

ÉRICA PAES BARRETO XAVIER DE MORAES

**ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E REPRODUTIVOS DA
INFECÇÃO NATURAL E EXPERIMENTAL EM OVINOS POR
*Toxoplasma gondii***

RECIFE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ÉRICA PAES BARRETO XAVIER DE MORAES

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E REPRODUTIVOS DA
INFECÇÃO NATURAL E EXPERIMENTAL EM OVINOS POR
Toxoplasma gondii

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Co-orientador:

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

RECIFE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E REPRODUTIVOS DA INFECÇÃO
NATURAL E EXPERIMENTAL EM OVINOS PELO *Toxoplasma gondii*

Tese de Doutorado elaborada por

ÉRICA PAES BARRETO XAVIER DE MORAES

Aprovada em 24/02/2010.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
Departamento de Genética - UFPE

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Colegiado de Zootecnia - UNIVASF- PE

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto
Campus Arapiraca - Pólo Viçosa - UFAL

Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Dedico ao meu pai Francisco Xavier de Moraes Filho,
Médico Veterinário, que me ensinou a amar os animais, honrar a
nossa profissão e acreditar em um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar sempre.

Aos meus pais, Ceres e Francisco pela dedicação em minha criação, educação e formação, sempre com muito amor e carinho, sendo a grande base da minha vida.

Ao meu esposo, Luiz Augusto (Guto), pelo amor que construímos e por estarmos sempre unidos, principalmente nos momentos mais difíceis.

Às minhas irmãs, Flavia e Adriana, pelas palavras de incentivo e carinho. À minha cunhada Priscilla por toda ajuda, conselhos e grata amizade. E ao meu pequeno sobrinho Luiz Felipe, por ter me proporcionado momentos de ternura e descontração quando mais precisei.

Ao meu amigo e orientador, Prof. Rinaldo Aparecido Mota para o qual minha gratidão ultrapassa esta tese. Agradeço de modo particular sua amizade por ter me estendido a mão em um momento difícil da minha vida. Agradeço a sua confiança na realização deste trabalho, sobretudo o privilégio de trabalhar com um profissional verdadeiramente completo.

Ao meu co-orientador, Prof. Manoel Adrião e a Prof. Áurea Wischral por abrirem as portas do laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada de uma forma tão gentil e prestativa.

Ao Prof. Antônio Carlos de Freitas da UFPE pela receptividade em seu laboratório e ensinamentos valiosos que muito contribuíram para esta tese.

A Profa. Madalena Guerra a quem tenho respeito e admiração, agradeço o apoio e conselhos.

Ao meu grande amigo e parceiro profissional André Mariano, pela ajuda, compreensão, conselhos, ensinamentos e amizade. E as minhas eternas amigas Grazielle Aleixo e Sildivane Silva pelo nosso companheirismo desde a época da graduação, sempre juntas na alegria e na tristeza. Adoro vocês!

Ao prof. Leonildo Galiza com quem sei que sempre poderei contar, agradeço pelas conversas, conselhos e amizade. E aos amigos Andréa Alice e José Wilton pelas dicas, conselhos, amizade e análise estatística dos artigos.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas, Mércia Barros, Érika Samico, Karla Patrícia, Pomy Kim, Pedro Paulo, Orestes, André, Vanessa, Eduardo Guelfer, Sérgio Alcântara, Beth Sampaio, Anízia, Suênia, Sérgio Nascimento e Guiomar agradeço pela grande ajuda e pelo dia-a-dia harmonioso, tornando nosso "labora" uma grande equipe! Em especial a minha mais nova amiga Nair Lira por em tão pouco tempo de amizade ser fundamental nos momentos difíceis. E ao Eduardo Faria pela grande contribuição na fase experimental deste estudo.

À Angélica Ramos pelos valiosos ensinamentos e a todo "pessoal da genética" Rafaelle, Carol, Luciana Coutinho, André, Isadora e toda a equipe do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental/UFPE, pela contribuição e amizade.

À Profa. Márcia Figueiredo e Verônica Arnis da Patologia/UFRPE e ao Prof. Antônio Flávio da Universidade Federal de Campina Grande - Patos pela ajuda para realização dos exames anátomo-histopatológicos.

À Profa. Roberta Lemos da Universidade Estadual de Londrina por ter cedido a cepa do *T. gondii* utilizada neste estudo.

Aos Profs. Mateus Matiuzzi da UNIVASF e Valdir Braga da UFPB pela contribuição na elaboração dos artigos científicos.

Aos Profs. do Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE, Jean Carlos Ramos, Andréa Paiva, Leucio Alves, Rita Maia, Pierre Soares, Silvana Suely Rabelo, Frederico Maia pelos conselhos e palavras de incentivo.

Aos amigos que fiz na Pós-Graduação, Alessandra, Adriana Trindade, Rosangela, Paula, Ricardo, Marcelo, Filipe, Cristiano, Arthur, Edvaldo, pela

convivência alegre e saudável, em especial à Glenda Luna pela amizade e apoio direto na realização dessa pesquisa.

À coordenação da Pós-Graduação em Ciência Veterinária pela oportunidade e a Edna Cherias pelo apoio e ajuda durante todo o curso.

Ao Pessoal da Biblioteca Central da UFRPE, especialmente à Ana Katarina do COMUT e Suely Manzi que me ajudaram na pesquisa científica e formatação desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de pesquisa e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo financiamento da parte experimental, fatores estes que muito contribuíram para viabilização desta tese.

Aos representantes Pedro da Socil e Ted Monteiro da Agroútil pelo patrocínio do manejo nutricional e sanitário das ovelhas utilizadas nos experimentos deste trabalho.

Aos criadores de ovinos e à Associação Pernambucana dos Criadores de Caprinos e Ovinos (APECCO), em especial à Dra. Rozangela Ferreira, que contribuíram cedendo os animais para colheita de material biológico para realização deste estudo.

A todo pessoal da Fazenda Pocinhos D'Água, pela enorme dedicação aos experimentos e contribuição fundamental para a realização dos mesmos.

Aos animais que ingenuamente contribuíram com a ciência.

A todos que de alguma forma me deram força e incentivo na realização deste estudo, seja profissional ou pessoalmente. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso!

Jesus que baixastes à Terra e Vos fizestes homem para que
melhor Vos compreendêssemos, que ficastes na Eucaristia para nunca
mais nos abandonar !

Jesus cuja doutrina foi amar primeiro a Deus e
logo depois ao próximo.

Não seria o cavalo que me leva e me traz do trabalho, meu
próximo? Não seria meu próximo o cachorro que protege os meus bens da
ambição alheia e caminha comigo contente?

Se é assim, eu que amo tanto os animais e os considero irmãos
meus, venho pedir-Vos Senhor Jesus, que depositeis em cada coração
humano uma gota a mais de amor pelos animais indefesos, que tanto
amam os homens e que são tão pouco amados por estes.

Dai-lhes um coração amoroso para amar estas criaturas, mente
aberta para compreendê-los e mãos para acariciá-los, pois se o Homem é
o Rei da Criação, deve fazer seus súditos felizes !

ORAÇÃO DOS ANIMAIS

(Isabel Calla, 14 anos, Sevilha - Espanha)

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho, estudar os aspectos clínicos, epidemiológicos, patológicos e reprodutivos da infecção natural e experimental por *Toxoplasma gondii* em ovinos. No primeiro, estudou-se a transmissão venérea do *T. gondii* através da infecção experimental via sêmen em 41 ovelhas soronegativas e divididas em três grupos: G1: 15 fêmeas inseminadas com sêmen contaminado com $6,5 \times 10^4$ taquizoítos; G2: 15 com 4×10^7 taquizoítos e G3: 11 fêmeas inseminadas com sêmen sem taquizoítos. Para a confirmação da infecção pelo *T. gondii* foram realizados exames sorológicos e detecção do DNA parasitário no sangue, através do PCR *nested* aos 0, 7, 14, 21, 28, 49, 63, 123 dias pós infecção (p.i.). No G1 apenas 5/15 (33,3%) fêmeas soroconverteram, enquanto que no G2 15/15 (100%) soroconverteram. Na PCR *nested* observou-se que 14/15 (93,3%) das fêmeas do G1 e 14/15 (93,3%) do G2 foram positivas para *T. gondii* e no G3 todas as amostras foram negativas. Os transtornos reprodutivos foram diagnosticados através de exames ultra-sonográficos e observou-se que no G1, 9/15 (60%) apresentaram reabsorção embrionária e 40% delas mantiveram a gestação, observando-se partos normais e distócicos, natimortos e atonia uterina. No G2 observaram-se reabsorções embrionárias em 15/15 (100%) das ovelhas e outras patologias como 2/24 (8,3%) hidrometra, 2/24 (8,3%) mucometra e 2/24 (8,3%) cistos foliculares. No G3, 8/11 fêmeas gestaram e pariram fetos viáveis. No exame histopatológico observaram-se lesões características da toxoplasmose em placentas e PCR *nested* positiva em todos os órgãos dos natimortos e placentas examinados. Em uma próxima etapa do estudo, as 24 ovelhas não gestantes (G1 e G2) foram submetidas à estação de monta controlada e destas 15/24 (62,5%) emprenharam. Aquelas que não emprenharam apresentaram patologias reprodutivas como: anestro (66,6%), cistos foliculares (11,1%), hidrometra e mucometra (22,2%). No segundo experimento pesquisou-se a eliminação de *T. gondii* no sêmen de reprodutores ovinos naturalmente infectados. Foram utilizados 65 reprodutores submetidos inicialmente à pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI). Os animais sorologicamente positivos foram submetidos à colheita de sêmen para detecção do DNA parasitário. Na sorologia observaram-se 6/65 (9,2%) animais positivos. No PCR *nested* de sêmen 4/6 (66,6%) animais foram positivos. No terceiro experimento foram examinados 245 órgãos de fetos abortados e natimortos, além de 28 placentas procedentes de ovelhas com distúrbios reprodutivos. À necropsia foram coletados fragmentos de cérebro, cerebelo, medula, pulmão, coração, baço, fígado e placenta para realização do PCR *nested* e exame histopatológico. Na PCR *nested* foram confirmados três fetos e dois natimortos (14,3%) positivos para *T. gondii* em órgãos fetais e placentas, destacando-se o coração e a placenta como órgão de predileção. No exame histopatológico foram observadas lesões macroscópicas sugestivas da infecção por *T. gondii* em 2/35 (5,7%) das placentas, além de lesões características da toxoplasmose nas placentas como infiltração não supurativa, múltiplos focos de necrose e mineralização, além da presença de cistos teciduais. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a inseminação utilizando sêmen fresco experimentalmente contaminado com diferentes doses de taquizoítos de *T. gondii* é capaz de infectar ovelhas e provocar patologias reprodutivas, comprometendo a vida reprodutiva das fêmeas. A detecção da forma proliferativa do parasito no sêmen de reprodutores naturalmente infectados por meio da técnica da PCR *nested*, reforça a necessidade de intensificar os estudos sobre a possibilidade da transmissão horizontal do parasito via sêmen na espécie ovina. Além disso, constatou-se envolvimento de *T. gondii* em fetos abortados e em placentas de ovinos naturalmente infectados no Brasil; esses dados não haviam sido descritos anteriormente na literatura.

Palavras chaves: toxoplasmose ovina, sêmen, infecção, aborto, diagnóstico.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the clinical, epidemiological, parasitological and reproductive aspects of the *T. gondii* natural and experimental infection in sheep. Firstly, *Toxoplasma gondii* venereal transmission via experimental infection was studied 41 seronegative sheep divided in three groups: G1, where 15 females were inseminated with semen containing 6.5×10^4 tachyzoites; G2, where 15 females were inseminated with semen containing 4×10^7 tachyzoites; and G3: 11 females inseminated with tachyzoite-free semen. In order to confirm the *T. gondii* infection via semen, serological tests were performed as well as the DNA of the parasite was detected in the blood using nested PCR at 0, 7, 14, 21, 28, 49, 63 and 123 days post-infection (p.i.). In the G1 only 5/15 (33.3%) of the females seroconverted, while in G2 15/15 (100%) seroconverted. Regarding nested PCR analysis, it was observed that 14/15 (93.3%) of the females in the G1 and 14/15 (93.3%) from G2 were positives for *T. gondii*. On the other hand, in G3 all samples were negative. In addition, the reproductive disturbances were diagnosed using ultrasound and it was observed that in G1, 9/15 (60%) presented embryonic reabsorption and 40% kept gestation, showing normal or dystocic delivery, stillborns and uterine atony. In the G2, embryonic reabsorption was present in 15/15 (100%) of the sheep associated with other pathologies such as 2/24 (8.3%) hydrometra, 2/24 (8.3%) mucometra and 2/24 (8.3%) follicular cysts. In the G3, 8/11 of females kept gestation and delivered healthy fetuses. Besides, histopathology showed toxoplasmosis-like lesions in placentas as well as nested PCR was positive for all organs from stillborn and placenta examined. In the next step of the study, 24 non-pregnant sheep (G1 and G2) were submitted to controlled mating season and 15/24 (62.5%) got pregnant while 9/24 (37.5%) did not. Those who did not get pregnant presented reproductive pathologies such as anestrus (66.6%), follicular cysts (11.1%), hydrometra and mucometra (22.2%). Next, it was investigated the elimination of *Toxoplasma gondii* in semen from naturally infected males. In this regard, 65 males were submitted to anti-*T. gondii* antibody screening using Indirect Immunofluorescence (IFI). Animals serologically positive were submitted to semen collection for parasite DNA detection. In the serological test 6/65 (9.2%) of the animals were positive. In the nested PCR using semen 4/6 (66.6%) of the animals were also positive. In the third series of experiments, 245 organs from stillborns and 28 placentas from sheep with reproductive disturbances were evaluated. Following necropsy, brain, cerebellum, spinal cord, lungs, heart, spleen, liver and placenta were harvest for nested PCR and histopathology. Nested PCR confirmed three fetuses and 2 stillborns (14.3%) positive for *T. gondii* in fetal organs and placenta, where heart and placenta were the most affected ones. Histopathology evidenced macroscopic damage suggesting *T. gondii* infection in 2/35 (5.7%) of the placentas, and toxoplasmosis-like damage in placentas with non-suppurative infiltration, several necrosis focuses associated to tissue cysts. In conclusion, insemination using fresh semen experimentally contaminated with different doses of tachyzoites from *T. gondii* is capable of infecting sheep and produce reproductive pathologies, compromising the reproductive life of females. The detection of the proliferative form of the parasite in semen from males naturally infected by nested PCR reinforces the need for intensifying studies about the possibility of horizontal transmission of the parasite via semen in sheep. In addition, we reported the involvement of *T. gondii* in aborted fetuses and placentas of sheep naturally infected in Brazil; these data have not been described earlier in the literature.

Key-words: toxoplasmosis in sheep, semen, infection, abortion, diagnose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 - Ciclo biológico de *T. gondii* 20

Figura 2 - Consequências da primoinfecção por *T. gondii* 22

Artigos Científicos

Artigo 2:

Figure 1 - Ultrasound screening showing reproductive pathologies in sheep infected via semen by *T. gondii*: embryonic reabsorption (A), hydrometra (B), mucometra (C) and follicular cyst (D). 76

Artigo 3:

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 2% de produtos de amplificação por PCR *nested* de *T. gondii* em amostras de soro, tecidos fetais e placentários na primeira (A) e segunda (B) amplificações. Onde: Marcador de massa molecular de 100pb DNA Ladder, Promega®, (M), Amostras positivas na primeira (1 e 3) e segunda (1, 2 e 3) amplificações, Amostra negativa (4), Controle positivo (C+) e Controle negativo (C-). 100

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1- Frequência de ovinos sororreagentes ao <i>T. gondii</i> nas diferentes Unidades Federativas do Brasil.	24
---	----

Artigos Científicos

Artigo 1:

Table 1 - PCR and serology results in all experimental groups after <i>T. gondii</i> infection using infected semen.	53
---	----

Artigo 2:

Table I - Samples of fetal tissues, stillborns and placenta nested-PCR positives.	77
--	----

Artigo 3:

Tabela 1 - Resultado comparativo entre testes PCR e PCR <i>nested</i> na detecção de <i>T. gondii</i> no sangue de ovelhas infectadas com taquizoitos via sêmen.	99
---	----

Artigo 4:

Tabela 1 - Resultados dos animais sorologicamente positivos (IFI) e detecção do DNA parasitário (PCR <i>nested</i>) nas amostras de sêmen total.	107
--	-----

Artigo 5:

Tabela 1 - Resultados comparativo da técnica histopatológico em relação a PCR <i>nested</i> em 40 amostras (35 fetos e 5 placentas) dos 5 casos confirmados para <i>T. gondii</i> .	128
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

°C	Grau Celsius
≥	Maior ou igual
®	Marca registrada
μL	Microlitro
μM	Micromolar
'	Minutos
%	Porcentagem
”	Segundos
2ME	2-mercaptoetanol
AL	Aglutinação em látex
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIDR	Dispositivo intravaginal liberador de progesterona
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
Comut	Comutação Bibliográfica
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
eCG	Hormônio gonadotrofina coriônica equina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
et al.	Autores colaboradores (Original do latim: “e os outros”)
FAMA	Fisiologia Animal Molecular Aplicada
FR	Frequência Relativa
HA	Hemaglutinação
HAI	Hemaglutinação indireta
IA	Inseminação Artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI	Imunofluorescencia indireta
IgG	Imunoglobulina classe G

IgM	Imunoglobulina classe M
ISAGA	Immunosorbent Agglutination Assay
K	Coefficiente Kappa
LEMTE	Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental
MAD	Método de Aglutinação direta
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Micromolar
N =	Número de amostra
KB	Kilobyte
Kg	Kilogramas
OIE	Office International des Epizooties
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: Polimerase Chain Reaction)
p.i.	Pós infecção
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido Ribonucléico
SF	Reação de Sabin e Feldman
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UI	Unidade internacional
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
UV	Ultra-violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Toxoplasmose ovina	18
3.2 Etiologia, Ciclo biológico e Patogenia	18
3.3 Epidemiologia da Toxoplasmose	23
3.4 Diagnóstico	25
3.5 Referências	28
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS	
4.1 ARTIGO - Experimental infection by <i>Toxoplasma gondii</i> using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep	40
4.2 ARTIGO - Reproductive disturbances caused by <i>Toxoplasma gondii</i> using experimentally-contaminated semen in sheep	61
4.3 ARTIGO - Utilização da PCR <i>nested</i> para detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> no sangue de ovelhas experimentalmente infectadas com taquizoítos via sêmen	87
4.4 ARTIGO - Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> no sêmen de ovinos naturalmente infectados	104
4.5 ARTIGO - Diagnóstico de <i>Toxoplasma gondii</i> em fetos abortados e natimortos em ovinos no estado de Pernambuco, Brasil	116
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	132
ANEXO A - Licença da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/UFRPE)	133

1. INTRODUÇÃO

O rebanho ovino no Brasil está entre os maiores do mundo com um efetivo de mais de 16 milhões de cabeças. Na região Nordeste, concentram-se aproximadamente 9 milhões do rebanho nacional e o Estado de Pernambuco ocupa o quarto lugar deste ranking (IBGE, 2008). Contudo, na maioria das explorações no Nordeste Brasileiro, a produtividade ainda é baixa (SIMPLÍCIO et al., 2001) e os problemas sanitários e nutricionais limitam o potencial da cadeia produtiva (VIEIRA et al., 1998). Destaca-se dentre os principais entraves, as doenças infecto-contagiosas que são as principais responsáveis por elevadas perdas econômicas (PINHEIRO et al., 2000).

Nos ovinos, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é descrito como um dos principais responsáveis por problemas reprodutivos em rebanhos no mundo. Os transtornos acontecem quando a fêmea se infecta durante a gestação, podendo ocorrer desde reabsorções embrionárias iniciais e abortos até fetos malformados e crias debilitadas e fracas, variando de intensidade de acordo com a fase gestacional da fêmea (DUBEY, 1986; BUXTON, 1998; WEISSMANN, 2003).

As vias de infecção de maior ocorrência para essa espécie são a adquirida que ocorre pela ingestão do oocisto esporulado e tem seu ciclo comum a qualquer outro coccídeo e a congênita que é transmitida pela via transplacentária durante a fase de parasitemia na fêmea gestante (LAUAR, 1995; DUBEY, 1996).

Quando o animal é infectado, os taquizoítos se disseminam e multiplicam na circulação sanguínea e linfática alcançando todos os tecidos e órgãos, inclusive fluídos, excreções e secreções (WONG; REMINGTON, 1993). Estudos vêm destacando a detecção e isolamento do taquizoíto de *T. gondii* no leite e sêmen devido a sua facilidade de transmissão através da amamentação e estação de monta, respectivamente (LUZON et al., 1997b).

Embora o ciclo de vida de *T. gondii* seja conhecido desde o final da década de 60, muitos aspectos relacionados à infecção ainda necessitam ser esclarecidos (BASTIEN, 2002). Desde 1978, quando Spence et al. isolaram *T. gondii* em amostras seminais de ovinos, a possível transmissão através de sêmen na fase aguda da infecção é motivo de estudos devido a sua repercussão no manejo sanitário e reprodutivo dos rebanhos, assim como nas biotécnicas aplicadas à reprodução.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar os aspectos clínicos, epidemiológicos, patológicos e reprodutivos da infecção natural e experimental em ovinos.

2.2 ESPECÍFICOS

Confirmar a transmissão horizontal (venérea) e vertical (transplacentária) do *T. gondii* em ovinos experimentalmente infectados por *T. gondii*;

Descrever os sinais clínico-reprodutivos (falhas reprodutivas) na infecção experimental de ovelhas com sêmen contaminado com taquizoítos de *T. gondii*;

Calcular as perdas embrionárias e fetais, por meio de exames ultra-sonográficos, comparando-se os resultados obtidos nos grupos infectados e controle;

Pesquisar anticorpos anti-*T. gondii* e DNA parasitário em amostras séricas e sangue total, em ovelhas experimentalmente infectadas com sêmen contaminado;

Detectar a eliminação de taquizoítos de *T. gondii* no sêmen de reprodutores naturalmente infectados por meio da técnica da PCR;

Diagnosticar a participação de *T. gondii* em fetos, natimortos e placentas na infecção natural em ovelhas com distúrbios reprodutivos no estado de Pernambuco;

Identificar os órgãos dos fetos e natimortos mais frequentemente parasitados através da técnica da PCR *nested*;

Avaliar a sensibilidade da PCR *nested* na detecção de *T. gondii* no sangue de ovelhas experimentalmente infectadas com taquizoítos via sêmen.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Toxoplasmose Ovina

Inúmeras são as doenças infecciosas que afetam o desempenho reprodutivo dos pequenos ruminantes. Dentre elas, destaca-se a toxoplasmose que é uma enfermidade parasitária com implicações reprodutivas (BLEWETT; WATSON, 1984; UNDERWOOD; ROOK, 1992). Uma das falhas reprodutivas mais importantes causadas pela toxoplasmose ovina é o abortamento (DUBEY; SCHMITZ, 1981; LUZON et al., 1997b; PEREIRA-BUENO et al., 2004). O parasito responsável por essa doença é *T. gondii*, protozoário com reprodução intracelular obrigatória, podendo ser encontrado nos diferentes fluídos e tecidos dos animais infectados (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; DUBEY et al., 1995).

