadouros do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 55, n. 1/4, p. 43-47, 1988.

SREEKUMAR, C.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; LEHMANN, T.; RAMAN, M.; BHALERAO, D. P.; VIANNA, M. C.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 187-194, 2003.

STEUBER, S.; NIU, A.; BAUER, C.; REETZ, J.; ROTH, A.; JANITSCHKE, K. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of ovine abortion using the polymerase chain reaction. **Deutsch Tierärztliche Wochenschrift**, v. 102, p. 91-93, 1995.

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

UGGLA, A.; SJÖLAND, L.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasmosis* in fetuses and fetal membranes of sheep. **American Journal Of Veterinary Research**, v. 48, p. 348-351, 1987.

WASTLING, J. M.; NICOLL, S.; BUXTON, D. Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. **J. Medical Microbiology**, v. 38, p. 360-365, 1993.