3.2 Etiologia, Ciclo biológico e Patogenia

Toxoplasma gondii foi descrito primeiramente em 1908, simultaneamente por Splendore no Brasil em coelhos e por Nicolle & Manceaux na Tunísia, em um roedor africano (*gondii*) utilizado para pesquisa de Leishmaniose. É classificado como um protozoário de ciclo de vida facultativamente heteroxeno, cuja infecção é de caráter cosmopolita e pode infectar uma infinidade de espécies, incluindo mamíferos, répteis, anfíbios e aves, sendo considerada uma das parasitoses mais frequentes no homem e animais homeotérmicos (FRENKEL, 1990a; LUZON et al., 1997a; TENTER et al., 2000; KOMPALIC-CRISTO et al., 2005). Entretanto, entre os animais de produção, os suínos e ovinos são as espécies mais acometidas seguida pelos caprinos e leporinos (DUBEY; THULLIEZ, 1993).

Em ovinos, a primeira descrição do agente ocorreu em 1942 por Olafson e Monlux, nos Estados Unidos. Desde então, diversos trabalhos demonstraram a importância econômica da infecção toxoplásmica nesta espécie como causa de abortos e natimortos (FREYRE et al., 1997; ENTRICAN; WHEELHOUSE, 2006).

T. gondii pertence ao REINO Protista, SUBREINO Protozoa, FILO Apicomplexa, CLASSE Sporozoea, SUBCLASSE Coccidia, ORDEM Eucoccidiida, SUBORDEM Eimeriina, FAMÍLIA Sarcocystidae, SUBFAMÍLIA Toxoplasmatinae, GÊNERO *Toxoplasma*, ESPÉCIE (única) *gondii* (FORTES, 1997). Possui três linhagens clonais predominantes: tipo I, II e III classificadas de acordo com a virulência em camundongos, dividindo-se em virulentas e avirulentas. As virulentas se multiplicam rapidamente no hospedeiro e causam infecção aguda, enquanto que as avirulentas apenas formam cistos levando a infecção crônica (DARDÉ et al., 1992; JOHNSON, 1997). As cepas tipo I são

muito virulentas para camundongos, causando níveis significativos de parasitemia que podem aumentar o risco da transmissão transplacentária ou severidade de infecção nos fetos em desenvolvimento. As do tipo II causam uma infecção crônica e produção de cistos teciduais, enquanto que as do tipo III ocorrem na maioria das espécies são subclínicas e causam infecções crônicas, embora haja uma recombinação entre as três linhagens (HOWE; SIBLEY, 1995; DARDÉ, 2004). Dubey (2009b) relata que a linhagem clonal tipo II é a mais predominante entre as cepas já isoladas em ovinos no mundo.

O parasito é obrigatoriamente intracelular e móvel, invade as células nucleadas e multiplica-se por divisão binária simples e endodiogenia sob as formas de taquizoítos (forma de multiplicação rápida), bradizoítos (forma de multiplicação lenta), no interior dos cistos teciduais e esporozoítos presentes nos oocistos esporulados (LUZON et al., 1997a; TENTER, 1998; MEIRELES, 2001).

O ciclo biológico (Figura 1) é constituído por duas fases: enteroepitelial (fase sexual) e extraintestinal (fase assexuada). O ciclo enteroepitelial se desenvolve exclusivamente no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo (felídeos). Inicia-se pela ingestão de cistos presentes na musculatura. Posteriormente, a parede do cisto é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado e o parasito é liberado, penetra nos enterócitos da mucosa intestinal do animal e replica-se dando origem a várias gerações através da reprodução assexuada. Após cinco dias dessa infecção, inicia-se o processo de reprodução sexuada, em que os merozoítos formados na reprodução assexuada dão origem aos gametas. Os gametas masculino (microgameta) e feminino (macrogameta), descendentes do mesmo parasito ou de dois diferentes, fundem-se dando origem ao ovo ou zigoto, que após se unir a parede cística dá origem ao oocisto. Este é expulso nas fezes após nove dias (cada gato expulsa mais de 500 milhões de oocistos em cada defecação) e esporulam no ambiente transformando-se em esporozoítos infectantes através de divisão meiótica (esporulação). Após alguns dias são formado dois esporocistos elipsoidais cada um com quatro esporozoítos (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY, 1994). Esta é a forma altamente resistente a desinfetantes e pode permanecer viável por cinco anos em condições adequadas de ambiente numa temperatura -20°C a 37°C, desde que não exposto a luz solar direta e condições razoáveis de umidade relativa (DUBEY; FRENKEL, 1972; AZEVEDO et al., 1983; SAWADOGO et al., 2005). A descoberta do oocisto como forma de resistência no ambiente tornou possível explicar a alta prevalência mundial da toxoplasmose (DUBEY, 2009a).

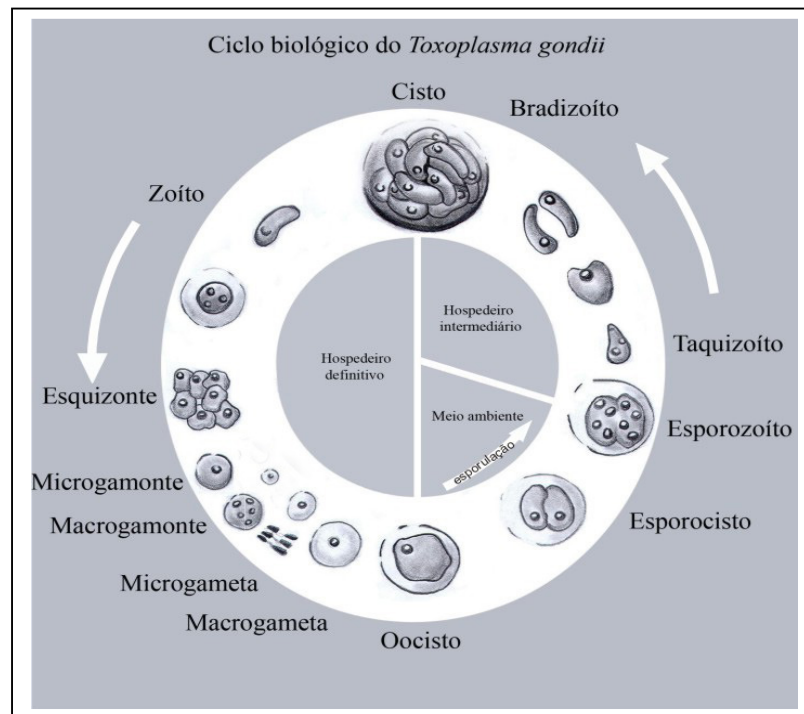


Figura 1 - Ciclo biológico de *T. gondii*

Fonte: traduzido e modificado de Tulliez (1996).

O ciclo extraintestinal ocorre em todas as espécies de sangue quente, incluindo o homem e o gato, sendo este último conhecido como hospedeiro completo (BONAMETTI et al., 1997; VERONESI; FOCACCIA, 1996). Para os hospedeiros intermediários são citadas na literatura duas formas de transmissão: a adquirida e a congênita. No primeiro caso, o animal se infecta por via oral por meio da ingestão do oocisto esporulado presente nas fezes dos gatos e que contaminam alimentos e água. Os oocistos esporulados são ativados em taquizoítos, também conhecido como forma livre ou trofozoíto. Quando ingeridos pelo hospedeiro intermediário multiplicam-se por mitose, principalmente nos macrófagos, células musculares e cerebrais. Os taquizoítos na circulação sanguínea e linfática atingem todos os órgãos e tecidos do hospedeiro (WONG; REMINGTON, 1993; LUZON et al., 1997). Após ruptura da célula, os parasitos saem para o exterior e invadem novas células. Na maioria dos casos, nesta fase, o sistema imunológico é ativado e destrói todos os parasitos livres, contudo não detecta aqueles que encistaram. Este estágio do parasito apresenta forma de arco com uma extremidade afilada e outra arredondada e constitui a forma menos resistente do parasito, sendo facilmente destruído pelas condições adversas do meio, suco gástrico, desidratação ou variações osmóticas (NEVES, 1985; BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

Os cistos contêm os bradizoítos e são formados por estruturas fortes e resistentes, cheias de líquidos onde o parasito se reproduz lentamente. Crescem e podem afetar negativamente as estruturas onde se localizam como músculos, cérebro, coração ou retina. Permanecem viáveis no hospedeiro por muitos anos (DUBEY, 1994; LUZON et al., 1997a) e possuem membranas duplas, sendo resistentes às enzimas proteolíticas e ao resfriamento a 4°C por 30 dias, entretanto, são inativados após congelamento a - 20°C ou aquecimento a + 65°C e sob radiação ionizante (NEVES, 1985; DUBEY et al., 1986; DINIZ et al., 1991; KOTULA et al., 1991; AMATO NETO et al., 1995).

Geralmente os ovinos são infectados na forma subclínica, contudo podem apresentar febre moderada, anorexia e diarreia (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY, 1994). O taquizoíto é responsável pela sintomatologia (REY, 2002) e os problemas maiores ocorrem na transmissão congênita, quando as fêmeas se infectam durante a gestação e transmitem o parasito via transplacentária aos fetos. Esta forma é a mais patogênica e esses taquizoítos atravessam a barreira transplacentária durante a fase de parasitemia materna causando transtornos reprodutivos que variam de intensidade conforme a fase gestacional, o desenvolvimento placentário, carga parasitária e a virulência de *T. gondii* (DUBEY, 1986; BARBERAN; MARCO, 1997; LUZON et al., 1997a; KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).

Em fêmeas prenhes, durante a infecção aguda, há invasão da placenta com presença de taquizoítos livres e no interior dos trofoblastos, resultando em focos de necrose e mineralização nos cotilédones da placenta. As áreas intercotiledonárias geralmente apresentam-se normais. As lesões podem ser macro ou microscópicas e consistem em manchas brancas ou múltiplas e nódulos de até 2 mm de diâmetro que podem estar presentes na placenta em aproximadamente metade dos casos confirmados. Estes focos podem estar distribuídos ou condensados em alguns planos do cotilédone. Podem ainda ser confluentes e nem todos os cotilédones são acometidos pelo mesmo grau de necrose (DUBEY, 1988; FRENKEL, 1990b; JONES et al., 2000).

Os focos de necrose placentária aumentam principalmente com o progresso da gestação. Isto pode ocorrer, devido a uma resposta imune materna com a liberação de citocinas, podendo de certa forma explicar a expansão progressiva característica das lesões placentárias que assume caráter multifocal (ENTRICAN; WHEELHOUSE, 2006; BUXTON et al., 2007). A colonização da placenta origina diversos tipos de manifestações clínicas em função do tempo transcorrido desde a concepção até a infecção por *T. gondii*. A infecção na primeira metade da gestação causa maiores prejuízos, ocorrendo reabsorção embrionária e morte fetal, seguida de aborto. Porém, ainda há risco da transmissão em fases mais tardias,

onde pode ocorrer mumificação, malformação fetal, natimorto ou recém-nascido debilitado conforme descrito na figura 2 (DUBEY, 1988; BARBERAN; MARCO, 1997; WEISSMANN, 2003). Na infecção experimental em cabras, Dubey (1988) observou que a parasitemia materna aparece na primeira semana após a infecção, a placentária na segunda semana e a fetal após a terceira semana.

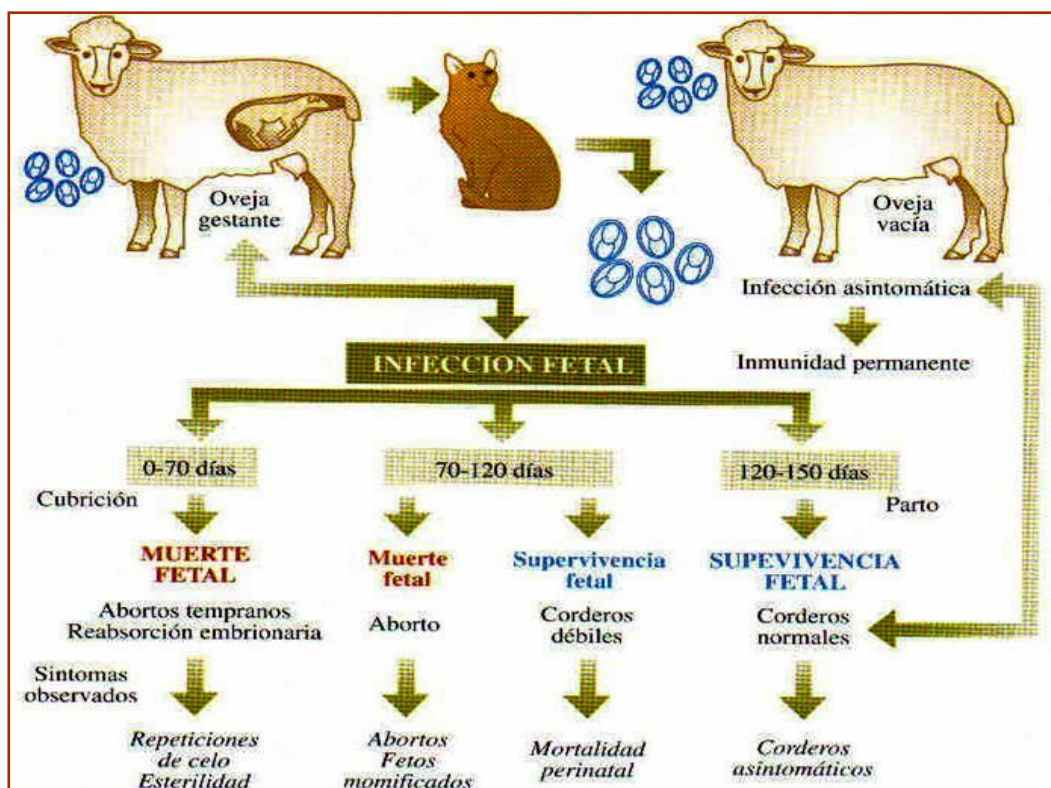


Figura 2 - Consequências da primoinfecção por *T. gondii*.

Fonte: Barberan e Marco (1997).

A ocorrência de formas infectantes de *T. gondii* tem sido demonstrada em secreções e/ou excreções de vários hospedeiros como urina de cães (JACOBS et al., 1966) e camundongos (ROCHA et al., 1993), saliva de coelho (TERRAGNA et al., 1981) e humana (AMENDOEIRA; COUTINHO, 1982), sêmen humano (MARTINEZ-GARCIA et al., 1996), bovino (SCARPELLI et al., 2009), suíno (MOURA et al., 2007), canino (ARANTES et al., 2009), caprino (DUBEY; SHARMA, 1980) e ovino (SPENCE et al., 1978; BLEWETT et al., 1982; TEALE et al., 1982, LOPES et al., 2009), levantando-se discussões sobre outras formas de transmissão, uma vez que se desconhece a importância relativa destas vias.

A excreção de taquizoítos no sêmen aumenta a possibilidade da transmissão venérea, podendo repercutir no manejo e nas biotécnicas reprodutivas atualmente aplicadas, principalmente quanto à inseminação artificial (IA) por ser cada vez mais utilizada por produtores de ovinos e centrais de inseminação (HARE, 1985; PHILPOTT, 1994; ANDRIOLI et al., 2006).

3.3 Epidemiologia da Toxoplasmose

A alta prevalência da toxoplasmose em ovinos pode estar ligada a menor resistência desta espécie ao parasito e às próprias condições de exploração da ovinocultura que expõe estes animais a maior probabilidade de contato com os oocistos eliminados pelos gatos (DUBEY; HAMIR, 2002).

Estudos sorológicos sobre a frequência de anticorpos anti-*T. gondii* comprovam a disseminação da toxoplasmose em ovinos no mundo com porcentagens de animais sororreagentes que variam de 3% a 92% (TENTER, 2000). As taxa de infecção em ovinos no Brasil também é bem variada, observando-se de 7% a 55% (Tabela 1). Esta variação, segundo DUBEY (1990) pode ser influenciada pelo tipo de teste sorológico utilizado, região e idade dos animais.

Tabela 1 – Frequência de ovinos sororreagentes ao *T. gondii* nas diferentes Unidades Federativas do Brasil.

Unidade Federativa	Autor	Ano	Técnica utilizada	Nº Animais	F.R (%)
Alagoas	PINHEIRO JR et al.	2009	IFI	432	32,9
Bahia	GONDIN et al.	1999	IFI	240	18,8
Bahia e Rio Grande do Sul	AMARAL et al.	1978	SF	100	23
Distrito Federal	UENO et al.	2009	IFI	1028	38,2
Paraná	ROMANELLI et al.	2007	IFI	305	51,5
Paraná	DE MOURA et al.	2007	IFI	157	7
Pernambuco	DA SILVA et al.	2003	IFI	173	35,3
Rio Grande do Norte	SOARES et al.	2009	IFI	409	20,7
Rio Grande do Sul	LARSSON et al.	1980	SF	100	39
Rio Grande do Sul	SILVA; COSTA	1981	IFI	310	12
Rio Grande do Sul	NISHIKAWA et al.	1984	AL	655	8
Rio Grande do Sul	SILVA; DE LA RUE	2006	IFI	123	39
Rondônia	CAVALCANTE et al.	2004	IFI	141	46,8
Santa Catarina	CLEMENTINO et al.	2007	ELISA	102	29,4
São Paulo	LANGONI et al.	1999	IFI	352	55
São Paulo	MEIRELLES et al.	2003	ELISA	200	31
São Paulo	FIGLIOULO et al.	2004	IFI	597	34
São Paulo	RAGOZO et al.	2008	MAD	495	24,2

Fonte: Adaptado de PINHEIRO JR (2008); DUBEY (2009b).

Convenções: F.R. – Frequência Relativa; SF – Reação de Sabin & Feldman; IFI – Imunofluorescência Indireta; AL – Aglutinação em Látex; ELISA - Ensaio Imunoenzimático; MAD – Método de Aglutinação Direta.

O hábito de ingerir carne e produtos de origem animal crus ou mal cozidos tem grande importância na epidemiologia da toxoplasmose em humanos (BONAMETTI et al., 1997).

A água também deve ser considerada importante via de transmissão do agente, atuando como disseminador de oocistos para os animais e a população que venha a utilizá-la. A contaminação de reservatórios de água com fezes de felinos infectados e eliminando oocistos de *T. gondii* pode acarretar surtos, envolvendo propriedades e até mesmo regiões (DIAS; FREIRE, 2005).

A ingestão de oocistos esporulados é a principal fonte de infecção através do contato com solo contaminado com fezes de gatos infectados (LUZON et al., 1997b). Assim, os ovinos, caprinos e outros herbívoros se infectam quando pastam em áreas contaminadas. A infecção destes hospedeiros depende não apenas das condições ambientais, mas principalmente da densidade populacional de gatos na área que irá determinar o grau de contaminação do solo com oocistos do parasito (RUIZ; FRENKEL, 1980). A dose mínima estimada para infecção oral em pequenos ruminantes é em torno de 200 oocistos esporulados (DUBEY, 1988). Na fase aguda o gato elimina no ambiente cerca de 100.000 oocistos por grama de fezes. São excretados por apenas uma ou duas semanas, mas podem permanecer viáveis por até dois anos devido a sua resistência aos agentes físicos e químicos. Os gatos em geral não voltam a excretar oocistos quando reinfetados, pois desenvolvem imunidade devido à primeira infecção (FREYRE et al., 1997; DIAS; FREIRE, 2005).

Em ovinos, o fator de risco mais importante é a presença de gatos infectados nas instalações (BUXTON et al., 2007) seguido de outros fatores como manejo intensivo, proximidade do pasto em relação às instalações, exploração leiteira, política de substituição de animais, tipo de construção e material das instalações, idade e sexo (principalmente fêmeas adultas), condições ambientais e climáticas (ALVES et al., 1997; SKJERVE et al., 1998; KLUN et al., 2006), Fontes de água e tamanho da propriedade (PINHEIRO JR et al., 2009).

3.4 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é de grande importância uma vez que a sintomatologia e as lesões macroscópicas podem ser facilmente confundidas com outras enfermidades (VIDOTTO, 1992; INNES; ESTEBAN-REDONDO, 1997).

O método mais utilizado é a detecção de anticorpos anti-Toxoplasma realizado por meio de técnicas sorológicas, sendo a pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG a mais usada. Dentre as técnicas sorológicas empregadas no diagnóstico da toxoplasmose citam-se a técnica de Sabin-Feldman (*dye test*, para humanos); a Imunofluorescência Indireta (IFI), Hemaglutinação (HA); Aglutinação em Látex (AL), Aglutinação direta (MAD), Fixação do Complemento (FC), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA) (DUBEY et al., 1987; UCHOA et al., 1999; DA SILVA et al., 2002; RAGOZO et al., 2008).

Na espécie ovina, Ljungström et al. (1994) compararam o teste de Aglutinação Direta com a reação de Imunofluorescência Indireta encontrando especificidade e sensibilidade de

100,0%. O mesmo valor foi encontrado para soros de suínos, ao passo que em gatos a sensibilidade foi de 96,0% e a especificidade de 97,0%.

A pesquisa de anticorpos IgG e IgM pelo teste de Hemaglutinação Indireta (HAI) com 2-mercaptoetanol (HAI/2 ME) e pesquisa de IgG pelo método de Imunofluorescência Indireta (IFI), em análises sequenciais de amostras de soros, têm sido utilizadas para o diagnóstico da toxoplasmose congênita. A produção da IgM aparece inicialmente, caracterizando a fase aguda da enfermidade, seguida de IgG que aparece mais tardiamente. Os títulos de IgG se mantêm constantes ou ascendentes se houver a infecção, decrescendo ou até desaparecendo em prazo de poucos meses no caso da transmissão passiva de anticorpos pelo colostro (DUBEY et al., 1987).

T. gondii pode ser isolado a partir dos tecidos fetais e/ou placentários mediante a inoculação intraperitoneal em camundongos, porém requer de três a seis semanas, além da manutenção de animais em biotérios (YAI et al., 2003). Pode-se realizar a identificação do agente em cortes histológicos e através de técnicas de inumohistoquímica, pela observação de taquizoítos ou cistos com bradizoítos, embora estas técnicas somente possam ser realizadas pós-morte. Outra técnica utilizada é a detecção por ampliações específicas do DNA parasitário a partir de tecidos infectados utilizando a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (MACEDO, 1994; INNES; ESTEBAN-REDONDO, 1997; KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).

A parasitemia tem sido detectada por meio dos métodos de biologia molecular, em especial a PCR, com a vantagem de demonstrar maior sensibilidade quando comparado ao isolamento do parasito em culturas de tecido (MEIRELES, 2001). A PCR é uma técnica muito sensível, sendo capaz de detectar contaminações por um único taquizoíto, além de ser rápida e poder ser realizada em menos de 24 horas (WONG; REMINGTON, 1994; BASTIEN, 2002).

Além de outros fatores, a sensibilidade e a especificidade da PCR dependem não só da sequência-alvo no DNA do parasito, mas também dos pares de iniciadores de amplificação desenhados. Em geral, o gene *B1* que se encontra repetido em 35 cópias no genoma é o mais utilizado. Outro gene amplamente utilizado é o gene *P30* que se encontra representado como cópia única, codificando o principal antígeno de superfície do protozoário. Também estão sendo utilizados porções codificadoras de RNA ribossomal (rRNA) com 110 cópias de genes (ELLIS, 1998; KOMPALIC-CRISTO et al., 2005; SPALDING et al., 2006), sequências-alvo como o fragmento de 529pb presente em 200 a 300 cópias por célula (HOMAN et al., 2000) e

um seguimento repetitivo de DNA não-codificante, TGR 1E, 1^a, 2 e 4 (CRISTINA et al., 1991).

Diversos estudos demonstraram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de diferentes fluidos. Em ovinos é utilizada principalmente em amostras de sangue (ESTEBAN-REDONDO; INNES, 1998; DA SILVA; LANGONI, 2001), tecidos de fetos abortados (DUNCANSON et al., 2001; TERRY et al., 2001; MASALA et al., 2003; PEREIRA-BUENO et al., 2004), placentas (DUNCANSON et al., 2001; TERRY et al., 2001; MASALA et al., 2003) e sêmen (LOPES et al., 2009).

A utilização do método complementar PCR *nested*, como uma segunda amplificação a partir do produto gerado da primeira amplificação tem demonstrado resultados superiores aos alcançados quando se usa apenas em uma única PCR (SPALDING et al., 2002). Hurtado et al. (2001) ao diagnosticar abortos ovinos utilizando a PCR *nested* demonstraram resultados altamente sensíveis e específicos, ressaltando que esta técnica pode ser utilizada para confirmar casos duvidosos. Os pares de iniciadores (primers) derivados do gene *B1* são os mais utilizados para a realização do PCR *nested*, sendo eles bastante sensíveis e capazes de detectar 10 taquizoítos/mL e 1 taquizoíto/mL para o PCR e PCR *nested*, respectivamente (Spalding et al., 2006).

3.5 Referências

ALVES, C. J. et al. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-*Toxoplasma* em soros de caprinos de cinco centros de criação do nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 4, n. 2, p.75-77, 1997.

AMARAL, V. et al. Sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de caprinos e ovinos procedentes, respectivamente, dos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul, Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v. 12, 331-340, 1978.

AMATO NETO, et al. **Toxoplasmose**. 4. ed. São Paulo: Salvier, 1995. 154 p.

AMENDOEIRA, M. R.; COUTINHO, S.G. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the saliva and tonsils of a three-year-old child. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 145, n. 4, p.587, 1982 .

ANDRIOLI, A. et al. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 41, n. 8, p.1313-1319, 2006.

ARANTES, T. P. et al. *Toxoplasma gondii*: evidence for the transmission by semen in dogs. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 123, p. 190-194, 2009.

AZEVEDO, D. S. et al. Isolamento de oocistos de *Toxoplasma gondii* em dois bairros de Recife (PE). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 25,p. 31-36, 1983.

BARBERAN, M.; MARCO, J. C. Patogenia, cuadro clinico y lesional-Toxoplasmosis. **Revista Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina**, Madrid, n. 52, p. 35-49, 1997.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 11, n. 9, p. 426-430, 2003.

BASTIEN, P. Diagnosis molecular: diagnosis of toxoplasmosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, n. 1, p. 205-215, 2002.

BLEWETT, D. A.; WATSON, W.A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis III. Observations of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. **The British Veterinary Journal**, London, v. 140, p. 54-63, 1984.

BLEWETT, D. A. et al. Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission. **The Veterinary Record**, London, v. 24, n.111, p.73-75, 1982.

BONAMETTI A. M. et al. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 21-25, 1997.

BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. **Veterinary Research**, Les Ulis, Franca, v. 29, p. 289–310, 1998.

BUXTON, D. et al. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, p. 25–28, 2007.

CAVALCANTE, G. T. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em humanos e animais domésticos da zona Monte Negro, Rondônia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., 2004, Ouro Preto, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** p. 217, 2004. Suplemento

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

CRISTINA, N. et al. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis and use in strain characterization. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 73, p. 73-81, 1991.

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

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

DA SILVA, A.V. et al. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 115–119, 2003.

DARDÉ, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, Italy, v. 40, p. 57–63, 2004.

DARDÉ M. L. et al. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 78, p. 786-794, 1992.

DE MOURA, A. B. et al. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, p. 54–56, 2007.

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

DINIZ, E. M. A. et al. **Infecções congênitas e perinatais**. São Paulo: Atheneu, 1991. p. 31-72.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, p. 877–882, 2009a.

_____. Lesions in transplacentally induced toxoplasmosis in goats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.49, n.6, p. 905-909, 1988.

_____. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. **The Journal of Parasitology**, Kansas, v. 80, n. 6, p. 951-956, 1996.

_____. A review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 22, p. 177-202, 1986.

_____. Status of toxoplasmosis in sheep and goats en the United Station. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 196, p. 259-262, 1990.

_____. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 205, n.11, p. 1593-1598, 1994.

_____. Toxoplasmosis in sheep – the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.163, p.1–14, 2009b.

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

DUBEY, J. P.; HAMIR, A. N. Experimental Toxoplasmosis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 3, p. 514-519, 2002.

DUBEY, J. P.; SCHMITZ, J. A. Abortion associated with Toxoplasmosis in sheep in Oregon. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 178, n.7, p. 675-678, 1981.

DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, n. 5, p. 794-795, 1980.

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

DUBEY, J. P. et al. Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii* induced abortions. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 188, p.155, 1986.

DUBEY, J. P. et al. Serodiagnosis of perinatally and prenatally induced toxoplasmosis in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 48, p. 1239-1243, 1987.

DUBEY, J.P. et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 5, p. 723-729, 1995.

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

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

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

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

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

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ícone, 1997. 143 p.

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

_____. Transmisión of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmisión and iones. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 195, n. 2, p. 233-240, 1990b.

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

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**, Amsterdam, v. 82, p. 273–276, 1999.

HARE, W. C. D. **Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques**. Paris: Office International des Epizooties, 1985. 119 p. (Technical series, n. 4)

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

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**, Oxford, v. 30, p. 69-75, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção da pecuária municipal, Brasil**. Rio de Janeiro, 2008. v. 35, p.1-62.

INNES, E. A.; ESTEBAN-REDONDO, M. I. Diagnóstico - Toxoplasmosis. **Revista Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina**, Madrid, n. 52, p. 51-56, 1997.

JACOBS, L. et al. Observations on toxoplasmosis in dogs. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 41, p. 353-361, 1966.

JOHNSON A.M. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. **Parasitology**, Cambridge, v.13, p. 393-397, 1997.

JONES, T.C. et al. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole. 2000. 1415 p.

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

KOMPALIC-CRISTO, A. et al. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 229-235, 2005.

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

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

LARSSON, C.E. et al. Prevalência da toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, n.4, v.14, p.582-588, 1980.

LAUAR, N. M. Toxoplasmose. In: GONÇALVES, C. A. et al. **Zoonoses**. Campinas: CATI, 1995. p: 107-113. (Manual, 31).

LJUNGSTRÖM, B. L. et al. Evaluation of a direct agglutination test for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cat, pig and sheep sera. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 35, p. 213–216, 1994.

LOPES, W. D. Z. et al. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 111, n. 3, p. 312-319, 2009.

LUZON, M. et al. Etiologia y biología - Toxoplasmosis. **Revista Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina**, Madrid, n. 52, p. 11-17, 1997a.

LUZON, M. et al. Epidemiologia - Toxoplasmosis. **Revista Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina**, Madrid, n. 52, p. 19-33, 1997b.

MACEDO, O. M. Toxoplasmose. In: CASTRO, et al. **Protozooses humanas**. São Paulo: BYK, 1994. p. 153-169.

MARTINEZ-GARCIA, F. et al. Protozoan infections in the male genital tract. **Journal of Urology**, Baltimore, v.156, p. 340-349, 1996.

MASALA, G. et al. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 1-2, p.15-21, 2003.

MEIRELES, L. R. **Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo**. 2001. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia, São Paulo.

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**, São Paulo, v. 40, p. 267-271, 2003.

MOURA, A. B. et al. *Toxoplasma gondii* in sêmen of experimental infected swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 430-434, 2007.

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

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

NISHIKAWA, H. et al. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic animals in Rio Grande do Sul State, Brazil. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 1., 1984, Londrina. **Proceedings...** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1984.

OLAFSON, P.; MONLUX, W. S. Toxoplasma infection in animals. **Cornell Veterinarian**, Ithaca. v. 32, n. 2, p. 176-90, 1942.

PEREIRA-BUENO, J. et al. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 121, n.3/4, p.33-43, 2004.

PHLIPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**, London, v. 150, n. 2, p. 209, 1994.

PINHEIRO JR, J. W. **Epidemiologia das infecções por *Brucella abortus*, *Brucella ovis*, *Chlamydia abortus* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos ovinos no Estado de Alagoas**. 2008. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2008.

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

PINHEIRO, R. R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p.534-543, 2000.

RAGOZO, A. M. A. et al. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo State. Brazil. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 94, p. 1259–1263, 2008.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

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

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**, Curitiba, v. 82, p. 202–207, 2007.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. *Toxoplasma gondii* in Costa Rican cats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 29, p.1150-1160, 1980.

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

SCARPELLI, L. C. et al. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, p. 59-64, 2009.

SILVA, K. L. M. V.; DE LA RUE, M. L. Possibilidade de transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município de Rosário do Sul, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 893-897, 2006.

SILVA, N. R. S.; COSTA, A. J. Frequência da toxoplasmose em ovinos dos municípios de Guaíba e São Lourenço do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinaria da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 56-59, 1981.

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

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

SOARES, H.S. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte. Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 3/4, p. 211–214, 2009.

SPALDING, S. M. et al. Toxoplasmose. In: ROSSETTI, M. L. et al. **Doenças infecciosas: diagnóstico molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 8, p 102-111.

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

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

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

TENTER, A. M. Epidemiological importance of animals in the transmission of *Toxoplasma* **Parasitology International**, Tokyo, v. 47, n. 1, p. 82, 1998.

TENTER, A.M. et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12/13, p. 1217-1258, 2000.

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

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

TULLIEZ, PH. Ciclo de *Toxoplasma gondii*. In:_____ **Toxoplasmosis**. BioMérieux (Ed.) Madri, 1996, p.4-6.

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

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

UNDERWOOD, W.J.; ROOK, J.S. Toxoplasmosis infection in sheep. **The Compendium on Continued Education in Veterinary Practice**, New York, n.8, v.14, p. 1543-1549, 1992.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado infectológico**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1290-1305.

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

VIEIRA, L. S. et al. **Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1998. 50 p.

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

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

_____. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 18, p. 853-861, 1994.

YAI, L. E. O. et al. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 227-234, 2003.

4.1 ARTIGO

Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen
containing different doses of tachyzoites in sheep

(Artigo submetido e aceito no Periódico Veterinary Parasitology)

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Parasitology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep

Article Type: Research Paper

Keywords: seroconversion; tachyzoites; toxoplasmosis; intra-uterine inoculation; sheep; artificial insemination.

Corresponding Author: Dr. Valdir A Braga, DVM PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Paraiba

First Author: Érica P Moraes

Order of Authors: Érica P Moraes; André M Batista; Eduardo B Faria; Roberta L Freire; Antonio C Freitas; Maria Angélica R Silva; Valdir A Braga, DVM PhD; Rinaldo A Mota, DVM, PhD

1 **Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen**
2 **containing different doses of tachyzoites in sheep**

3
4
5 Érica Paes Barreto Xavier de Moraes^a, André Mariano Batista^b, Eduardo Bento Faria^a,
6 Roberta Lemos Freire^c, Antonio Carlos Freitas^d, Maria Angélica Ramos Silva^d, Valdir A.
7 Braga^{e,f}, Rinaldo Aparecido Mota^a

8
9 ^a*Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina*
10 *Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n- Dois Irmãos,*
11 *52171-900, Recife-PE, Brasil,* ^b*Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária,*
12 *Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n- Dois Irmãos, 52171-900,*
13 *Recife-PE, Brasil,* ^c*Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, Universidade Estadual de Londrina - PR,*
14 *Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, CEP: 86051-970 - Caixa-Postal: 600, Londrina, PR - Brasil,*
15 ^d*Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental - LEMTE, Departamento de Genética,*
16 *Universidade Federal de Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, 50670-901 -*
17 *Recife, PE – Brasil,* ^e*Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade*
18 *Federal da Paraíba, Campus II, Cidade Universitária, 58.397-000, Areia-PB, Brasil,* ^f*Laboratório de*
19 *Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.*

20
21 **Corresponding author:**

22 Rinaldo Aparecido Mota, D.V.M. Ph.D.

23 Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos - Departamento de
24 Medicina Veterinária

25 Universidade Federal Rural de Pernambuco

26 Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n- Dois Irmãos, 52171-900

27 Recife-PE, Brazil

28 Phone.: +55 81 33206425

29 Fax: +55 81 3320 6400

30 E –mail: rinaldo.mota@hotmail.com

31

32

33

34

35

36 **Abstract**

37 In order to study the venereal transmission of toxoplasmosis, forty-one sheep
38 were experimentally infected with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* using contaminated
39 semen. To confirm *T. gondii* infection via semen, serological tests were performed using
40 indirect immunofluorescence reaction and the detection of parasite DNA in the blood stream
41 using PCR-nested test. While in G1 group only 5/15 (33,3%) of the females presented
42 seroconversion, all sheep in G2 15/15 (100%) seroconverted. PCR-nested test showed that
43 14/15 (93,3%) of the females in the G1 and 14/15 (93,3%) in the G2 group were positive for
44 *T. gondii* while in the G3 group all samples were negative. In addition, ultra-sound tests
45 evidenced that in sheep presented embryonic reabsorption in animals from the infected
46 groups. In conclusion, insemination using fresh semen experimentally contaminated with
47 different infectant doses of *Toxoplasma gondii* tachyzoites was able to infect sheep, leading to
48 the possibility of toxoplasmosis transmission via semen.

49

50 *Keywords:* seroconversion, tachyzoites, toxoplasmosis, intra-uterine inoculation, sheep,
51 artificial insemination.

52

53 **1. Introduction**

54 There are several diseases that affect reproductive performance in small ruminants.
55 Among them, toxoplasmosis is a parasitary disease with reproductive complications (Blewett
56 and Watson, 1984). The parasite responsible for causing such disease is the *Toxoplasma*
57 *gondii* (*T. gondii*), a protozoal characterized by its obligatory intracellular reproduction. *T.*
58 *gondii* can be found in different fluids and tissues of infected animals (Dubey et al., 1995).
59 Among the reproductive complications caused by toxoplasmosis in sheep, abortion is one of
60 the most important causes of economical losses (Pereira- Bueno et al., 2004).

61 Although the *T. gondii* life cycle is well understood since 1960's, several aspects
62 related to its infection remain unclear (Bastien, 2002). The occurrence of infectant forms in the
63 semen of humans and bulls (Martinez-Garcia et al., 1996; Scarpelli et al., 2001), semen and
64 milk of goats (Dubey and Sharma, 1980; Chiari and Neves, 1984) and semen of sheep
65 (Spence et al., 1978; Blewett et al., 1982; Teale et al., 1982; Lopes et al., 2009) rised
66 important discussion about other possible routes of transmission, taking into consideration
67 that the epidemiological importance of these routes is unknown.

68 In the present study, we investigated the transmission of *T. gondii* by the venereal
69 route in sheep using contaminated semen with different doses of tachyzoites.

70 2. Methods

71 All experiments met or exceeded the standards set by the International Guiding
72 Principles for Biomedical Research Involving Animals and all protocols were approved by the
73 Rural Federal University of Pernambuco Ethical Committee (CEUA-UFRPE).

74

75 2.1 Animals

76 2.1.1. Semen donor

77 In order to obtain semen samples for artificial insemination, we used a Santa Inês male
78 sheep donor with recognized reproductive records of fertility, approved in the andrologic test
79 (CBRA, 1998), and seronegative for *T. gondii* tested by the indirect immunofluorescence
80 reaction.

81

82 2.1.2. Experimental groups

83 Forty-one Santa Inês females with satisfactory reproductive records of fertility were
84 used. All females were seronegative for antibodies against *T. gondii* and *Neospora caninum*
85 tested by the indirect immunofluorescence reaction; *Clamidophyla abortus* using complement
86 fixation technique and *Brucella ovis* using agarose gel immunodiffusion technique. Animals
87 were divided in three experimental groups: G1 (n=15), G2 (n=15), and G3 (n=11).

88

89 2.2. Experimental infection

90 After being harvested, analysed and diluted according to CBRA (1998), semen was
91 aliquoted and contaminated with different doses of the parasite. Laparoscopy insemination
92 was performed in order to certify that semen was delivered inside the female uterine horn. All
93 females from G1 group were inseminated with contaminated semen containing 6.5×10^4
94 tachyzoites; females from G2 group were inseminated with semen containing 4×10^7
95 tachyzoites and females from G3 group were inseminated with tachyzoite-free semen (control
96 group). CPG strain (genotype III) tachyzoites were used in the present study. They were
97 isolated from abortion episodes in goats in the city of Guarapuava, PR, Brazil.

98

99 2.3. Estrous synchronization and artificial insemination program

100 In order to perform estrous and ovulation synchronization, females were treated with
101 progesterone hormones delivered by intravaginal implants for 14 days (CIDR®, InterAg-
102 Edvet HD). At the time of implant removal, females were treated with 300 UI of e.C.G.
103 (Novormon®, Syntex AS). Twelve hours after estrous detection using a vasectomized male,

104 females were inseminated using the laparoscopic approach as described by Evans and
105 Maxwell (1987). Fresh semen was used after dilution in Tris-egg-yolk in a proportion of 1:9
106 (Evans and Maxwell, 1987).

107

108 2.4. Gestation follow-up

109 Gestational development follow-up was performed based on ultra-sound tests. Tests
110 started in the day 15 after insemination and were repeated every 5 days until day 35 and every
111 10 days until day 65 of gestation aiming to detect early embryonic reabsorption, fetal death,
112 mummification and possible fetal malformation. Ultra-sound tests were performed according
113 to Moraes (2006), using a Pie Medical device (Model Falco 100) and a transducer of 6 MHz.

114

115 2.5. Confirmation of infection

116 2.5.1. Serology

117 In order to confirm *T. gondii* infection via semen, serological tests were performed at
118 0, 7, 14, 21, 28, 35, 49, 63 and 123 days after insemination in all animals from the 3 groups.
119 The anti-*T. gondii* antibodies detection was performed using a RIFI, where anti-IgG-sheep
120 antibodies were conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC). Serum dilutions in the ratio
121 of four (1:16 to 1:4096) were tested and reaction to dilutions 1:64 or higher were considered
122 positive as previously established (Camargo, 1974). In addition, animal temperature was
123 measured in all three groups during the morning period in the first two weeks post-infection.

124

125 2.5.2. Detection of *T. gondii* DNA

126 In order to detect *T. gondii* DNA, blood samples of total blood containing EDTA were
127 withdrawn at 0, 7, 14, 21, 28, 49, 63 and 123 days post-infection. Samples were submitted to
128 PCR followed by the PCR nested technique.

129 All samples were submitted to DNA extraction using the commercial kit “Qiagen
130 DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen®), according to the manufacture’s proposed
131 protocol. Following DNA extraction, amplification reactions were performed in a final
132 volume of 12.5µL containing: 2,5µL of genomic DNA; 0.5µL of each primer at 10µM
133 (TOXO-C 1 e TOXO-N 1); 2,5µL of Mili-Q ultrapure water, and 6,25µL of MasterMix (PCR
134 - Promega) according to the manufacture’s protocol. The termic profile of each reaction step
135 was made in a thermocycler (PTC-100, MJ-Research) according to the protocol described by
136 Spalding et al. (2006). The 197 base pairs amplified products corresponding to *T. gondii* DNA

137 were detected by electrophoresis in 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, visualized
138 using an ultraviolet-light and image analyzed.

139 All negative samples and controls were submitted to the PCR nested technique, using
140 1µL of the product for simple PCR and added to the reaction mix in a final volume of 12.5µL
141 containing 0.5µL of each primer at 10µM (TOXO-C 2 e TOXO-N 2); 4,75µL of Mili-Q
142 ultrapure water and 6,25µL of MasterMix according to the manufacture's protocol. The
143 reaction cycle was adapted based on the protocol described by Spalding et al. (2006) and
144 consisted of denaturation of initial DNA at 95°C (4 min) followed by 35 cycles at 95°C for 1
145 min (denaturation), 62°C for 30 seconds for annealing, 72°C for 1 min for extension and a
146 period of final extension of 10 min at 72°C. The 97 base pairs amplified product referring to
147 the *T. gondii* was detected by electrophoresis in 2% agarose gel, stained with ethidium
148 bromide, visualized with an ultraviolet-light and image analyzed.

149 Two pairs of primers used in our experiments were derived from *BI* gene related to the
150 nucleotides 694-714, 887-868, 757-776 e 853-831 as previously reported (Burg et al., 1989;
151 Spalding et al., 2006).

152

153 **3. Results**

154 *3.1. Serology*

155 In the G1 group, only 5/15 (33.3%) of the females seroconverted, among them, 1/5
156 (20%) seroconverted at 7 days post-infection; 2/5 (40%) at 14 days post-infection; and 2/5
157 (40%) at 28 days post-infection. In the G2 groups, all sheep seroconverted 15/15 (100%);
158 among them, 1/15 (6.7%) seroconverted at 7 days post-infection; 8/15 (53.3%) at 14 days
159 post-infection; 4/15 (26.7%) at 21 days post-injection and 2/15 (13.3%) at 28 days post-
160 infection. The maximum titration observed in the two infected groups was 1:1024, reached by
161 10/20 (50%) in the interval of 28 and 63 days post-infection. None of the sheep from the G3
162 group presented antibodies anti-*T. gondii* as shown in Table 1.

163

164 *3.2. Molecular Diagnostic*

165 *T. gondii* DNA was detected in 93.3% (28/30) of the total sheep from G1 and G2
166 groups in the interval between day 7 and day 123 post-infection. In the G1 group, one animal
167 was found positive at day 14 post-infection; two animals at day 21; nine animals at day 28;
168 twelve animals at day 49; nine animals at day 63; and two animals at day 123 post-infection.
169 In the G2 group, five animals were found positive at 21 days post-infection; twelve animals at
170 day 28; fourteen animals at day 49; fourteen animals at day 63; and two animals at day 123

171 post-infection. *T. gondii* DNA was not detected in any sheep from the G3 group as shown in
172 the table 1.

173

174 3.3. Hypertermia

175 An increase in the temperature was observed in 100% of the females in the groups
176 which received infected semen (G1 e G2). At 14 days post-infection, 100% of females in the
177 G1 group presented hypertermia. The highest temperature recorded was 42 °C obtained at day
178 14 post-infection and the highest average was 40.8 °C, also found at day 14 post-infection.
179 One-hundred percent of the females in the G3 group presented fever at 7, 8, 13 and 14 days
180 post-infection. The highest temperature recorded in that group was 42.6 °C obtained at 9 and
181 14 days post-infection and the highest average was 41.5 °C recorded at day 8 post-infection.

182

183 3.4. Gestational development

184 In the G1 group, 9/15 (60%) of females begun gestation and presented embryonic
185 reabsorption between days 18 and 21 post-infection characterized by the stopping of heart
186 beating, moviments absent, embryonic regression and finally embryonic reabsorption. On the
187 other hand, 6/15 (40%) of the females kept pregnancy until delivery. In the G2 group,
188 embryonic reabsorption took place in 15/15 (100%) of the sheep between days 18 and 21
189 post-insemination. In the G3 group, 8/11 (72.7 %) of females maintained pregnancy and were
190 followed until the end of gestation when they delivered healthy fetuses.

191

192 4. Discussion

193 The present study was designed to investigate the potential effects of different doses of
194 *T. gondii* tachyzoites in causing infection via semen in sheep without reproductive
195 disturbance. Different from other studies, we performed the infection and fertilization at the
196 same moment, stressing the pioneerism in testing this possible route of *T. gondii* infection in
197 sheep. Similar experiments were designed by Canada et al. (2006), Serrano et al. (2006) and
198 Serrano-Martínez et al. (2007) in dairy cows inseminated with contaminated semen by
199 *Neospora caninum*.

200 Regarding titration, 50% of infected females reached maximum titration of 1024
201 between 28 and 63 days post-infection declining after that point. According to Lopes et al.
202 (2009), the experimental infection in sheep by *T. gondii* induces a fast immunological
203 response with the detection of IgG five days post-infection evolving until 52 days post-
204 infection, when it is possible to observe a reduction in antibody titration. That early antibody

205 response was also observed in sheep experimentally infected by *T. gondii* as described by
206 Beverley and Waston (1971).

207 In the present study, was observed the presence of *T. gondii* DNA at 14 days post-
208 infection with a significant gain in the DNA detection as well as in specific immune response
209 starting at day 28 post-infection. In this way, infected sheep (G1 and G2 groups) presented
210 long-lasting immune response evidencing a continuous immune system exposure to the
211 parasite antigens.

212 Regarding clinical parameters, it has been observed that all females from the two
213 infected groups (G1 and G2) presented hypertermia. The peak of the increase in temperature
214 was reached between 4 and 6 days post-infection in some animals infected with the higher
215 dose, but for most of the animals, temperature was variable between 7 and 14 days post-
216 infection, reaching a maximum of 42.6°C at days 9 and 14 post-infection. In this way, Lopes
217 et al. (2009) evaluated clinical parameters in male sheep infected by *T. gondii* oocytes and
218 tachyzoites. In that study, animals presented apathy, hypertermia and liquid feces only in the
219 group infected with *T. gondii* oocytes between 3 and 7 days post-infection. Owen et al.
220 (1998a) and Owen et al. (1998b) also observed high temperatures starting at day 5 post-
221 infection, lasting 4 days and reaching the maximum of 41.3°C at day 6 post-infection. In our
222 case, the fact that hypertermia lasted for 14 days could be explained based on studies
223 performed by Barberan and Marco (1997), where authors described that in the uterine tract
224 there is an environment that offers ideal nutritional conditions allowing the multiplication and
225 persistence of tachyzoites on that organ. As we adopted the intra-uterine route as the infection
226 route, tachyzoites took 2-4 days more than expected to reach the blood stream and cause fever
227 which eventually happened between 7 and 14 days post-infection.

228 Other interesting finding was the significantly high rate of embryonic reabsorption
229 observed in 100% of sheep from the G2 group and 60% in sheep from the G1 group compared
230 to 72.7% of viable fetuses that were delivered by the sheep from the G3 group. Comparing
231 our finding to those obtained by Serrano-Martínez et al. (2007), in their case, they observed a
232 possible interference in the initial stage of gestation in the infected dairy cows. In our data,
233 this finding was even more evident taking into account that all sheep were submitted to the
234 ultra-sound test beginning on day 15 post-infection. Therefore, according to the images
235 acquired during the ultra-sound test, it has been demonstrated that the experimental infection
236 with *Toxoplasma gondii* tachyzoites causes death and early embryonic reabsorption in sheep.

237 Interestingly, we observed that sheep from the G2 group that did not presented
238 abortion (40%) over the course of gestation, maintained gestation until delivery. However,

239 there was a significant number of dead fetuses being delivered and weak lambs that died few
240 hours after they were delivered. In addition, it has been observed a number of health lambs
241 with positive serology for anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies before the ingestion of
242 colostrum. The *Toxoplasma gondii* DNA was detected in tissues of stillborns and placenta.
243 Taken together, these findings suggest that there was a possible *T. gondii* infection via
244 contaminated semen in the dose studied. According to Buxton et al. (2007), clinical signs of
245 *T. gondii* infection in pregnant sheep is characterized by dead fetuses, weak lambs after
246 delivery with low weight, mummified embryos, death and embryonic reabsorption.

247 In conclusion, insemination with fresh semen experimentally contaminated with
248 different doses of *Toxoplasma gondii* tachyzoites was able to infect sheep, suggesting the
249 possibility of toxoplasmosis transmission via semen in that species.

250

251 **5. References**

252 Barberan, M.; Marco, J.C., 1997. Patogenia, cuadro clinico y lesional-Toxoplasmosis. Revista
253 Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina, Madrid. 52, 35-49.

254

255 Bastien, P., 2002. Diagnosis Molecular: diagnosis of toxoplasmosis. Trans R. Soc. Trop. Med.
256 Hug. 96, 205-215.

257

258 Beverley, J.K.A.; Waston, W.A. 1971. Prevention of experimental and of naturally occurring
259 ovine abortion due to toxoplasmosis. Vet. Rec. 88, 39-44.

260

261 Blewett, D. A.; Teale, A. J.; Miller, J. K.; Scott, G. R.; Buxton, D., 1982. Toxoplasmosis in
262 rams: Possible significance of venereal transmission. Vet. Rec. 24, 73-75.

263

264 Blewett, D. A.; Watson, W.A., 1984. The epidemiology of ovine toxoplasmosis III.
265 Observations of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. Br.
266 Vet. J. 140, 54-63.

267

268 Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P., Boothoyd, J.C. Direct and sensitive detection of
269 pathogenic protozoan. *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol.
270 27: 1787-1792, 1989.

271

- 272 Buxton, D.; Maley, W.S.; Eright, S. E.; Rodger, S.; Bartley, P.; Innes, E.A., 2007. *Toxoplasma*
273 *gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. *Vet. Parasitol.* 149, 25-28.
274
- 275 Camargo, M. E., 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Ver. Bras. Pat. Clín.*,
276 São Paulo. 10, 143-169.
277
- 278 Canada, N.; Meireles, C.S.; Ferreira, P.; Correia-da-Costa, J.M.; Rocha, A., 2006. Artificial
279 insemination of cows with sêmen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites
280 failed to induce neosporosis. *Vet. Parasitol.* 139, 109-114.
281
- 282 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA, 1998. Manual para exame e avaliação de
283 sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte. 49p.
284
- 285 Chiari, C.A.; Neves, D.P., 1984. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite
286 de cabra. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79, 337-340.
287
- 288 Dubey, J. P.; Sharma, S. P., 1980. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of
289 goats. *Am. J. Vet. Res.* 41, 794-795.
290
- 291 Dubey, J.P.; Weigel, R.M.; Siegel, A.M.; Thulliez, P.; Kitron, U. D.; Mitchell, M. A.;
292 Mannelli, A.; Mateus-Pinilla, N. E.; Shen, S. K.; Kwok, O. C. H.; Todd, K.S., 1995. Sources
293 and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81,
294 723-729.
295
- 296 Evans, G.; Maxwell, W.M.C., (Eds.) 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and
297 goats. Butterworths: Sydney. 194 p.
298
- 299 Lopes, W.D.Z.; Costa, A.J.; Souza, F.A; Rodrigues, J.D.F.; Costa, G.H.N.; Soares, V.E.;
300 Silva, G.S., 2009. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with
301 *Toxoplasma gondii*. *Anim. Reprod. Sci.*, 111, 312-319.
302
- 303 Martinez-Garcia, F.; Regadera, J.; Mayer, R.; Sanchez, S.; Nistal, M., 1996. Protozoan
304 infections in the male genital tract. *The Journal of Urology.* 156, 340-349.
305

- 306 Moraes, E. P. B. X., 2006. Utilização da ultra-sonografia para diagnosticar alterações uterinas
307 em cabras, gestação, perdas embrionária-fetal e sexo fetal em ovelhas. Recife, 2006.
308 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Medicina Veterinária,
309 Universidade Federal Rural de Pernambuco. 112p.
310
- 311 Owen, M.R.; Clarkson, M.J.; Trees, A.J., 1998a. Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by
312 polymerase chain reaction. Vet. Rec. 142, 445-448
313
- 314 Owen, M.R.; Clarkson, M.J.; Trees, A.J., 1998b. Acute phase toxoplasma abortions in sheep.
315 Vet. Rec. 142, 480-482.
316
- 317 Pereira-Bueno, J.; Quintanilla-Gozaolo, A.; Perez-Perez, V.; Alvarez-Garcia, G.; Collantes-
318 Fernandez, E.; Ortega-Mora, L.M., 2004. Evaluation of ovine abortion associated with
319 *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. Vet. Parasitol. 121, 33-43.
320
- 321 Scarpelli, L. C.; Costa, A. J.; Migani, M. B. Varandas, N. P.; Ferro, M. I. T.; Esper, C. R.,
322 2001. Venereal transmission viability of *Toxoplasma gondii* in bovines. In: Proceedings of
323 The XVIII International Conference Of The World Association For The Advancement Of
324 Veterinary Parasitology, Stresa- Italy, 18, 26-30.
325
- 326 Serrano, E.; Ferre, I.; Osoro, K.; Aduriz, G.; Mateos-Sanz, A.; Martinez, A.; Atxaerandio, R.;
327 Hidalgo, C.O.; Ortega-Mora, L.M. 2006. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of
328 heifers. Vet. Parasitol. 135:197-203.
329
- 330 Serrano-Martinez, E.; Ferre, I.; Osoro, K.; Mota, R.A.; Martinez, A.; Del-Pozo, I.; Hidalgo, C.
331 O.; Ortega-Mora, L. M., 2007. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and
332 using contaminated semen with different numbers of tachyzoites, Theriogenology. 67, 729-
333 737.
334
- 335 Spalding, S. M; Angel, S. O.; Amendoeira, M. R. R., 2006. Toxoplasmose. In: Rossetti, M. L;
336 Silva, C. M. D.; Rodrigues, J. J. S. (eds.), Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular
337 (Brasil, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), 102-111.
338

339 Spence, J. B.; Beattie, C. P.; Faulkner, J.; Henry, L.; Watson, W. A., 1978. *Toxoplasma*
340 *gondii* in the semen of rams. Vet. Rec. 14, 38-39.

341

342 Teale, A.J.; Blewett, D. A.; Miller, J. K.; Buxton, D., 1982. Experimentally induced
343 toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma. Vet.
344 Rec. 17, 53-55.

345

346 **6. Acknowledgments**

347 Authors would like to thank Dr. Maria Madalena Pessoa Guerra (Departamento de
348 Medicina Veterinária - UFRPE) for her assistance with the laparoscopic insemination and
349 ultra-sound evaluation procedures. This work was funded by Conselho Nacional de
350 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Edital Universal –Processo nº
351 472459/2008-2).

352

353 **7. Conflict of interest**

354 None.

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

Veterinary Parasitology

Guide for Authors

An international scientific journal and the Official Organ of the American Association of Veterinary Parasitologists (AAVP), the European Veterinary Parasitology College (EVPC) and the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP).

Veterinary Parasitology

Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor: Dr F.H.M. Borgsteede

Animal Sciences Group, Wageningen UR

Division Infectious Diseases

Laboratory of Parasitic Diseases

P.O. Box 65

8200 AB Lelystad

The Netherlands

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System. Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: Elsevier's [Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to *Veterinary Parasitology* who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)
 Complete postal address(es) of affiliations
 Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author
 Present address(es) of author(s) if applicable
 Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

b. For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruyssen, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. For books

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet.*

Parasitol.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ¹⁸O

7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299–326).

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetpar> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the

letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

4.2 ARTIGO

Reproductive disturbances caused by *Toxoplasma gondii* using
experimentally-contaminated semen in sheep

(Artigo submetido no Periódico Animal Reproduction Science)

Elsevier Editorial System(tm) for Animal Reproduction Science

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Reproductive disturbances caused by *Toxoplasma gondii* using
experimentally-contaminated semen in sheep

Article Type: Research Paper

Keywords: sheep; semen; toxoplasmosis; transmission

Corresponding Author: Dr. Valdir A. Braga, DVM, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Paraiba

First Author: Erica P Moraes

Order of Authors: Erica P Moraes; Antonio C Freitas; Manoel Gomes-Filho;

Maria Madalena Guerra; Maria Angélica Silva; Márcia F Pereira; Valdir A.

Braga, DVM, PhD; Rinaldo A Mota

1 **Reproductive disturbances caused by *Toxoplasma gondii* using experimentally-**
2 **contaminated semen in sheep**

3
4 E. P. B. X. Moraes^a, A. C. Freitas^b, M. A. Gomes-Filho^c, M. M. P. Guerra^a, M. A. R. Silva^b,
5 M. F. Pereira^a, V. A. Braga^d, R. A. Mota^{a,*}

6
7 ^a*Department of Veterinary Medicine, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, PE,*
8 *Brasil;*

9 ^b*Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, PE – Brasil;*

10 ^c*Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of*
11 *Pernambuco, Recife, PE, Brasil;*

12 ^d*Department of Veterinary Sciences, Center for Agrarian Sciences, Federal University of*
13 *Paraíba, Areia, PB, Brasil.*

14
15
16 *Corresponding Author:

17 Rinaldo Aparecido Mota, D.V.M. Ph.D.

18 Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos - Departamento de
19 Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco

20 Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n- Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brazil

21 Phone.: +55 81 33206425

22 Fax: +55 81 3320 6400

23 E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com
24
25
26
27
28

29 **Abstract**

30 Reproductive disturbances caused by *Toxoplasma gondii* using a experimental
31 infection approach with contaminated semen containing different doses of the parasite were
32 characterized during three phases of reproduction: early phase of gestation; immediate after
33 delivery and after controlled mating season. Forty-one animals were divided in three
34 experimental groups: In the group 1 (G1, n=15), animals were inseminated using
35 contaminated semen containing 6.5×10^4 tachyzoites; In the group 2 (G2, n=15), animals
36 were inseminated with contaminated semen containing 4×10^7 tachyzoites; and in the group 3
37 (G3, n=11), animals were inseminated using tachyzoite-free semen, serving as control group.
38 Parasitemia and seroconversion were observed starting at seven days post-infection.
39 Histopathological test showed lesions similar to toxoplasmosis in the placentas. In addition,
40 organs from stillborns as well as placentas examined were PCR-positive for toxoplasmosis. In
41 the G1, 60% presented embryonic reabsorption and 40% kept gestation until delivery, being
42 followed until the fifth month where eutocic delivery, dystocic delivery, stillborn and uterine
43 inertia were observed. In addition, 100% of females from G2 presented embryonic
44 reabsorption followed by other disturbances such as hydrometra, mucometra and follicular
45 cysts. All twenty-four non-pregnant sheep (G1 and G2) were submitted to controlled mating
46 season, where 15/24 (62.5%) got pregnant and 9/24 (37.5%) did not. Those sheep that did not
47 get pregnant presented reproductive pathologies such as: anestrus (66.6%), hydrometra
48 (11.1%) and mucometra (22.2%). In conclusion, sheep infected at conception with
49 contaminated semen develop reproductive disturbances, supporting the hypothesis of venereal
50 transmission for *T. gondii*.

51

52 **Keywords:** sheep; semen; toxoplasmosis; transmission

53

54 **1. Introduction**

55 *Toxoplasma gondii* infection in sheep is distributed worldwide and is responsible for
56 considerable economic losses. In sheep, *T. gondii* infection is associated to occurrence of
57 embryonic death and reabsorption, fetal death and mummification, abortion, stillborn and
58 neonatal mortality (Dubey, 2009). Several studies on experimental infection with oral
59 inoculation of oocysts in sheep were performed in several countries in the last decades. Most
60 of the studies were performed by Buxton et al. (1988), Buxton et al. (1989), Buxton et al.
61 (1991), Buxton et al. (1993a), Buxton et al. (1993b), Buxton et al. (1996), Esteban-Redondo
62 and Innes (1998), Esteban-Redondo et al. (1999), Kirkbride et al. (1992), McColgan et al.
63 (1988), Owen et al.(1998b), Samad and Clarkson (1995) and Trees et al.(1989). Those studies
64 described that different doses employed for experimental infection caused symptoms related
65 to reproductive disturbances. The severity of infection is related to the gestational stage and
66 most of sheep get infected just after being born. Among those infected sheep, less than 2%
67 become persistently infected and less than 4% are able to transmit the parasite vertically to the
68 next generation (Buxton et al., 2006; Buxton et al., 2007; Dubey and Beattie, 1988).
69 Evidences supporting that conclusion are based on previous studies by Hartley (1961),
70 Munday (1972), Watson and Beverley (1971) and a recent study by Rodger et al. (2006).

71 The major goal of the present study was to identify reproductive disturbances caused
72 by *T. gondii* in an experimental infection model where sheep were infected using
73 contaminated semen containing different doses of the parasite at the moment of conception.

74

75 **2. Material and Methods**

76 **2.1. Experimental Station**

77 Experiments were performed at the Experimental Station of Pocinhos D'água in the
78 District of Fazenda Nova, Brejo da Madre de Deus county, Region of Agreste Meridional of

79 the Pernambuco State (08° 08' 45" South Latitude and 36° 22' 16" West Longitude), Northeast
80 of Brazil. All the experiments met or exceeded the International Guiding Principles for
81 Biomedical Research Involving Animals and were approved by the Ethical Committee of the
82 Federal Rural University of Pernambuco (CEUA-UFRPE - protocol # 021/2009).

83

84 **2.2. Animals**

85 Forty-one female Santa Inês sheep with pluriparous were used. All animals were
86 serologically negative for antibodies against *T. gondii*, *Chlamydophila abortus*, *Neospora*
87 *caninum* and *Brucella ovis*. Sheep were divided in three experimental groups (G1, G2 and
88 G3) containing 15, 15 and 11 animals, respectively. Females from the G1 were inseminated
89 with contaminated semen containing 6.5×10^4 tachyzoites; females from G2 were inseminated
90 with contaminated semen containing $4,0 \times 10^7$ tachyzoites and females from G3 were
91 inseminated with tachyzoite-free semen (control group). Tachyzoites of the strain "CPG"
92 (genotype III), were obtained from abortion episodes in goat in the city of Guarapuava, PR,
93 Brazil.

94 In order to obtain semen samples used for artificial insemination, Santa Inês ram with
95 history of fertility was used. The ram chosen was submitted to the Andrologic Test according
96 to the Brazillian Committee for Animal Reproduction (CBRA, 1998). The animal was also
97 tested for *T. gondii*, *C. abortus*, *N. caninum* e *B. ovis* and presented negative serology for
98 those parasites.

99

100 **2.3. Estrous synchronization and artificial insemination program**

101 Estrous and ovulation synchronization was performed by treating the females with
102 progestrogens via vaginal implants (CIDR[®], InterAg-Edvet HD) for 14 days. At the moment
103 of vaginal implant removal, females received 300UI of e.C.G. (Novormon[®], Syntex AS).

104 Twelve hours after estrous detection using a vasectomized male, females were inseminated by
105 laparoscopy as described by Evans and Maxwell (1987). Fresh semen diluted in Tris-egg yolk
106 in the proportion of 1:9 was used (Evans and Maxwell,1987).

107

108 **2.4. Confirmation of infection**

109 For confirmation of infection in sheep, blood serum and total blood were harvested for
110 serology test and DNA detection for *T. gondii* at 0, 7, 14, 21, 28, 35, 49, 63 and 123 days
111 post-insemination. Anti-*T. gondii* antibody detection was performed using the indirect
112 immunofluorescence reaction (IFAT), using anti-sheep-IgG antibody conjugated (Sigma®)
113 with fluorescein isothiocyanate (FITC). Sera dilution of 1:64 to 1:4096 were tested and
114 reactions in the dilution of 1:64 or higher were considered positive (Camargo, 1974). For
115 DNA detection, PCR followed by nested-PCR were employed.

116

117 **2.5. Evaluation of gestation**

118 The evaluation of gestational development was performed using ultrasound screening.
119 Screening started at 15 days post-insemination and was kept every five days until day 35 post-
120 insemination. After that, ultrasound screening was performed every ten days until day 65
121 post-insemination. That approach was developed in order to identify any embryonic
122 reabsorption, fetal death, fetal mummification or malformation. Ultrasonographic screening
123 was performed according to Moraes et al. (2008), using an ESAOTE-Pie Medical device
124 (Model Falcon 100 Vet, Nutricell Ltda, Campinas, SP- Brazil) equipped with 6 MHz
125 transducer.

126

127

128

129 **2.6. Delivery monitoring and assistance**

130 Throughout gestation, females were monitored twice a day in order to identify any
131 possible abortion. At delivery, sheep were also monitored and placenta, fetuses and stillborn
132 were harvested. Tissues from stillborns and placentas were identified and stored for posterior
133 *T. gondii* DNA and histopathology exams.

134

135 **2.7. Mating season**

136 Regarding reproductive performance in sheep post-experimental infection, all serology
137 positive or PCR positive animals from G1 and G2 were submitted to controlled mating season
138 (CMS). Estrous was monitored for 60 days using a Santa Inês ram with fertility history
139 according to the recommendations of the Brazilian Committee for Animal Reproduction
140 (CBRA, 1998). In addition, the male presented negative serology for *T. gondii*, *C. abortus*, *N.*
141 *caninum* and *B. ovis*. After CMS, animals were exposed to ultrasound screening for the
142 diagnosis of gestation or reproductive pathologies.

143

144 **2.8. Polymerase Chain Reaction**

145 All samples (total sample, fetal tissues and placenta) were submitted to DNA
146 extraction using the Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit (Qiagen®, Hilden - Germany),
147 according to the manufacture's protocol. Extracted DNA was analyzed and quantified in 0.8%
148 agarosis gel with a 1Kb molecular weight marker, stained with ethidium bromide, observed
149 with a UV light and photodocumented for verification of its quality.

150 Amplification reactions were performed in a final volume of 12,5µL containing: 2,5µL
151 of genomic DNA; 0,5µL of each primer at 10µM (*Forward C 1: 5' -*
152 *TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC - 3' Reverse N 1: 5' - GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG - 3*);
153 2,5µL of Mili-Q ultrapure water and 6,25µL of MasterMix (mix for PCR - Promega,

154 Madison, Wisconsin - USA) according to the manufacture's protocol. The thermal profile of
155 each reaction step was performed in a thermocycler MJ96G (Biocycle Co. Ltd, Hangzhou -
156 China) according to the protocol described by Spalding et al. (2006). The 197bp amplified
157 product corresponding to *T. gondii* DNA was detected by electrophoresis in 2% agarosis gel,
158 stained with ethidium bromide, visualized with UV light and photodocumented.

159 All negative samples and controls were submitted to nested-PCR using 1µL the
160 product from the PCR and added to the reaction mixture in a final volume of 12,5µL
161 containing 0,5µL of each primer at 10µM (*Forward C 2: 5' -*
162 *GGCGACCAATCTGCGAATACACC - 3' Reverse N 2: 5' - TGCATAGGTTGCAGTCACTG -*
163 *3*); 4,75µL of Mili-Q ultrapure water and 6,25µL of MasterMix de according to the
164 manufacture's protocol. The reaction cycles consisted of initial DNA denaturation at 95°C (4
165 min) and 35 cycles at 95°C for 1 minute for denaturation, 62°C for 30 seconds for annelation,
166 72°C for 1 minute for extension and a period of final extension for 10 minutes at 72°C. The
167 97bp amplified product referring to *T. gondii* was detected by electrophoresis in 2% agarosis
168 gel, stained with ethidium bromide, visualized with a UV light and photodocumented.

169

170 **2.9. Histopathology**

171 Fetuses and stillborns were necropsied according to Pérez et al. (2003). All
172 macroscopic changes were recorded at necropsy such as changes in tissue color,
173 inflammation, presence of necrotic focuses in the cotyledons and fetal liver, presence of
174 exudate and edema. In addition, tissues from brain, spinal cord, lungs, heart, spleen, liver,
175 kidneys and placenta were harvested whenever possible. Samples were fixed in 10% formalin.
176 After fixation, the material was cut and submitted to dehydration, diaphanization and paraffin
177 inclusion. Blocks were sectioned in a microtome (Model 1512, Leitz Wetzlar, Germany) at
178 4µm, mounted in slides and stained by hematoxylin-eosin according to Prophet et al. (1992).

179 Histological findings were classified as lesions-free, non-related lesions, consistent lesions or
180 toxoplasmosis-related lesions.

181

182 **3. Results**

183 **3.1. Serology**

184 Seroconversion was observed starting at 7 days post-insemination. In the G1, 5/15
185 (33.3%) of females seroconverted and in the G2 all females seroconverted 15/15 (100%). The
186 maximum titration observed in both infected groups was 1:1024, reached by 10/20 (50%)
187 between 28 and 63 days post-insemination. None sheep from the G3 presented anti-*T. gondii*
188 antibodies.

189

190 **3.2. Molecular Diagnosis**

191 *T. gondii* DNA was detected in 93.3% (28/30) of blood samples from sheep of the G1
192 and G2 starting at 7 days post-insemination. All animals from G3 were negative. Nested-PCR
193 was performed on tissues from fetuses and stillborns (spleen, brain, cerebellum, spinal cord,
194 heart, diaphragm, liver and lung) and placenta from females that kept gestation until delivery.
195 Parasite DNA was detected in all analyzed tissues with some variation in the frequency
196 according to the organ (Table I).

197

198 **3.3. Histopathology**

199 Organs from four stillborns, one adult female and three placentas were macro and
200 microscopically evaluated. At the macroscopic exam, the appearance of stillborns was
201 classified according to the preservation, being 2/4 (50%) considered fresh and 2/4 (50%)
202 considered autolyzed. All three placentas presented fresh appearance. Observed the
203 placentas, two out of three presented toxoplasmosis-related lesions such as nonsuppurative

204 infiltration, several focuses of necrosis and mineralization. In addition, two tissue cysts were
205 identified.

206

207 **3.4. Reproductive disturbances**

208 Several reproductive disturbances were detected though gynecological exam,
209 ultrasound screening and estrous monitoring. Those disturbances were observed in three
210 distinct stages: early phase of gestation (until 60 days post-insemination); immediate after
211 delivery (until 150 days post-insemination) and after controlled mating season (until 180 days
212 post-insemination).

213

214 **3.4.1. Disturbances post-insemination (early phase of gestation)**

215 In the initial phase, high rate of embryonic reabsorption 24/30 (80%) was detected
216 between 18-21 of gestation, being 60% of females from G1 and 100% of females from G2.
217 After reabsorption, infected females developed reproductive pathologies such as hydrometra
218 in 2/24 (8.33%), mucometra in 2/24 (8.33%) and follicular cysts in 2/24 (8.33%). In the G3,
219 8/11 (72.7 %) of females were monitored until the end of gestation and delivered health
220 animals.

221

222 **3.4.2. Post-delivery disturbances**

223 In the G1, 6/15 (40%) of females kept gestation and were monitored until delivery,
224 where 2/6 (33.3%) presented eutocic delivery and viable newborns, 2/6 (33.3%) presented
225 dystocic delivery and stillborns, 1/6 (16.6%) presented uterine inertia followed by C-section
226 and 1/6 (16.6%) of females died before delivery. The female that died before delivery was
227 necropsied and its organs were harvested for histopathology and molecular analyses. In that
228 case where the female presented uterine inertia, C-section was chosen to deliver the fetus. In

229 that case, fetal death was diagnosed by the ultrasound screening and hormonal induction of
230 uterine contractions was performed without success. Therefore, at 180 days of gestation,
231 although animal did not present clinical signs, the fetus was surgically removed. The
232 surgically removed fetus presented advanced stage of autolysis and was submitted to
233 histopathology and molecular exams. All females from G3 did not present any reproductive
234 pathology, kept gestation until delivery and delivered healthy animals.

235

236 **3.4.3. Post-controlled mating season disturbances**

237 At the end of controlled mating season, 15/24 (62.5%) of females got pregnant and
238 9/24 (37.5%) did not. The reproductive disturbances observed during that period were: 6/9
239 (66.6%) anestrus in which two of them presented follicular cysts, 1/9 (11.1%) hydrometra
240 and 2/9 (22.2%) mucometra (Figure 1).

241

242 **4. Discussion**

243 Natural or experimental transmission of *T. gondii* via semen in sheep has not been
244 fully documented. It is known that ram naturally infected by *T. gondii* are able to excrete
245 tachyzoites in the semen for 20-25 days post-infection (Barberan and Marco, 1997). On the
246 other hand, those ram experimentally infected are able to excrete tachyzoites in the semen
247 from 7 to 32 days post-infection (Spence et al., 1978); between 16 and 26 days post-infection
248 (Teale et al., 1982) and most recently, for periods as long as 70 days post-infection (Lopes et
249 al., 2009). In the present study, we performed experimental infection in female sheep via
250 semen at the moment of insemination using two different doses of the parasite. We adopted
251 that approach in order to investigate maternal infection and evaluate reproductive pathologies
252 during the acute and chronic phases of infection. Thus, parasitemia and seroconversion in
253 sheep from G1 and G2 groups were observed starting seven days post-insemination,

254 confirming the infection via semen in most of the females inseminated. In addition, taking
255 advantage of the reproductive monitoring of primo-infected sheep allowed us to characterize
256 in a wide range all the reproductive disturbances caused by the infection. According to
257 Kawazoe (2005), congenital or transplacental transmission is considered the gravest form of
258 transmission and usually occurs in the acute phase of infection. In our study, in addition to the
259 reproductive disturbances observed in the acute phase of infection such as embryonic
260 reabsorption in animals from G1 and G2, it has been demonstrated disturbances in the final
261 stage of gestation and delivery as well as low conception rate when females were monitored
262 during the controlled mating season.

263 Abortion is often observed during *T. gondii* infection. However, when the infection
264 was performed at the same time of the artificial insemination, the major disturbance observed
265 was embryonic reabsorption in 60% of sheep from G1 and 100% of sheep from G2. In those
266 animals that kept gestation until delivery, it was observed the presence of stillborns and areas
267 of necrosis and mineralization on their placentas, confirming the finds of Sammin et al.
268 (2008) who described that in the infection by *T. gondii* there is an occurrence of stillborns due
269 to fetal anoxia caused by the diminished ability of the placenta to transfer oxygen. Besides,
270 those focuses of necrosis were due to toxic substances released by tissue destruction of the
271 placenta caused by the parasite. Those lesions eventually mineralize as gestation goes on.

272 Most of the studies investigating experimental infection in sheep terminates as
273 delivery is reached. However, in our study, sheep were exposed to a controlled mating season
274 for 60 days after delivery and it was observed a conception rate of 62.5% after this period.
275 This observed index of conception was considered medium to low when compared to what is
276 considered satisfactory (80-98%) for natural mating season in sheep (Moraes, 1992). On the
277 other hand, sheep from the control group presented a conception rate of 90.9%. Those data
278 were important to demonstrate that reproductive disturbances caused by *T. gondii* infection

279 were not limited to the acute period in the primo-infection as described by different studies
280 worldwide, but also it affects the reproductive performance of those females in the future.
281 Regarding the pathologies detected after controlled mating season, it was observed that 9/24
282 (37.5%) of females presented anestrus, including the presence of follicular cysts, hydrometra
283 and mucometra. According to Da Costa (1980), a giving sheep that do not get pregnant after a
284 mating season is considered sterile and due to a lack of chronic monitoring, the possible
285 reproductive pathology involved is not diagnosed. As a step forward, in our study, we
286 performed the gestational follow-up throughout gestation using ultrasound screening. That
287 approach allowed us to identify reproductive disturbances in a reliable manner. However,
288 further studies are required to evaluate the occurrence of those reproductive pathologies in
289 sheep inseminated with semen of a naturally infected ram and different doses of *T. gondii*.

290 The *T. gondii* infection diagnosis based only on clinical symptoms and reproductive
291 disturbances is difficult and more complex laboratory techniques are necessary (Innes and
292 Esteban-Redondo, 1997). Masala et al. (2003) performed molecular exams using nested-PCR
293 in sheep that naturally aborted. Authors confirmed that *T. gondii* was frequently found in
294 placenta tissues. Luzon et al. (1997) also reported that the parasite presents a tropism for
295 placenta tissues.

296 In the present study, parasite DNA was detected in all fetal tissues examined
297 presenting 100% of positivity in samples taken from heart, lungs, diaphragm, placenta and
298 uterus. However, when those samples were evaluated by histopathology, only placentas
299 presented lesions related to toxoplasmosis. This finding is in accordance with Esteban-
300 Redondo and Innes (1998) who demonstrated that oral experimentally infected adult sheep
301 with different doses of oocysts resulted in 8/12 brains and hearts positive by PCR but none
302 positive by histopathology. On that regard, authors suggested that the differences between
303 PCR and histopathology were probably due to the fetal autolysis that makes the interpretation

304 of the results difficult and also due to differences in samples harvested for different tests that
305 contain or not the parasite. Dubey (1990) also reported that some lesions associated to
306 congenital toxoplasmosis in sheep could not be always detected during histopathology exams.

307 Although another study investigating the infection in pregnant sheep (60-90 days of
308 gestation) by oral inoculation with oocysts has been performed by Owen et al. (1998a, 1998b)
309 where authors reported reabsorption, abortion, stillborns and newborns serologically positive
310 before taking the colostrums, it is important to stress that this is the first report on
311 experimental infection by *T. gondii* at the moment of conception. Similar infection via semen
312 was performed by Serrano-Martinez et al. (2007) in cows using tachyzoites of *Neospora*
313 *caninum*, a coccidium from the same subfamily of *T. gondii* with different doses of that
314 employed in our study. On that study, authors observed high rate of embryonic reabsorption,
315 reaching 100% in the group infected with the higher dose.

316 In conclusion, sheep infected at the moment of conception using contaminated semen
317 with *T. gondii* develops reproductive disturbances in both the acute and chronic phases of
318 infection resulting in embryonic reabsorption, hydrometra, mucometra, anestrus, follicular
319 cysts, stillborns, dystocic delivery and uterine inertia leading to acquired infertility,
320 highlighting the possibility of venereal transmission of *T. gondii*.

321

322 **Acknowledgements:** This work was funded by the Brazilian National Science Foundation
323 (CNPq) grant number 472459/2008-2.

324

325

326

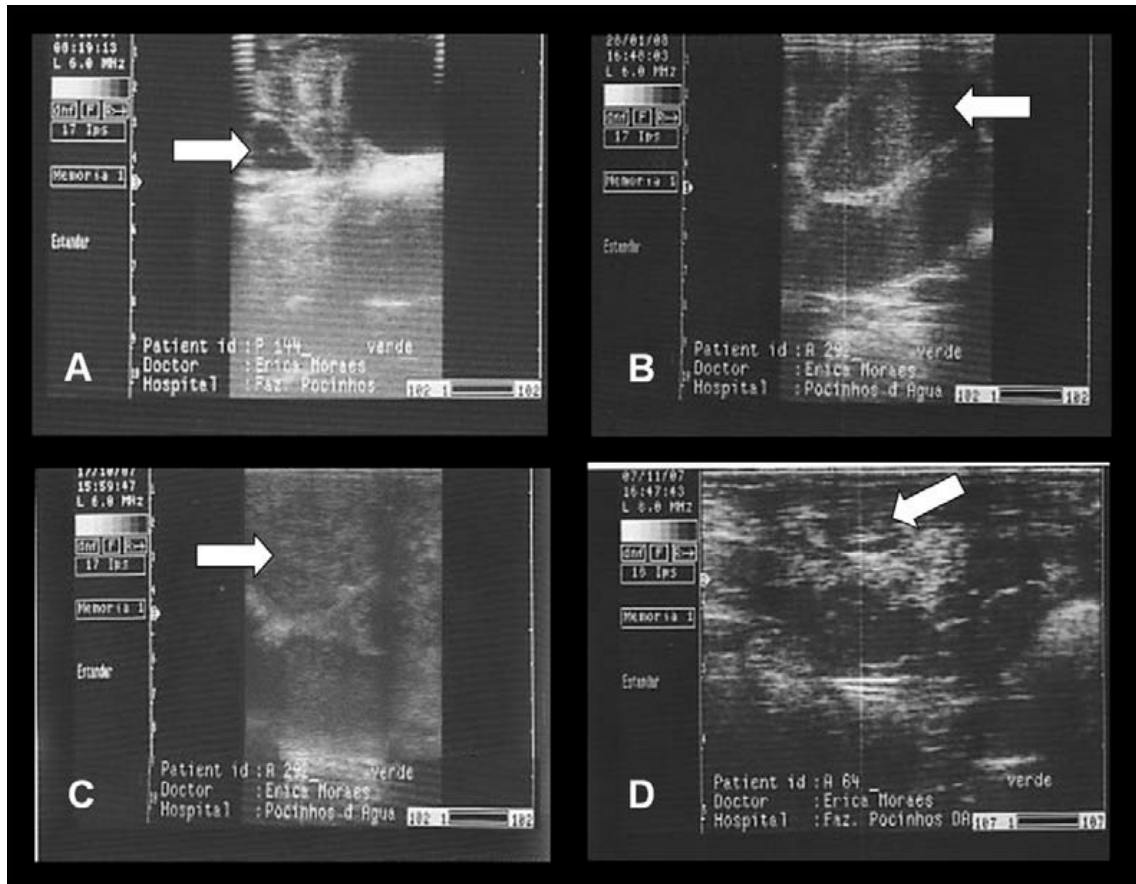
327

328

329 **Figure Caption**

330

331 **Figure 1.** Ultrasound screening showing reproductive pathologies in sheep infected via semen
332 by *T. gondii*: embryonic reabsorption (A), hydrometra (B), mucometra (C), and follicular cyst
333 (D).



334

335

336

337

338

339

340

341

342 **Table I.** Samples of fetal tissues, stillborns and placenta nested-PCR positives.

Organ	Number	Nested-PCR (%)
Spleen	3	2 (66.6%)
Cerebellum	4	2 (50%)
Brain	4	3 (50%)
Heart	4	4 (100%)
Diaphragm	1	1 (100%)
Liver	4	3 (75%)
Spinal cord	4	2 (50%)
Placenta	3	3 (100%)
Lung	4	4 (100%)
Uterus	1	1 (100%)

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356 **References**

- 357 Barberan, M., Marco, J.C., 1997. Patogenia, cuadro clinico y lesional -Toxoplasmosis,
358 Revista Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina, Madrid, 52, 35-49.
- 359
- 360 Buxton, D., Blewett, D.A., Trees, A.J., McColgan, C., Finlayson, J.,1988. Further studies in
361 the use of monensin in the control of experimental ovine toxoplasmosis, J. Comp. Pathol. 98,
362 225–235.
- 363
- 364 Buxton, D., Brebner, J., Wright, S., Maley, S.W., Thomson, K.M., Millard, K., 1996.
365 Decoquate and the control of experimental ovine toxoplasmosis, Vet. Rec. 138, 434–436.
- 366
- 367 Buxton, D., Maley, W.S., Eright, S. E., Rodger, S., Bartley, P., Innes, E.A., 2007. *Toxoplasma*
368 *gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story, Vet. Parasitol. 149, 25-28.
- 369
- 370 Buxton, D., Rodger, S. M., Maley, S. M., Wright, S. E., 2006. Toxoplasmosis: The possibility
371 of vertical transmission. Small Rumin. Res. 62, 43–46.
- 372
- 373 Buxton, D., Thomson, K.M., Maley, S., 1993a. Treatment of ovine toxoplasmosis with a
374 combination of sulphamezathine and pyrimethamine. Vet. Rec. 132,409–411.
- 375
- 376 Buxton, D., Thomson, K., Maley, S., Wright, S., Bos, H.J., 1991. Vaccination of sheep with a
377 live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when
378 pregnant, Vet. Rec. 129, 89–93.

- 379 Buxton, D., Thomson, K.M., Maley, S., Wright, S., Bos, H.J., 1993b. Experimental challenge
380 of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) *Toxoplasma gondii* vaccine, Vet. Rec.
381 133, 310–312.
- 382
- 383 Buxton, D., Uggla, A., Lovgren, K., Thomson, K., Lunde'n, A., Morein, B., Blewett, D.A.,
384 1989. Trial of a novel experimental *Toxoplasma* iscom vaccine in pregnant sheep, Brit. Vet. J.
385 145, 451–457.
- 386
- 387 Camargo, M. E., 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência, Rev. Bras. Patol. Clín.
388 10,143-169.
- 389
- 390 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA, 1998. Manual para exame e avaliação de
391 sêmen animal. Belo Horizonte, 49p.
- 392
- 393 Da Costa, A.J., 1980. Toxoplasmosis in domestic ruminants, in: Brazilian Seminar of Veterinary
394 Parasitology, Proc.of the Brazilian School of Veterinary Parasitology, Fortaleza, pp.128.
- 395
- 396 Dubey, J. P., 1990. Status of toxoplasmosis in sheep and goats en the United Station, J. Am.
397 Vet. Med. Assoc. 196, 259-262.
- 398
- 399 Dubey, J. P., 2009. Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. Vet. Parasitol.,
400 doi:10.1016/j.vetpar.2009.02.026
- 401
- 402 Dubey, J.P., Beattie, C.P., 1988. Toxoplasmosis of Animals and Man, CRC Press, Boca
403 Raton, Florida.

- 404 Esteban-Redondo, I., Innes, E. A., 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep
405 orally challenged with different doses of oocysts. Int. J. Parasitol. 28,1459-1466.
406
- 407 Esteban-Redondo, I., Maley, S.W., Thomson, K., Nicoll, S., Wright, S., Buxton, D., Innes,
408 E.A., 1999.,Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection, Vet.
409 Parasitol. 86,155-171.
410
- 411 Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats.,
412 Butterworths: Sydney.
413
- 414 Hartley, W.J., 1961. Experimental transmission of toxoplasmosis in sheep. N. Z. Vet. J. 9,1-
415 6.
416
- 417 Innes, E. A., Esteban-Redondo, M. I., 1997. Diagnostico. Revista Ovis: Tratado de Patologia
418 y Produccion Ovina, Madrid, 52, 51-56.
419
- 420 Kawazoe, U., 2005. *Toxoplasma gondii*., In: Neves, D.P. (Ed.), Parasitologia humana,
421 Atheneu, São Paulo, pp.163-172.
422
- 423 Kirkbride, C.A., Dubey, J.P., Libal, M.C., 1992. Effect of feeding lasalocid to pregnant ewes
424 experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Vet. Parasitol. 44, 299-303.
425
- 426 Lopes, W.D.Z., Costa, A.J., Souza, F.A, Rodrigues, J.D.F., Costa, G.H.N., Soares, V.E.,
427 Silva, G.S., 2009. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with
428 *Toxoplasma gondii*. Anim. Reprod. Sci., 111, 312-319.

- 429 Luzon, M., Alonso, A., Quintanilla Gozalo, A., 1997. Etiologia y biologia, Revista Ovis:
430 Tratado de Patologia y Produccion Ovina, Madrid. 52, 11-17.
431
- 432 Masala, G., Porcu, R., Madau, L., Tanda, A., Ibba, B., Satta, G., Tola, S., 2003. Survey of
433 ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. Vet. Parasitol.,
434 117, 15–21.
435
- 436 McColgan, C., Buxton, D., Blewett, D.A., 1988. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in
437 non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy, Vet. Rec. 123,
438 467–470.
439
- 440 Moraes, E. P. B. X., Santos, M. H. B., Aguiar Filho, C., Neves, J. P., Oliveira, M. A. L.,
441 Lima, P. F., 2008. Avaliação ultra-sonográfica do desenvolvimento embrionário-fetal de
442 ovinos da raça Santa Inês, Ciência Anim. Bras. 9, 148-155.
443
- 444 Moraes, J.C.F., 1992. A mortalidade embrionária e a eficácia da inseminação artificial em
445 ovinos, Ciência Rural, 22, 367-372.
446
- 447 Munday, B.L., 1972. Transmission of *Toxoplasma* infection from chronically infected ewes to
448 their lambs, Br. Vet. J. 128, 71-72.
449
- 450 Owen, M.R., Clarkson, M.J., Trees, A.J., 1998a. Diagnosis of *Toxoplasma* abortion in ewes
451 by polymerase chain reaction. Vet. Rec. 142, 445-448.
452

- 453 Owen, M.R., Clarkson, M.J., Trees, A.J., 1998b. Acute phase toxoplasma abortions in sheep.
454 Vet. Rec. 142, 480-482.
455
- 456 Pérez, A.L.G., Moreno, B., Aduriz, G., 2003. Necropsia y toma de muestras de abortos
457 ovinos. Revista Ovis: Tratado de Patología y Produccion Ovina, Madrid 86, 65-76.
458
- 459 Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H., 1992. Laboratory Methods in
460 Histotechnology, American Registry of Pathology, Washington.
461
- 462 Rodger, S.M., Maley, S.W., Wright, S.E., Mackellar, A., Wesley, F., Sales, J., Buxton, D.,
463 2006. Role of endogenous transplacental transmission in toxoplasmosis in sheep, Vet. Rec.
464 159, 768–772.
465
- 466 Samad, M.A., Clarkson, M.J., 1995. Prophylactic efficacy of decoquinate in the control of
467 experimentally induced toxoplasmosis in pregnant ewes, Bangladesh Vet. J. 29, 43–50.
468
- 469 Sammin, D., B. Markey, B., Bassett, H., Buxton, D., 2008. The ovine placenta and
470 placentitis—A review. Vet. Microbiol. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.054
471
- 472 Serrano-Martinez, E., Ferre, I., Osoro, K., Mota, R.A., Martinez, A., Del-Pozo, I., Hidalgo, C.
473 O., Ortega-Mora, L. M., 2007. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and
474 using contaminated semen with different numbers of tachyzoites, Theriogenology. 67, 729-
475 737.
476

- 477 Spalding, S. M., Angel, S. O., Amendoeira, M. R. R., 2006. Toxoplasmose. In: Rossetti M.
478 L., Silva C. M. D., Rodrigues J. J. S. (Eds.), Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular,
479 Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 102-111.
- 480
- 481 Spence, J. B., Beattie, C. P., Faulkner, J., Henry, L., Watson, W. A., 1978. *Toxoplasma gondii*
482 in the semen of rams, Vet. Rec. 14, 38-39.
- 483
- 484 Teale, A.J., Blewett, D. A., Miller, J. K., Buxton, D., 1982. Experimentally induced
485 toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma, Vet.
486 Rec. 17, 53-55.
- 487
- 488 Trees, A.J., Crozier, S.J., Buxton, D., Blewett, D.A., 1989. Serodiagnosis of ovine
489 toxoplasmosis: an assessment of the latex agglutination-test and the value of IgM specific
490 titres after experimental oocyst-induced infections, Res. Vet. Sci. 46, 67-72.
- 491
- 492 Watson, W.A., Beverley, J.K.A., 1971. Epizootics of toxoplasmosis causing ovine abortion,
493 Vet. Rec. 88,120-124.

Animal Reproduction Science

Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics.

Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors*: first author's name followed by "et al." and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

4.3 ARTIGO

Utilização da PCR *nested* para detecção de *Toxoplasma gondii* no sangue de ovelhas experimentalmente infectadas com taquizoítos via sêmen¹

(Artigo formatado para o Periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

1 Utilização da PCR *nested* para detecção de *Toxoplasma gondii* no sangue de
2 ovelhas experimentalmente infectadas com taquizoítos via sêmen¹

3
4 Érica Paes Barreto Xavier de Moraes², Antônio Carlos de Freitas³, Mateus Matiuzzi da
5 Costa⁴, José Wilton Pinheiro Jr⁵, Rinaldo Aparecido Mota^{2*}

6
7 **ABSTRACT** – Moraes E.P.B.X., Freitas, A.C., Costa M.M., Pinheiro Jr, J.W. & Mota R.A.
8 2010. [**Nested PCR utilization for *Toxoplasma gondii* detection in the blood of**
9 **experimentally infected sheep with tachyzoites through the semen**] *Pesquisa Veterinária*
10 *Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos
11 - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua
12 Dom Manoel de Medeiros, s/n- Dois Irmãos, 52171-900. Recife-PE, Brasil. E –mail:
13 rinaldo.mota@hotmail.com

14 The aim of this study was to evaluate the sensitivity of the PCR and nested PCR for *T. gondii*
15 detection in the blood of experimentally infected sheep with tachyzoites through the semen.
16 Blood samples of 30 sheep were taken, which were infected with different dosages: G1 - 6.5
17 X 10⁴ tachyzoites; G2- 4 X 10⁷ tachyzoites and G3- control group. For the anti-*T. gondii*
18 antibodies research the Indirect Immunofluorescence (IIF) technique was used. For the PCR
19 and nested PCR, primers derived from *BI* gene were used. Seroconversion was observed only
20 for the infected group. In the PCR, *T. gondii* DNA was detected in 40% of the infected sheep
21 blood samples, and in the nested PCR, in 93.3% of the samples. In the G3, no antibodies were
22 detected, as well as parasitic DNA in neither of the animals. It is possible to conclude that the
23 nested PCR is more sensitive for the *T. gondii* detection in the blood of animals

1. Recebido em:

Aceito para Publicação em:

Parte da Tese de Doutorado (PPGCV/UFRPE) do primeiro autor.

2.Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-900. Recife – PE, Brasil. *Autor para correspondência: rinaldo.mota@hotmail.com – Fone: +55 81 3320.6425; Fax: +55 81 3320.6400

3.Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental - LEMTE, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, 50670-901 - Recife, PE – Brasil.

4. Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Campus de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rua José de Sá Manissoba, S/N, Centro, 56304-970, Petrolina – PE, Brasil.

5. Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor, s/n, 55296-901 – Garanhuns, PE-Brasil.

24 experimentally infected through the semen, presenting superior results in comparison to those
25 of the PCR and might be successfully used in studies like this one.

26

27 **INDEX TERMS:** diagnose, toxoplasmosis in sheep, molecular technique.

28

29 **RESUMO** - Objetivou-se com esse estudo avaliar a sensibilidade da PCR e PCR *nested* na
30 detecção de *T. gondii* no sangue de ovelhas experimentalmente infectadas com taquizoítos via
31 sêmen. Foram colhidas amostras de sangue de 30 ovelhas infectadas com diferentes doses:
32 G1- $6,5 \times 10^4$ taquizoítos; G2- 4×10^7 taquizoítos e G3- grupo controle. Para a pesquisa de
33 anticorpos anti-*T. gondii* foi utilizada a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI). Para o
34 PCR e PCR *nested* foram utilizados iniciadores derivados do gene *BI*. Observou-se
35 soroconversão apenas dos grupos infectados. Na PCR, detectou-se o DNA do *T. gondii* em
36 40% e na PCR *nested* em 93,3% amostras de sangue das ovelhas infectadas. No G3 não foi
37 detectado anticorpos e DNA parasitário em nenhum animal. Conclui-se que a PCR *nested* é
38 mais sensível na detecção de *T. gondii* no sangue de animais experimentalmente infectados
39 via sêmen, mostrando resultado superior ao da PCR e podendo ser utilizada com êxito em
40 estudos dessa natureza.

41

42 **TERMOS DE INDEXAÇÃO:** diagnóstico, toxoplasmose ovina, técnica molecular.

43

44

INTRODUÇÃO

45

46 Nos ovinos, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é descrito como um dos principais responsáveis
47 por problemas reprodutivos em rebanhos no mundo. Os transtornos acontecem quando a
48 fêmea se infecta durante a gestação, podendo ocorrer desde reabsorções embrionárias iniciais
49 e abortos até fetos malformados e crias debilitadas e fracas, variando a intensidade de acordo
50 com a fase gestacional em que a fêmea se encontre (Dubey 1986, Weissmann 2003).

51

52 A toxoplasmose ovina é diagnosticada rotineiramente por métodos sorológicos, bem
53 como através dos métodos diretos como o bioensaio em camundongos, exame
54 histopatológico, imunohistoquímica e PCR (Pereira-Bueno et al. 2004). A parasitemia tem
55 sido detectada por meio dos métodos de biologia molecular, em especial a PCR, com a
56 vantagem de demonstrar maior sensibilidade quando comparado ao isolamento do parasito em
cultura de tecido (Meireles 2001).

57 Além de outros fatores, a sensibilidade e a especificidade da PCR dependem não só da
58 sequência-alvo no DNA do parasito, mas também dos pares de iniciadores de amplificação
59 desenhados (Spalding et al. 2006). Avanços recentes no conhecimento do genoma do *T.*
60 *gondii* tornaram possível a utilização da PCR para detecção do parasito. Estas técnicas se
61 fundamentam na amplificação específica de determinados genes como os genes *BI* e *P30* que
62 codificam o principal antígeno de superfície do protozoário, RNA ribossomal (rRNA) (Ellis
63 1998, Kompalis-Cristo et al. 2005, Spalding et al. 2006). Além do fragmento de 529pb
64 (Homan et al. 2000) e um seguimento repetitivo de DNA não-codificante, TGR 1E, 1^a, 2 e 4
65 (Cristina et al. 1991).

66 Diversos estudos demonstraram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos
67 específicos de DNA a partir de diferentes fluidos corporais. Na Medicina Veterinária,
68 especificamente em ovinos, são utilizadas principalmente em amostras de sangue (Esteban-
69 Redondo & Innes 1998, Da Silva & Langoni 2001), tecidos de fetos abortados (Duncanson et
70 al. 2001, Terry et al. 2001, Masala et al. 2003, Pereira-Bueno et al. 2004) e placentas
71 (Duncanson et al. 2001, Terry et al. 2001, Masala et al. 2003), com protocolos diferentes, não
72 havendo uma padronização da técnica para o diagnóstico molecular da toxoplasmose ovina. A
73 utilização do método complementar PCR *nested* também tem demonstrado bons resultados. O
74 objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização da PCR *nested* na detecção de *T. gondii* no
75 sangue de ovelhas experimentalmente infectadas via sêmen.

76

77

MATERIAL E MÉTODOS

78

79 Foram utilizadas quarenta e uma (41) ovelhas da raça Santa Inês com histórico reprodutivo de
80 fertilidade satisfatória. Todos os animais foram sorologicamente negativos para a pesquisa de
81 anticorpos contra *T. gondii*, *Clamidophyla abortus*, *Neospora caninum* e *Brucella ovis*. Foram
82 constituídos três grupos experimentais (G1, G2 e G3) com 15, 15 e 11 animais,
83 respectivamente. As fêmeas foram infectadas via sêmen através de inseminação laparoscópica
84 utilizando diferentes doses: G1 que foram inseminadas com sêmen contaminado com 6,5 X
85 10⁴ taquizoítos; G2 com sêmen com 4 X 10⁷ taquizoítos e G3 com sêmen sem taquizoítos
86 (grupo controle).

87

88 Para a confirmação da infecção por *T. gondii* foram realizados exames sorológicos aos
89 0, 7, 14 dias após a infecção. Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* foi utilizada a
89 técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando-se anticorpos anti-IgG-ovina
90 conjugado ao isotiocianato fluoresceína. Diluições do soro na razão quatro (1:64 a 1:4096)

91 foram testadas e reações na diluição 1:64 ou maior foram consideradas positivas (Camargo
92 1974).

93 Para a detecção do DNA do *Toxoplasma gondii* foram colhidas amostras de sangue
94 total com EDTA aos 0, 7, 14, 21, 28 dias após a infecção, utilizando-se a técnica de PCR
95 seguida da PCR *nested*.

96 Todas as amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA com o kit
97 comercial “Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen®, Hilden - Alemanha),
98 utilizando-se o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel
99 de agarose a 0,8% com marcador de peso molecular 100pb, corado com brometo de etídio,
100 visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado para verificação de sua qualidade.

101 Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um
102 volume final de 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico, 10µM de cada iniciador, 2,75µL
103 de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega) de acordo
104 com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foi feita em
105 termociclador MJ-96G (Biocycle Co. Ltd, Hangzhou - China) e seguido de acordo com o
106 protocolo descrito em Spalding et al. (2006). Todas as amostras negativas e controles foram
107 submetidos a PCR *nested*, utilizando 1µL do produto da PCR simples e adicionado à mistura
108 de reação em um volume final de 12,5µL contendo 10µM de cada iniciador, 4,75µL de Água
109 Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix de acordo com o protocolo do fornecedor. O ciclo
110 das reações consistiu de uma desnaturação do DNA inicial a 95°C (4minutos) e seguida de 35
111 ciclos a 95°C por 1 minuto para a desnaturação, 62°C por 30 segundos para o anelamento,
112 72°C por 1 minuto para a extensão e um período de extensão final de 10 minutos a 72°C.

113 Os pares de iniciadores utilizados são fragmentos da sequência do gene *BI*. Para a
114 primeira amplificação, foram utilizados TOXO-C1/TOXO-N1, amplificado em 197pb. E para
115 a segunda amplificação foram utilizados TOXO-C2/TOXO-N2, amplificado em 97pb (Burg
116 et al. 1989, Spalding et al. 2006).

117 O controle positivo foi feito utilizando-se suspensão de lavados intra-peritoneal de
118 camundongos previamente infectados com taquizoítos da cepa RH na concentração
119 10⁴taquizoítos/mL para posterior extração do DNA parasitário. Os produtos amplificados
120 foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e
121 visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. Para confirmação da identidade
122 dos fragmentos amplificados foi utilizado o sequenciamento de DNA. Os fragmentos de DNA
123 analisados apresentaram valores de similaridade e identidade com as sequências já existentes
124 no GenBank que variaram de 93 a 99% com E = 1e -100.

125 Medidas para evitar contaminação entre amostras foram seguidas conforme
126 recomendações de Kwok (1990) desde a colheita das amostras até a obtenção dos resultados
127 através da corrida eletroforética do produto da PCR *nested*.

128 Foram calculadas a Sensibilidade e Especificidade entre os resultados obtidos na
129 primeira e segunda amplificação.

130

131

RESULTADOS

132

133 Na sorologia realizada em amostras de sangue colhidas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 dias pós-
134 infecção experimental foi possível observar a soroconversão dos animais dos grupos
135 infectados, sendo 100% (15/15) os animais do G2 e 33,3% (5/15) do G1, confirmando a
136 infecção via sêmen. Nenhuma ovelha do G3 apresentou anticorpos contra *T. gondii*. No
137 resultado da primeira amplificação (PCR), observou-se o DNA do *T. gondii* em 40% (12/30)
138 das amostras de sangue. Na PCR *nested*, 93,3% (28/30) das amostras foram positivas. No G3
139 não foi detectado DNA parasitário em nenhum animal. Observou-se que o teste mais sensível
140 foi a PCR *nested* (100%), entretanto a PCR convencional demonstrou especificidade de 100%
141 (Tabela 1).

142

143

DISCUSSÃO

144

145 Amato Neto et al. (1995) citaram que o diagnóstico clínico da toxoplasmose é difícil de ser
146 realizado pelo fato de as falhas reprodutivas serem consequência de várias doenças
147 infecciosas (Vidotto 1992), ressaltando a necessidade do emprego do diagnóstico laboratorial
148 para elucidar as prováveis etiologias. A toxoplasmose ovina é diagnosticada rotineiramente
149 por métodos sorológicos, principalmente a IFI, MAD e ELISA, bem como através dos
150 métodos diretos como o bioensaio em camundongos, histopatológico, imunohistoquímica e
151 PCR (Pereira-Bueno et al. 2004).

152 Os testes sorológicos possuem grande utilização pelo tipo de coleta e processamento
153 das amostras, embora possuam desvantagens em relação às técnicas diretas de diagnóstico por
154 detectar apenas imunoglobulinas presentes no soro sanguíneo (Da Silva et al. 2002). A IFI é o
155 teste sorológico mais utilizado atualmente, embora estudos comparativos ainda discutem a sua
156 escolha em relação ao MAD e ELISA (Da Silva et al. 2002, 2003). Apesar da sua grande
157 utilização essa técnica não confirma a causa do aborto por *T. gondii* como acontece na

158 detecção do agente no tecido fetal ou placentário (Owen et al. 1998, Hurtado et al. 2001,
159 Masala et al. 2003).

160 De acordo com Meireles (2001) a parasitemia na infecção por *T. gondi* tem sido
161 detectada pela PCR, com a vantagem de demonstrar maior sensibilidade quando comparado
162 ao isolamento do parasito em cultura de tecido. Embora a utilização do sangue circulante para
163 este propósito ainda não seja utilizada no diagnostico de toxoplasmose ovina, em humanos
164 estudos comprovaram seu papel importante no diagnóstico pré-natal da toxoplasmose
165 congênita (Wong & Remington 1994, Spalding et al. 2002, Kompalic-Cristo et al. 2005) e em
166 pacientes imunodeprimidos (Filice et al. 1993, Guy & Joynson 1995, Franzen et al. 1997).
167 Um aspecto relevante da escolha do sangue é a capacidade de realizar o diagnóstico da doença
168 na fase aguda através da detecção dos taquizoítos no sangue circulante, o que torna a PCR
169 uma ferramenta para diagnóstico precoce, antes dos sinais clínicos que nem sempre são
170 aparentes (Ho-Yen et al. 1992, Kompalic-Cristo et al. 2005). Em experimentação com
171 animais o estudo através do sangue circulante também foi relatado um importante papel,
172 permitindo a detecção do parasito e apontando uma interpretação mais exata da fase da
173 infecção por *T. gondii* como observado nesse estudo onde as amostras de sangue foram
174 colhidas semanalmente para a detecção da parasitemia.

175 Quando se analisaram os resultados da PCR em relação à primeira e a segunda
176 amplificação, observou-se que a PCR *nested* mostrou-se mais sensível (100%) indicando que
177 é um ótimo teste para triagem. Hurtado et al. (2001) também demonstraram que a PCR *nested*
178 foi mais sensível e específica e pode ser utilizada para confirmar casos duvidosos. Neste
179 estudo foram utilizados pares de primers derivados do gene *B1* capazes de detectar 10
180 taquizoítos/mL e apenas 1 taquizoíto/mL para o PCR e PCR *nested*, respectivamente,
181 conforme Spalding et. al. (2006). Esta sensibilidade do *nested* explica a alta percentagem
182 (93,3%) das amostras somente detectadas após a segunda amplificação.

183 Variações nas sequências-alvo utilizadas na PCR para detecção de *T. gondii* são
184 descritas. Entre estas citam-se o gene *P30* (Robert et al. 1996), porções dos espaçadores
185 internos transcritos do RNA ribossomal (Hurtado et al. 2001). Da mesma forma o gene *B1* de
186 função desconhecida e altamente repetitivo e conservado é o mais utilizado (Kompalic-Cristo
187 et al. 2005). O PCR *nested* aumentou a especificidade e a sensibilidade da reação uma vez que
188 o DNA-molde da segunda amplificação está em concentrações mais elevadas e os *primers* da
189 segunda etapa têm menos chances de anelamento em sequências inespecíficas, dada a redução
190 do tamanho do molde (Rodrigues et al. 2006).

191 O uso da PCR *nested* em muitos casos é discutível pelo tempo e custo dispendidos.
192 Contudo, Montoya et al. (2009) ao utilizar o PCR *nested* com os mesmos primers aqui
193 utilizados, obtiveram ótimos resultados descrevendo que a quantidade de DNA parasitário
194 extraído na maioria das vezes não é suficiente para ser detectado apenas na primeira PCR. Os
195 resultados aqui obtidos mostram que o *nested* aumentou o número de amostras positivas em
196 56,9% em relação a PCR convencional. Devido à elevada sensibilidade do PCR *nested*,
197 Kompalic-Cristo et al. (2005) descreveram que as amostras devem ser processadas com
198 precaução para se evitar contaminações de ácidos nucleicos do parasito por outras fontes,
199 embora Spalding et al. (2006) ressaltaram que sua alta especificidade limita estes possíveis
200 falsos-positivos. Outra precaução que deve ser discutida é em relação ao método de extração
201 do DNA genômico. Existem vários protocolos de extração do DNA, mas dependendo da
202 qualidade das amostras iniciais, alguns não conseguem extrair e purificar o DNA com
203 acurácia, deixando resquícios de substâncias inibidoras como principalmente o grupamento
204 heme presente em amostras de sangue total que inibe a ação da enzima *Taq* DNA-polimerase
205 (Rodrigues et al., 2006). O uso de kits comerciais de extração tem resultado numa melhor
206 qualidade do DNA extraído, principalmente por obterem uma etapa de purificação mais
207 eficiente em relação aos protocolos laboratoriais (Kalia et al. 1999, McOrist et al. 2002).
208 Hurtado et al. (2001) ressaltaram que as contaminações ocorrem devido à manipulação dos
209 amplicons formados na primeira PCR para a PCR *nested* e para minimizar isto indicam a
210 realização da técnica do “único tubo” agregado aos cuidados de manipulação em ambiente
211 descontaminado, além da realização de cada etapa em áreas distintas. Neste estudo a técnica
212 foi realizada conforme recomendações de Kwok (1990).

213 Dessa forma conclui-se que a PCR *nested* utilizada nesse estudo é mais sensível na
214 detecção do parasito no sangue em ovelhas experimentalmente infectadas por *T. gondii*,
215 mostrando resultado superior ao da PCR e podendo ser utilizada com êxito em estudos dessa
216 natureza.

217

218 **Agradecimentos** - Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento
219 Científico e Tecnológico (CNPq), Processo no. 472459/2008-2.

220

221

222

223

REFERÊNCIAS

- 224
- 225 Amato Neto, V., Campos, R., Barazzi, R.G., Duarte, M.I.S., 1995. Toxoplasmose. Editora
226 Salvier, São Paulo: 4^a ed., 154p.
- 227 Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P., Boothoyd, J.C. Direct and sensitive detection of
228 pathogenic protozoan. *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin.
229 Microbiol. 27: 1787-1792, 1989.
- 230 Camargo, M.E., 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev. Bras. Pat. Clín. 10,
231 143-169.
- 232 Cristina, N. Liaud, M.F, Santoro, F., Oury, B., Ambroise-Thomas, P. 1991. A family of
233 repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis and use in
234 strain characterization. Exp. Parasitol, 73, 73-81.
- 235 Da Silva, A.V., Langoni, H., 2001. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing
236 cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR).
237 Vet. Parasitol. 97, 191–198.
- 238 Da Silva, A.V., Cutolo, A.A., Langoni, H., 2002. Comparação da reação de
239 imunofluorescencia indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos
240 anti-*Toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. Arq. Inst. Biol. 69, 7–
241 11.
- 242 Da Silva, A.V., Cunha, E.L.P., Meireles, L.R., Gottschalk, S., Mota, R.A., Langoni, H., 2003.
243 Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do
244 Estado de Pernambuco, Brasil. Ciência Rural, 33, 115–119.
- 245 Dubey, J. P., 1986. A review of toxoplasmosis in cattle. Vet. Parasitol., 22, 177-202.
- 246 Duncanson, P., Terry, R. S., Smith, J. E., Hide, G., 2001. High levels of congenital
247 transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. Int. J. Parasitology
248 31,1699-1703.
- 249 Ellis, J. T., 1998. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora*
250 *caninum* and *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitology, 28, 1053-1060.
- 251 Esteban-Redondo, I., Innes, E. A., 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep
252 orally challenged with different doses of oocysts. Inter. J. Parasitology, 28, 1459-1466.

- 253 Filice, G. A., Hitt, J.A., Mitchell, C.D., Blackstad, M., Sorensen, S.W. 1993. Diagnosis of
254 toxoplasma parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with
255 polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol, 31, 2327-31.
- 256 Franzen, C., Altfeld, M., Hegener, P., Hartmann, P., Arendt, G., Jablonowski, H., Rockstronh,
257 J., Diehl, V., Salzberger, B., Fatkenheuer, G. 1997. Limited value of PCR for detection
258 of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. J.
259 Clin. Microbiol, 35 2639- 41.
- 260 Guy, E.C., Joynson, H.M. 1995. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of
261 active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. J. Infect. Dis., 172,319-22.
- 262 Homan, W. L, Vercammen, M., Braekeleer, J. De, Verschueren, H., 2000. Identification of a
263 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for
264 diagnostic and quantitative PCR. Inter. J. Parasitology, 30, 69-75.
- 265 Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Barandika, J., García-Pérez, A. L., 2001. Single tube
266 *nested* PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted
267 ewes. Vet. Parasitology, 102, 17-27.
- 268 Kalia, A., Rattan, A. Chopra, P. A., 1999. Method for extraction of high-quality and high-
269 quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. Analytical
270 Biochem., 275, 1-5.
- 271 Kompalic-Cristo, A., Britto, C., Fernandes, O., 2005. Diagnóstico molecular da
272 toxoplasmose: revisão. J. Bras. Pat. Med. Lab.,41, 229-35.
- 273 Kwok, S., 1990. Procedures to minimize PCR-product carry-over. IN: PCR protocols: A
274 guide to methods and applications. Innis, M.A.,Gelfan, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.
275 San Diego: Academic Press, 482 p.
- 276 Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data.
277 Biometrics, 33,159-174.
- 278 Masala, G., Porcu, R., Madau, L., Tanda, A., Ibba, B., Satta, G., Tola, S., 2003. Survey of
279 ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. Vet.
280 Parasitol., 117,15-21.
- 281 McOrist, A. L., Jackson, M., Bird, A. R., 2002. A comparison of five methods for extraction
282 of bacterial DNA from human faecal samples. J. Microbiol. Methods. 50,131-139.

- 283 Meireles, L. R., 2001. Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes
284 localidades do estado de São Paulo. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências)-
285 Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
286 São Paulo, 141p.
- 287 Montoya, A., Miró, G., Mateo, M., Ramírez, C., Fuentes, I., 2009. Detection of *Toxoplasma*
288 *gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). Vet.
289 Parasitol., 160,159-162.
- 290 Owen, M.R., Clarkson, M.J., Trees, A.J., 1998. Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by
291 polymerase chain reaction. Vet. Rec. 142, 445-448.
- 292 Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozalo, A., Perez-Perez, V., Alvarez-Garcia, G., Collantes-
293 Fernandez, E., Ortega-Mora, L.M., 2004. Evaluation of ovine abortion associated with
294 *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. Vet. Parasitol., 121, 33-
295 43.
- 296 Robert, F., Gavinet, M. F., Tourte-Schaefer, C., Dupouy-Camet, J., 1996. Intérêts et limites de
297 la polymerase chain reaction dans le diagnostic de la toxoplasmose. Immuno-analyse &
298 Biologie Spécial Isée, 11,176-182.
- 299 Rodrigues, J. J. S., Silva, R. C., Siqueira, M. M., 2006. Toxoplasmose. In: Rossetti, M. L,
300 Silva, C. M. D., Rodrigues, J. J. S. (eds.), Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular
301 (Brasil, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), p.16-40.
- 302 Spalding, S. M., Amendoeira, M. R. R., Coelho, J. M. C., Angel, S. O., 2002. Otimização da
303 reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso
304 e placenta de gestantes. J. Bras. Pat. Med. Lab., 38, 105-110.
- 305 Spalding, S. M, Angel, S. O., Amendoeira, M. R. R., 2006. Toxoplasmose. In: Rossetti, M. L,
306 Silva, C. M. D., Rodrigues, J. J. S. (eds.), Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular
307 (Brasil, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), 102-111.
- 308 Terry, R.S., Smith, J.E., Duncanson, P., Hide, G., 2001. MGE-PCR: a novel approach to the
309 analysis of *Toxoplasma gondii* strain differentiation using mobile genetic elements. Int.
310 J. Parasitol., 31,155-61.
- 311 Vidotto, O., 1992. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal.
312 Semina: Clín. Agrária, 13, 69-75.

- 313 Weissmann, J. 2003. Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. The Canadian
314 Veterinary Journal. La revue vétérinaire canadienne 44: 322-324.
- 315 Wong, S.Y.; Remington, J. S., 1994. Toxoplasmosis in pregnancy. Clin Infect Dis. 18,853-61.
- 316 Ho-Yen, D.O. et al. 1992. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in
317 human blood samples. J. Clin. Pathol., 45, 1572-1572.

318 **Tabela 1** – Resultado comparativo entre a PCR e PCR *nested* na detecção de *T. gondii* no sangue de ovelhas
319 infectadas com taquizoítos via sêmen

320

321

Parâmetros	PCR (%)	PCR <i>nested</i> (%)
Sensibilidade	60	100
Especificidade	100	20
V.P.P.	100	71,4
V.P.N.	55,4	100

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352 **Figura 1**

353 Eleroforese em gel de agarose a 2% de produtos de amplificação por PCR *nested* de *T. gondii* em amostras de
354 soro, tecidos fetais e placentários na primeira (A) e segunda (B) amplificações. Onde: Marcador de massa
355 molecular de 100pb DNA Ladder, Promega®, (M), Amostras positivas na primeira (1 e 3) e segunda (1, 2 e 3)
356 amplificações, Amostra negativa (4), Controle positivo (C+) e Controle negativo (C-).

357

358

359

360

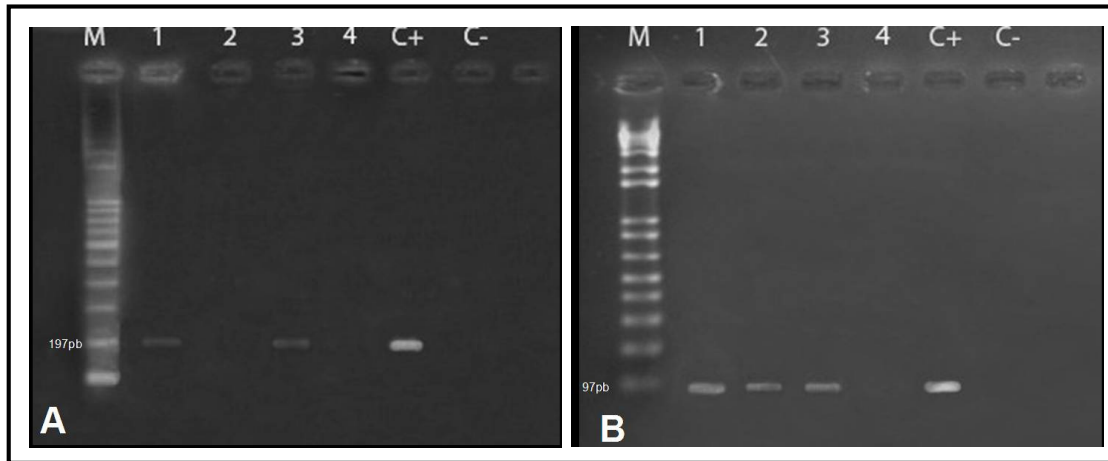
361

362

363

364

365





ISSN 0100-736X *versión impresa*
ISSN 1678-5150 *versión online*

Objetivo e política editorial

O objetivo da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira** é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve porém conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência em Word 7.0), ao editor da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**, no endereço abaixo. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, os editores, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em **Título, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinações destes três últimos), **Agradecimentos e Referências**:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) um **Abstract**, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;

c) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, **Resumo** e **Abstract** trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

d) a **Introdução** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

e) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

f) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na **Discussão** os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

h) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

i) os **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

j) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; Resumo e *Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da 1ª página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não

publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As **figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os **quadros** deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

4.4 ARTIGO

Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados

(Artigo formatado para o Periódico The Journal of Parasitology)

1 RUNNING HEAD: MORAES ET AL.- *Toxoplasma gondii* NO SÊMEN OVINO

2 **DETECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* NO SÊMEN DE OVINOS**

3 **NATURALMENTE INFECTADOS**

4 Érica P. B. X. Moraes, Eduardo B. Faria, André M. Batista, Antonio C. Freitas*, Jean Carlos

5 R. Silva, Pedro Paulo F. de Albuquerque, Rinaldo A. Mota**

6 Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom

7 Manoel de Medeiros, s/n- Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil.

8 **RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi estudar a eliminação de *Toxoplasma gondii*
9 em reprodutores ovinos naturalmente infectados. Foram utilizados 65 reprodutores
10 submetidos inicialmente à pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por meio da técnica de
11 Imunofluorescência Indireta (IFI). Os animais sorologicamente positivos foram submetidos à
12 colheita de sêmen para detecção do DNA parasitário. Na sorologia observaram-se 6/65 (9,2%)
13 animais positivos. No PCR *nested* de sêmen 4/6 (66,6%) animais foram positivos. Conclui-se
14 que a detecção de *T. gondii* no sêmen de reprodutores naturalmente infectados por meio da
15 técnica da PCR *nested*, reforça a necessidade de intensificar os estudos sobre a possibilidade
16 da transmissão horizontal do parasito via sêmen na espécie ovina.

17
18 **TOXOPLASMA GONDII DETECTION IN THE SEMEN OF**

19 **NATURALLY INFECTED SHEEP**

20 **ABSTRACT:** The aim of this work was to study the *Toxoplasma gondii* elimination
21 in reproductive male sheep naturally infected. Sixty-five reproductive male were initially
22 submitted to anti-*T. gondii* antibodies research through the Indirect Immunofluorescence (IIF)
23 technique. Animals serologically positive were submitted to semen collection for parasitic
24 DNA detection. In the serology, 6/65 (9.2%) positive animals were observed. In the nested
25 PCR of semen, 4/6 (66.6%) animals were positive. It is possible to conclude that to *T. gondii*
26 detection in the semen of reproductive males naturally infected through the nested PCR
27 technique reinforces the need to enhance studies on the possibility of horizontal transmission
28 of this parasite through semen in the ovine species.

29
30 _____
31 * Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade
Universitária, 50670-901 - Recife, PE - Brasil.

32 ** Autor para correspondência: Tel.:+55 81 33206425; fax: .:+55 81 3320 6400. E -mail:
rinaldo.mota@hotmail.com.

33 Em ovinos, *T. gondii* é descrito como um dos principais responsáveis por problemas
34 reprodutivos em rebanhos no mundo. Os transtornos ocorrem quando a fêmea se infecta
35 durante a gestação, podendo ocorrer desde reabsorções embrionárias iniciais e abortos até
36 fetos malformados e crias debilitadas e fracas, variando a intensidade de acordo com a fase
37 gestacional (Dubey, 1986; Underwood e Rook, 1992; Weissmann, 2003).

38 A inseminação artificial possibilita a concepção de um expressivo número de fêmeas
39 num curto intervalo de tempo. No entanto, ainda pouco se sabe sobre o risco da transmissão
40 de agentes patogênicos pelo sêmen (congelado ou diluído a fresco) com graves repercussões
41 na produção e comercialização destes rebanhos (Andrioli et al., 2006).

42 O taquizoítio de *T. gondii* no sêmen ovino já foi identificado pelo bioensaio por Spence
43 et al. (1978), Blewett et al. (1982) e Teale et al. (1982). Recentemente, Lopes et al. (2009)
44 infectaram experimentalmente carneiros e detectaram o parasito no sêmen através da PCR e
45 imunohistoquímica. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi estudar a eliminação de
46 *Toxoplasma gondii* em reprodutores ovinos naturalmente infectados.

47

48 2 MATERIAL E MÉTODOS

49 Foram utilizados 65 reprodutores ovinos de diferentes raças e idades, procedentes de
50 propriedades localizadas nas regiões da Zona da Mata e Agreste do Estado de Pernambuco,
51 Nordeste do Brasil. Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* foi utilizada a técnica de
52 Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando-se anticorpos anti-IgG-ovina (Sigma®, USA)
53 conjugado ao isotiocianato fluoresceína. Diluições do soro na razão quatro (1:64 a 1:4096)
54 foram testadas e reações na diluição 1:64 ou maior foram consideradas positivas (Camargo,
55 1974).

56 Os animais sorologicamente positivos foram submetidos à colheita de sêmen pelo
57 método de eletroejaculação. O sêmen foi avaliado de acordo com as características macro e
58 microscópicas conforme o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

59 As amostras de 200µL de sêmen foram submetidas à extração de DNA com o kit
60 comercial “Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen®, Hilden - Alemanha),
61 utilizando-se o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel
62 de agarose a 0,8%, com marcador de peso molecular 100pb, corado com brometo de etídio,
63 visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado para verificação de sua qualidade. Após as
64 extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de
65 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico; 10µM de cada primer (TOXO-C1 e TOXO-
66 N1); 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR Promega,

67 Madison, Wisconsin - USA) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das
 68 etapas de reações foram feitas em um termociclador (MJ96G, Biocycle Co. Ltd, Hangzhou -
 69 China) e seguido de acordo com o protocolo descrito em Spalding et al. (2006). O produto
 70 amplificado de 197pb correspondente ao DNA de *T. gondii* foi detectado por eletroforese em
 71 gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, visualizado através de luz ultravioleta e
 72 fotodocumentado.

73 Todas as amostras negativas e controles da PCR foram submetidos a PCR *nested*,
 74 utilizando-se 1µL do produto do PCR simples adicionado à mistura de reação em um volume
 75 final de 12,5µL contendo 10µM de cada primer (TOXO-C2 e TOXO-N2); 4,75µL de Água
 76 Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix de acordo com o protocolo do fornecedor. O ciclo
 77 das reações foi adaptado do protocolo descrito em Spalding et al. (2006) e consistiu de uma
 78 desnaturação do DNA inicial a 95°C (4min) e seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto para a
 79 desnaturação, 62°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e
 80 um período de extensão final de 10 minutos a 72°C. O produto amplificado de 97pb referente
 81 ao *T. gondii* foi detecta por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo
 82 e visualizado através de luz ultravioleta e fotodocumentados. Os dois pares de *primers*
 83 utilizados são derivados do gene *BI* correspondentes aos nucleotídeos 694-714, 887-868, 757-
 84 776 e 853-831 (Burg et al., 1989; Spalding et al., 2006).

85

86 3 RESULTADOS

87 Das 65 amostras de sangue analisadas, 06 (9,2%) foram positivos com títulos variados
 88 (Tabela I). Detectou-se o DNA do *T. gondii* em 4/6 (66,6%) dos animais reagentes na IFI.

89 **TABELA 1-** Resultados dos animais sorologicamente positivos (IFI) e detecção do DNA
 90 parasitário (PCR *nested*) nas amostras de sêmen total.

Animal/Exame	07M	24M	40M	44M	47M	59M
Reação Sorológica	1:64	1:256	1:256	1:512	1:256	1:128
(IFI)						
Detecção DNA	-	+	+	+	+	-
(PCR <i>nested</i>)						

91

92

93 4 DISCUSSÃO

94 A ocorrência de formas infectantes de *T. gondii* já foi anteriormente demonstrada no
 95 sêmen infectado em humanos (Martinez-Garcia et al., 1996), bovinos (Scarpelli et al., 2009),

96 suínos (Moura et al., 2007), caninos (Arantes et al., 2009), caprinos (Dubey e Sharma, 1980) e
97 ovinos (Spence et al., 1978; Blewett et al., 1982; Teale et al., 1982; Lopes et al., 2009),
98 levantando discussões sobre outras possíveis formas de transmissão do parasito uma vez que
99 se desconhece a importância relativa da via venérea.

100 Nesse estudo observou-se que os animais com os maiores títulos de anticorpos foram
101 aqueles que apresentaram *T. gondii* no sêmen através da PCR *nested*, destacando-se os títulos
102 256 e 512 que são relativamente baixos quando comparados àqueles relatados por Lopes et al.
103 (2009) que trabalharam com carneiros experimentalmente infectados e observaram títulos de
104 4056 associado à detecção do parasito no sêmen.

105 A presença de patógenos no sêmen é um achado relevante, pois abre discussão sobre a
106 possibilidade de transmissão venérea, implantando repercussão no manejo e nas técnicas
107 reprodutivas atualmente aplicadas, principalmente quanto à inseminação artificial (IA) por ser
108 cada vez mais utilizada por produtores de ovinos no Brasil (Hare, 1985; Philpott, 1994;
109 Andrioli et al., 2006).

110 Nesse estudo não foi possível estimar a fase da infecção quando os animais iniciaram a
111 eliminar o parasito no sêmen, pois as amostras foram obtidas em um único momento. Sabe-se
112 que em ovinos, o primeiro relato desta eliminação, ocorreu nos dias 7, 14, 20, 25 e 32 p.i.
113 (Spence et al., 1978). Já Teale et al. (1982) detectaram o parasito em 50% dos machos
114 infectados apenas em duas ocasiões 16 e 26 dias p.i. Em outro estudo realizado por Lopes et
115 al. (2009), *T. gondii* foi detectado no sêmen através da bioprova e PCR em dias variados (5
116 até 70 dias p.i). Em bovinos, Scarpelli et al. (2009) também detectaram o parasito no sêmen
117 através da bioprova a partir do dia 7 até 84 dias p.i., sendo o período mais longo já observado
118 na infecção experimental.

119 Os ovinos utilizados nesse estudo apresentavam-se assintomáticos no momento da
120 coleta do sêmen. De acordo com Terpsidis et al. (2009), a infecção toxoplásmica também
121 pode causar alterações andrológicas e reprodutivas no macho, independentemente da espécie
122 acometida. Estes autores ao infectarem ratos Wistar comprovaram alterações nos parâmetros
123 reprodutivos e andrológicos, principalmente em relação à motilidade, concentração e
124 morfologia espermática. No presente estudo, apenas 12,3% animais apresentaram o exame
125 andrológico insatisfatório, embora ao analisar os animais infectados apenas um animal
126 mostrou um exame andrológico reprovado. Este animal apresentou diminuição no volume do
127 ejaculado, motilidade e vigor espermático e aumento das patologias (morfológicas)
128 espermáticas. Contudo não se pode atribuir esse achado como consequência da infecção
129 natural, pois alguns animais não infectados também apresentaram esse mesmo padrão

130 espermático. Para comprovar a influência desse parasito nos achados do exame andrológico
131 de carneiros é necessário reproduzir experimentalmente a infecção e acompanhar os animais
132 em diferentes tempos para se concluir sobre esses parâmetros. Sobre esse aspecto, Teale et al.
133 (1982) e Lopes et al. (2009) relataram diminuição no volume do ejaculado, da motilidade e do
134 vigor espermático em carneiros infectados.

135 A detecção do *T. gondii* no sêmen de reprodutores naturalmente infectados por meio
136 da PCR *nested* reforça a necessidade de intensificar os estudos sobre a possibilidade da
137 transmissão horizontal do parasito via sêmen na espécie ovina.

138

139 **AGRADECIMENTOS**

140 Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
141 Tecnológico (CNPq) sob Processo no. 472459/2008-2.

142

143 **LITERATURA CITADA**

144 Andrioli, A., Gouveia, A. G., Martins, A. S., Pinheiro, R. R. and Santos, D.O. 2006. Fatores
145 de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. Pesquisa Agropecuária Brasileira
146 **41**:1313-1319.

147 Arantes, T. P., Lopes, W. D. Z., Ferreira, R. M., Pieroni, J. S. P., Pinto, V. M. R., Sakamoto,
148 C. A. and Costa, A. J. 2009. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by sêmen in
149 dogs. Experimental Parasitology **123**:190-194.

150 Blewett, D. A., Teale, A. J., Miller, J. K., Scott, G. R. and Buxton, D. 1982. Toxoplasmosis in
151 rams: Possible significance of venereal transmission. The Veterinary record **24**:73-75, 1982.

152 Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P. and Boothoyd, J.C. 1989. Direct and sensitive
153 detection of pathogenic protozoan. *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. Journal
154 of Clinical Microbiology **27**:1787-1792.

155 Camargo, M. E. 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Revista Brasileira de
156 Patologia Clínica **10**: 143-169.

157 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. 1998. Manual para exame e avaliação de
158 sêmen animal. 2.ed., Belo Horizonte, 49p.

159 Dubey, J. P. and Sharma, S. P. 1980. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of
160 goats. American Journal of Veterinary Research **41**: 794-795.

161 Dubey, J. P. 1986. A review of toxoplasmosis in cattle. Veterinary Parasitology **22**: 177-202.

162 Dubey, J. P. 1994. Toxoplasmosis. Journal of the American Veterinary Medical Association
163 **205**:1593-1598.

- 164 Hare, W. C. D. 1985. Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. Office
165 International des Epizooties, Technical series. Paris, 117p.
- 166 Lopes W. D. Z., Costa A. J., Souza F. A, Rodrigues J. D. F., Costa G. H. N., Soares V.E. and
167 Silva G.S. 2009. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with
168 *Toxoplasma gondii*. Animal Reproduction Science **111**:312-319.
- 169 Martinez-Garcia, F., Regadera, J., Mayer, R., Sanchez, S. and Nistal, M. 1996. Protozoan
170 infections in the male genital tract. The Journal of Urology **156**: 340-349.
- 171 Moura, A. B., Costa, A. J., Jordão Filho, S., Paim, B. B., Pinto, F. R. and Di Mauro, D. C.
172 2007. *Toxoplasma gondii* in sêmen of experimental infected swine. Pesquisa Veterinária
173 Brasileira 27: 430-434.
- 174 Philipott, M. 1994. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo
175 transfer. The British Veterinary Journal **150**: 209.
- 176 Scarpelli, L., Lopes, W. D. Z., Migani, M., Bresciani, K. D. S. and Costa, A. J. 2009.
177 *Toxoplasma gondii* in experimentally infected Bos taurus and Bos indicus semen and tissues.
178 Pesquisa Veterinária Brasileira 29: 59-64.
- 179 Spalding, S. M, Angel, S. O., Amendoeira, M. R. R., 2006. Toxoplasmose. In Rossetti, M. L,
180 Silva, C. M. D., Rodrigues, J. J. S. (eds.), Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular,
181 Brasil, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 102-111.
- 182 Spence, J. B., Beattie, C. P., Faulkner, J., Henry, L., Watson, W. A. 1978. *Toxoplasma gondii*
183 in the semen of rams. The Veterinary record 14: 38-39.
- 184 Teale, A.J., Blewett, D. A., Miller, J. K., Buxton, D. 1982. Experimentally induced
185 toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma. The
186 Veterinary Record **17**: 53-55.
- 187 Terpsidis, K. I., Papazahariadou, M. G., Taitzoglou, I. A., Papaioannou, N. G., Georgiadis, M.
188 P. and Theodoridis, I. TH. 2009. *Toxoplasma gondii*: Reproductive parameters in
189 experimentally infected male rats. Experimental Parasitology **121**: 238-241.
- 190 Underwood, W.J. and Rook, J.S. 1992. Toxoplasmosis infection in sheep. Compendium on
191 Continuing Education for the Practicing Veterinarian **14**:1543-1549.
- 192 Weissmann, J. 2003. Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. The Canadian
193 Veterinary Journal. La revue vétérinaire canadienne 44: 322-324.

J. Parasitol., 2008,
 _ American Society of Parasitologists 2008

THE JOURNAL OF PARASITOLOGY

POLICY AND GUIDELINES FOR AUTHORS

The *Journal of Parasitology* is the official journal of the American Society of Parasitologists (ASP). The *Journal* is nonprofit and dues of the membership support the cost of publication.

Manuscripts in English are accepted from investigators in any country regardless of whether they are members of the Society. The *Journal* publishes official business of the ASP and results of new, original research, primarily on parasitic animals.

POLICY

Conditions of acceptance

Manuscripts are received by *Journal of Parasitology* with the understanding that:

- 1) all authors have approved submission;
- 2) the results or ideas contained therein are original;
- 3) the work has not been published previously;
- 4) the paper is not under consideration for publication elsewhere and will not be submitted elsewhere unless rejected by the *Journal of Parasitology* or withdrawn by written notification to the editor of the *Journal of Parasitology*;
- 5) if accepted for publication and published, the article, or portions thereof, will not be published elsewhere unless consent is obtained in writing from the editor of the *Journal of Parasitology*;
- 6) reproduction and fair use of articles in the *Journal of Parasitology* are permitted in accordance with the United States Copyright Revision Law (PL94-533), provided the intended use is for nonprofit educational purposes. All other use requires consent and fees where appropriate;
- 7) the obligation for page charges and redactory fees is accepted by the authors.

Articles reporting original research, invited reviews, and research notes are evaluated by at least 2 anonymous reviewers selected by an associate editor. Critical comments are reviewed and published on the judgment of the editor. The final decision of whether to publish is made by the editor after reviews and opinions of the editorial board are considered.

Animal care and use

The ASP conforms to the "U.S. Government Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research and Training." Work involving vertebrate animals reported in any paper submitted to the *Journal of Parasitology* must have been conducted within the following guidelines adapted from a statement by The American Association for Laboratory Animal Science (1989, *Laboratory Animal Science* **39**: 267).

- 1) The transportation, care, and use of animals for research and teaching must conform with the appropriate national guidelines (in the U.S.A., the Animal Welfare Act) and other applicable laws, guidelines, and policies. Authors should refer to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (U.S. DHEW Publication Number [NIH] 86-23, as revised in 1985 or subsequently).
- 2) Experiments using animals should be designed and conducted with full consideration given for their relevance to human or animal health, the acquisition of knowledge, or the welfare of society.
- 3) Animal species selected for experimentation must be appropriate for the results expected, and the number used should be the minimum justified by sound statistical analysis.
- 4) All experimental and maintenance procedures require the avoidance of creating conditions that would lead to animal discomfort, distress, or pain, consistent with sound scientific practices.
- 5) If animals are to be subjected to momentary distress or pain, appropriate anesthesia must be employed. Painful experiments must not be conducted on unanesthetized animals that have been paralyzed by chemicals or other procedures.
- 6) Animals used in experiments that cause chronic pain or distress must be killed as soon as the experiments are concluded.
- 7) Veterinary care for laboratory animals is essential. Animals maintained in the laboratory must be kept in conditions appropriate for that species and under conditions that contribute to their health and comfort.
- 8) All persons using laboratory animals should be well trained for the conduct of experiments on living animals.
- 9) When exceptions to these principles are required, decisions regarding animal use must be made by the appropriate institutional animal care and use committee.
- 10) The use of animals obtained from natural populations must be in accordance with regulations and policies of appropriate federal or state agencies.

Page charges and redactory fees

The first 3 pages of each published manuscript are without charge. The charge for pages in excess of three shall be \$45 per published page for articles with at least one author who is a member, and \$75 per published page for articles with no authors who are members. Nonmembers intending to publish in

the *Journal of Parasitology* are encouraged to become members of the Society. The current annual dues are \$75.00 (students \$35.00). Authors are allowed five alterations free of charge. Each subsequent alteration costs \$5.00. Authors are reminded that added or removed characters may necessitate other corrections. If you have included figures in color, then please note that the cost of a color plate is \$500 for printed copy, and \$75 for online version only, and is the responsibility of the authors. So please let us know if the figures should be printed in color or not, and if they should be in the printed/online versions or both. If they are not to be printed in color it would be best to replace them with Black and White figures at this stage. If you are unable to do so, Allen Press will convert them to Black and White. These charges are subject to change without notice.

Return of materials

Rejected papers: When the decision is made not to publish a paper, the original typescript and illustrations are returned to the author with the author's copy of the reviews and a cover letter. All other materials are destroyed. Rejected manuscripts are not reconsidered.

Papers returned for revision: Materials necessary for reference or to be revised are returned to the author at the time a revision is requested. If the revision is not received within 6 mo, or if other arrangements have not been made with the editor, the manuscript is considered to have been withdrawn and the materials are destroyed.

Forms of publication

Articles: The Journal publishes articles reporting original research, primarily on parasitic animals.

Research notes: This form of publication represents discrete, definitive information (as opposed to preliminary results) that does not lend itself to inclusion in a typical, more comprehensive article. A new or modified technique may be presented as a research note only if the technique is not to be used in ongoing studies. Ordinarily, techniques are incorporated into the materials and methods section of a regular article. The Journal will no longer publish notes that deal with host or location records, except for the most unusual cases; if a prospective author has an exceptional case, he/she should first contact the Editor to determine the paper's potential acceptability.

Review articles: Only invited reviews are published. Unsolicited reviews should not be submitted, but topics may be suggested to the editor or members of the editorial board.

Critical comments: Critical comments are for correcting errors of published fact, providing alternative interpretations of published data, or presenting new theories based on published information.

Book reviews: Books having a broad interest to the membership of the Society are reviewed by invitation.

GUIDELINES FOR AUTHORS

Electronic submission

The *Journal of Parasitology* accepts papers online via our AllenTrack arrangement with Allen Press. Authors are encouraged to submit manuscripts from an Internet-connected computer, with any operating system and any platform, anywhere in the world, day or night. In preparing your manuscript for submission, please use the guidelines printed in the February issue of the *Journal of Parasitology* every other year. The system will allow authors to check the status of their manuscript and add updated files at a later date. The only software required is the Adobe Acrobat Reader (available for free from www.adobe.com). Authors not wishing to submit via the AllenTrack system may continue to submit hard copies to the editorial office by ordinary mail or courier service.

Like all submissions, access to papers submitted electronically is strictly controlled by login and user privileges, thus assuring authors that their papers are secure and inaccessible to anyone except the editor or his designee.

To submit a paper via the Internet, the following procedure should be used: Go to <http://jparasitology.allentrack.net>. The first time you use the system you will register for an account. You will use your account login and password when you return to the site to check on the status of your paper.

The first time you log on, you will have 2 choices (1) Submit a Paper, or (2) Author Guidelines. (Please examine the Guidelines carefully—they will save you time and help you make the best use of the system.) After you submit the paper, you will have a third option that links you to information on your submission. Once your files are uploaded to the database, they are converted as needed to PDF files that can be viewed, downloaded, and printed. Most word processing files, e.g., Word, Word- Perfect, text, Postscript, and rich format, are convertible. Word (MS word) for the text, is what we prefer. Figures can be uploaded in JPEG, TIFF, GIF, EPS, PDF, or Postscript formats. Line art, halftones, and color figures should be scanned as follows:

grayscale/halftone images should be scanned at 450 dpi, color figures should be scanned at 300 dpi; and line art should be scanned at 1200 dpi. **PLEASE NOTE** that all figures should be submitted as separate files and **NOT** part of the text. When your ms. has been accepted for publication we may ask that hard copies of your figures be mailed to the Editorial Office. The reason for this request is related to the enormous variation in the quality of printers used in reproducing figures during scanning. With original hard copies in hand, we can ensure quality reproduction.

The system will ask you to confirm that the files have been converted correctly, i.e., check your files to make sure the system converted each element properly. Your paper will be considered as officially submitted only after the system receives your confirmation.

As you go through the steps, watch for red arrows. These tell you that you need to take action on something. Converting your files should take just a few minutes, but occasionally they will take longer. Conversion time may vary with your connection. In any case, you are no longer required to make multiple copies of your text and figures, or package your manuscript, or ship it via regular mail service to the editorial office. Most importantly, it will be delivered instantaneously!

When the paper is in the system we will assign it a tracking number and an associate editor to whom it will be transferred electronically from our office. Once the associate editor has it, the manuscript will be sent immediately, by electronic means, to appropriate referees.

Hard copy submission

All manuscripts must be prepared and submitted according to the guidelines of this section and those of the subsequent section appropriate for the category of the report.

Paper: Manuscripts are to be typed on one side only of good quality, white paper. Thin onion skin or rice parchment papers are **not** acceptable.

Typing: **All parts of original manuscripts** are to be typed double-spaced (no more than 3 lines/25 mm), with all margins being at least 25 mm wide. Type should be at least 12 point (elite); **photoreduction, even in tables, is not acceptable.** Proportional spacing and hyphenation should not be used, i.e., do not justify right-hand margin. Do not leave extra space between paragraphs in the text. Only a single font should be used; genera and species should be in italics. Authors' names in the literature

cited section should be typed with capitals for the initials and first letter of the last name and lowercase for all other letters (despite the fact that these names are printed in large and small capital letters in the Journal).

Submission: For a new manuscript, submit the original and 3 copies prepared according to the Policy and Guidelines contained herein. When a manuscript has been accepted for publication by the editor, specific instructions for preparation of the revision on a diskette will be supplied. Please note that if it is not possible to prepare the revision on a diskette, then 2 hard copies of the revision prepared according to the Policy and Guidelines statement will be suitable. It remains the responsibility of the author to retain a copy of the manuscript for reference and to protect against loss. Manuscripts should be addressed to: Dr. Gerald W. Esch, Editor, Journal of Parasitology, Department of Biology, Wake Forest University, P.O. Box 7629, Winston-Salem, North Carolina 27109.

Articles

Manuscripts are to be organized in the following format and sequence, with all pages, beginning with that for the running head, numbered consecutively.

Running head: Provide the last names of authors (use et al. for more than 2) and a shortened title. The entire running head may not exceed 60 characters and spaces. Style: RH: JONES ET AL.—LIFE CYCLE OF *H. DIMINUTA*

Title: Immediately after the running head give the title of the article, names of authors, and address of the first author. Include the email address, in italics, of the corresponding author only.

The title and authors' names should be in bold type, and the same font size as the text. All other information should be in roman type. Titles should be short and descriptive. Avoid "empty words" such as preliminary studies on . . . and biology or ecology of . . . Do not use author and date citations with scientific names in the title. **In the title only**, numbers less than 11 are spelled out; numbers indicating papers in a series will not be accepted. Present addresses and addresses for remaining authors, if different from that of the first author, are given as footnotes, and are to follow the Figure Legends with one space between the legends and the footnotes. You should also designate who the corresponding author is by using one of the footnote designations.

Footnote designations are as follows: *, †, ‡, §, __, #, ¶, **, ††. (See examples [pp. 227–229] at end of guidelines.)

Abstract: This should follow directly after the author's address with no additional spacing between them. You should provide an abstract of the paper that does not exceed 200 words.

The abstract should be factual (as opposed to indicative) and should outline the objective, methods used, conclusions, and significance of the study. The abstract is headed with the word abstract, indented, and typed in bold capital letters, ending with a colon also in bold type. Text is run in after the colon, is not subdivided, and does not contain literature citations.

Introduction: The introduction should follow the abstract and should be un-headed. The introduction should establish the context of the paper by stating the general field of interest, presenting findings of others that will be challenged or developed, and specifying the specific question to be addressed. Accounts of previous work should be limited to the minimum information necessary to give an appropriate perspective. The introduction may not be subdivided and extra spacing between paragraphs is not permitted here or throughout the text.

Materials and methods: This section should give sufficient information to permit repetition of the study by others. Methods and apparatus used should be indicated, but specific brand names and models need to be mentioned only if significant. The source, e.g., city and state, both spelled in full, of special equipment or chemicals should also be given. Previously published or standard techniques are to be referenced, but not detailed.

Generic descriptions should be given for unusual compounds used.

The primary heading for this section should be typed in all bold capital letters and started at the left-hand margin of the page. The heading is unnumbered and ends without punctuation.

Second-level headings in bold type should be on a separate line beginning at the left-hand margin. The initial letter of the first word is the only capital letter except capitals needed for proper nouns. These headings are unnumbered and end without punctuation. Third-level headings are indented for a paragraph, italicized, and end with a colon, also italicized. The initial letter of the first word is the only capital letter, except capitals needed for proper nouns. Text is run in immediately following this heading. Further subdivision should not be needed. If the materials and methods section is short, it should not be subdivided; it is unnecessary to provide headings, beyond the primary head, for a series of subsections comprising single paragraphs.

Results: This section should contain a concise account of the new information. Tables and figures are to be used as appropriate, but information presented in them should not be repeated in the text. Avoid detailing methods and interpreting results in

this section. The results section may be subdivided and headed as for the materials and methods section.

Taxonomic papers have a distinct style that must be adhered to in preparing a manuscript. In **taxonomic papers** the results section is to be replaced by a section headed **DESCRIPTION**, beginning at the left-hand margin. The primary heading is followed by the italicized scientific name in bold type of the taxon studied; it begins at the left-hand margin. Synonyms and reference to figures follow, each as a separate line at the left-hand margin (these are not in bold type or italicized). The text of the description follows as a new paragraph beginning with *Diagnosis*.

The description is followed with a **taxonomic summary** section, headed as described for second-level headings in the instructions for the materials and methods section. The taxonomic summary section comprises a listing of the type host, other hosts, site, locality, and specimens deposited. Each of these topics is headed as a third-level heading, e.g., italicized, and indented as described for the materials and methods section.

The *Host* subsection must include the full scientific name of the host, the authority's name, and an indication if *Symbiotype* specimens were deposited in a vertebrate museum along with accession numbers. The *Locality* should include map coordinates as well as the name of the locality, e.g., ocean, river, etc., and the geopolitical region. *Prevalence and density* data are included when known. The taxonomic summary is followed by a remarks section, headed as described for second-level headings in the instructions for the materials and methods section.

The **remarks** section replaces the discussion of other articles and gives comparisons to similar taxa; it is typed in boldface and begins at the left margin. The first letter is capped and the rest are lowercase. This sequence of subsections is repeated for each taxon. If in taxonomic papers the description section

does not comprise all of the results and discussion, the format outlined is to be incorporated into the usual section of results. Museum accession numbers for appropriate type material (new taxa) and for voucher specimens (surveys) are required; if deposited in the U.S. National Parasite Collection at Beltsville, Maryland, the accession number is preceded by the acronym USNPC No. Appropriate photographic material should be deposited for descriptions of coccidia. Frozen tissues must also include accession numbers if deposited in a museum.

Discussion: An interpretation and explanation of the relationship of the results to existing knowledge should appear in the discussion section. Emphasis should be placed on the important new findings, and new hypotheses should be identified clearly. Conclusions must be supported by fact or data. All letters in **DISCUSSION** are boldfaced, capped, and started at the left-hand margin. The primary heading and subdivisions, if needed, in this section are as described for the materials and methods section.

Acknowledgments: These should be concise. Ethics require that colleagues be consulted before being acknowledged for their assistance in the study. The heading for this section is as for the primary head described for the materials and methods section. Subdivisions are not used in this section.

Literature cited: Citations are arranged alphabetically. All references cited in the text must appear in the literature cited section, and all items in this section must be cited in the text.

Citation of unpublished studies or reports is not permitted, i.e., a volume and page number must be available for serials and a publisher, city, state, and full pagination for books. Abstracts not subjected to peer review may not be cited. Work may be cited as "in press" only if proof has been produced. If absolutely necessary, a statement may be documented in the text of the paper by "pers. comm.", providing a copy of that page signed by the person cited accompanies the manuscript. In those cases, the citation is indicated in the style: (X. Y. Smith, pers. comm.).

Personal communications do not appear in the literature cited section. Do not indent anything; Allen Press has a computer program that will handle all citations and indent as appropriate.

Style in the text:

(Allen, 1989)

(Allen and Smith, 1989)

(Allen et al., 1989)

(Jones, 1987; Allen, 1989)—chronological

(Jones 1987; Allen, 1989; Smith, 1989)—chronological and alphabetical within year

(Jones, 1987, 1988a, 1988b, 1989)

Multiple authors with the same year of publication should be (Smith, Jones et al., 1988; Smith, Walker, and Jones, 1988), **not** (Smith et al., 1988a, 1988b)

Style in the literature cited section (note that indentations are no longer required):

Journal article, 1 author Nollen, P. M. 1990. Chemosensitivity of *Philophthalmus megalurus*

(Trematoda) miracidia. *Journal of Parasitology* **76**:

439–440. Journal article, 2 authors Edwards, D. D., and A. O. Bush. 1989. Helminth communities in avocets: Importance of the compound community. *Journal of Parasitology* **75**: 225–238.

Book

Schmidt, G. D., and L. S. Roberts. 1989. *Foundations of parasitology*, 4th ed. Times Mirror/Mosby College Publishing Company, St. Louis, Missouri, 750 p.

Chapter in edited book

Nesheim, M. C. 1989. Ascariasis and human nutrition. In *Ascariasis and its prevention and control*, D. W. T. Crompton, M. C. Nesbemi, and Z. S. Pawlowski (eds.). Taylor and Francis, London, U.K., p. 87–100.

Thesis or dissertation

Monks, W. S. 1987. Relationship between the density of *Moniliformis moniliformis* and distribution within the definitive host population. M.S. Thesis. University of Nebraska- Lincoln, Lincoln, Nebraska, 64 p.

Note that abbreviations are not used for titles or serial publications and that spaces appear between initials. The literature cited section has a primary heading as described for materials and methods.

Footnotes: Footnotes are used only for the title page of regular articles to indicate authors' addresses and to whom correspondence should be sent. Those for tables are typed directly under the table to which they pertain. Footnotes appear at the end of the manuscript directly after the Figure Legends (see example at end of guidelines).

Tables: Tables are used only to present data that cannot be incorporated conveniently into the text. Ordinarily values from statistical tests are not published as tables; tests employed and probability accepted for significance can be stated in the materials and methods section with significant differences indicated in tables by footnotes or in the text by a statement.

Tables must be designed to fit in 1 or 2 columns. Only rarely may they be designed to fit the height of a printed page. Generally, if the width does not fit the height of a typed page, the table is too wide. Tables may be continued on following pages to accommodate length, but pages may not be taped together, photoreduced, single-spaced, oversized, or otherwise modified to contain more material.

Tables are numbered with Roman numerals in a continuous series and so referenced, in sequence, in the text. Captions are typed above the data on the same page. Species names are spelled out in full (and italicized) the first time used in each caption. All columns in a table must have headings, with the

first letter of the first word and proper nouns capitalized, e.g., Number sampled, % Recaptured.

Horizontal lines should be avoided in the body of the table; vertical lines are not permitted. If such symbols are necessary, the table must be prepared as a line drawing and treated as a figure. Use of letters and numbers as superscripts or subscripts is not permitted. Table designations must be used in the oblique sequence that follows: *, †, ‡, §, ‖, #, ¶, **, ††.

Figures: All figure captions are to appear consecutively, in sequence, directly after the literature cited section. Do not place figure captions on the same page as the figures. Each figure or plate of figures must have a caption. The caption is written in paragraph style, beginning with the word "FIGURE." Captions are typed in roman, except when italic type is required, e.g., a genus and species. For plates, a summary statement should precede the specific explanation of each figure. Avoid repeating information for each figure that can be placed in the summary statement. Species names are spelled out in full the first time used in each caption. The caption must contain an explanation of all abbreviations used on the figures and indicate the value of lines or bars used to show size (unless the value is shown directly on the figure). Size should not be indicated by magnification in the caption because the figure might not be printed at the size calculated. Figures are numbered consecutively in the sequence mentioned in the text. Nonparenthetical references to figures in the text are not abbreviated, i.e., Figure 1; Figures 1, 2; Figures 1– 3; references to figures in parentheses in the text are abbreviated, i.e., Fig. 1, Figs. 1, 2; Figs. 1–3. All symbols used in a figure must be defined when possible by a key within the body of the figure. Style, including the form of abbreviation, must be that used in the *Journal*. When symbols are set in the caption, the following are available:

→ → → #, → → → → → → → → → →

Others require artwork and the additional expense may be billed to the author. Freehand labeling of figures is not acceptable. Figures may be used singly or grouped in a plate. In either case, the originals must be mounted on illustration board with a margin of at least 25 mm on all sides. Photographs and line drawings may not be combined in a single plate. If such a composition is necessary, the additional expense may be billed to the author. All figures are to be identified on the back by author name and figure number with the top indicated. Single figures are not numbered on the front, but each figure in a plate must include a number or letter, applied directly to the figure and, when possible, without an added background. Figures arranged to form a plate are to be abutted tightly without space or masking between.

Figures and plates are printed in 1 (88 mm wide) or 2 (182 mm wide) columns. Length may be up to 229 mm, but in practice it should be shorter to allow room beneath for the caption as published in the *Journal*. Publication may be delayed if the caption cannot be included on the same page as the figure(s).

Correcting proof and ordering reprints

Authors are responsible for the accuracy of their proofs and, therefore, what ultimately is printed in the *Journal*. **Corrected proofs must be returned to the editor promptly**, ideally on the same day as received. Receipt of proof is not acknowledged; authors are notified when proof is not received. Proofs are to be corrected, not revised. Additions usually are disallowed except to correct errors made in typesetting and by the editor.

Correction of errors made by the author may be billed to the author at the rate of \$5.00 each. Queries on the proof are to be answered by "yes" or "no"; do not use "ok" or "stet."

A form for ordering reprints accompanies the proof. Only the author designated to receive correspondence receives proof and reprint order forms. It is the responsibility of this author to clear

the proof with other authors and to provide the opportunity for them to order reprints. **Reprint orders are to be returned to Allen Press** at the address on the form. Orders received after printing of the issue containing the article cannot be filled.

SCHEDULE FOR PRINTING INSTRUCTIONS

These instructions, or a revision, will be printed in the February issue of the *Journal* every 2 years. Reprints are available from the editor, or they can be found online at: <http://asp.unl.edu>.

ACKNOWLEDGMENTS

These instructions are a revision of policies and practices formulated by previous editors. The staff at Allen Press, especially Annielaurie Seifert, contributed ideas and advice for the revision.

Gerald W. Esch, Department of Biology, Wake Forest University, P.O. Box 7629, Winston-Salem, North Carolina 27109.

4.5 ARTIGO

Diagnóstico de *Toxoplasma gondii* em fetos abortados e natimortos em ovinos
no estado de Pernambuco, Brasil¹

(Artigo formatado para o Periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

1 Diagnóstico de *Toxoplasma gondii* em fetos abortados e natimortos em ovinos
 2 no estado de Pernambuco, Brasil¹

3
 4 Érica Paes Barreto Xavier de Moraes², Mateus Matiuzzi de Costa³, Antônio Flávio Medeiros
 5 Dantas⁴, Valdir de Andrade Braga⁵, Rinaldo Aparecido Mota^{2*}

6
 7 **ABSTRACT** – Moraes E.P.B.X., Costa M.M., Dantas A.F.M., Braga, V.A. & Mota R.A.
 8 2010. [*Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetus and stillborns in the State of
 9 Pernambuco, Brazil] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Doenças
 10 Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos - Departamento de Medicina Veterinária,
 11 Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n- Dois Irmãos,
 12 52171-900. Recife-PE, Brasil. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

13 The aim of this study was to examine 245 organs of fetus and 28 placentas from 35 abortions
 14 and stillborns of the ovine species in the State of Pernambuco, Brazil. At the necropsy,
 15 fragments of brain, cerebellum, medulla, lungs, heart, spleen, liver and placenta were taken
 16 for the PCR nested and histopathologic exam. In the nested PCR, three abortions and two
 17 stillborns (14.3%) were positively confirmed for *T. gondii*, with DNA amplification in all of
 18 the fetal organs and placenta, emphasizing the heart and the placentas the tissues of choice. At
 19 the necropsy, macroscopic lesions suggesting *T. gondii* infection were observed in 5/35
 20 (14.3%) of the placenta. At the histopathologic exam no lesions with toxoplasmosis
 21 characteristics were observed in the examined organs. As for the five placentas, lesions
 22 consistent with toxoplasmosis were observed as an inflammatory infiltrate non-suppurative,
 23 multiple necrosis and mineralization focus, besides the presence of tecidual cysts. This study
 24 substantiates the *T. gondii* involvement in aborted fetus and in placentas of naturally infected
 25 ovine in Brazil, these were not described previously in the literature.

26

¹Recebido em
 Aceito para publicação em
 Parte da tese de doutorado (PPGCV/UFRPE) do primeiro autor.

²Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos - Departamento de
 Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de
 Medeiros, s/n- Dois Irmãos, 52171-900. Recife-PE, Brasil. *Autor para correspondência:
 rinaldo.mota@hotmail.com
 Fone.: +55 81 33206425; Fax: +55 81 3320 6400

³Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Campus de Ciências Agrárias, Universidade
 Federal do Vale do São Francisco Rua José de Sá Maniçoba S/N, Centro, 56304-917- Petrolina,
 PE-Brasil.

⁴Laboratório de Patologia Animal, CSTR/UFCG, Campos de Patos, Av. Universitária, s/n, Santa
 Cecília, 58708-110 – Patos, PB – Brasil.

28 **INDEX TERMS:** Molecular diagnoses, toxoplasmosis, fetal tissue, placenta

29

30 **RESUMO** - Objetivou-se com esse estudo examinar 245 órgãos de fetos e 28 placentas de 35
31 abortos e natimortos da espécie ovina no estado de Pernambuco, Brasil. À necropsia foram
32 coletados fragmentos de cérebro, cerebelo, medula, pulmão, coração, baço, fígado e placenta
33 para realização do PCR *nested* e exame histopatológico. Na PCR *nested* foram confirmados
34 três abortos e dois natimortos (14,3%) positivos para *T. gondii*, com amplificação do DNA em
35 todos os órgãos fetais e placenta, destacando-se o coração e a placenta como tecidos de
36 eleição. Na necropsia foram observadas lesões macroscópicas sugestivas da infecção por *T.*
37 *gondii* em 5/35 (14,3%) das placentas. Ao exame histopatológico não foram observadas
38 lesões características da toxoplasmose nos órgãos examinados. Quanto às cinco placentas
39 observaram-se lesões compatíveis com a toxoplasmose como infiltrado inflamatório não
40 supurativo, múltiplos focos de necrose e mineralização, além da presença de cistos teciduais.
41 Esse estudo comprova o envolvimento de *T. gondii* em fetos abortados e em placentas de
42 ovinos naturalmente infectados no Brasil; esses dados não haviam sido descritos
43 anteriormente na literatura nacional.

44

45 **TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Diagnóstico molecular, toxoplasmose, tecido fetal, placenta.

46

47 **INTRODUÇÃO**

48

49 Em ovinos, *Toxoplasma gondii* é descrito como um dos principais responsáveis por problemas
50 reprodutivos em rebanhos no mundo (Dubey 1986). O aborto, de forma geral, configura-se
51 como uma importante falha reprodutiva capaz de gerar consideráveis perdas econômicas
52 (Silva & Silva 1988, Buxton et al. 2007). O diagnóstico laboratorial da infecção é de grande
53 importância pelo fato de as falhas reprodutivas serem consequência de diversas outras
54 doenças infecciosas (Vidotto 1992, Amato Neto et al. 1995).

55 Em fêmeas prenhes, durante a infecção aguda, há invasão da placenta com presença de
56 taquizoítos livres e no interior dos trofoblastos, resultando em focos de necrose e
57 mineralização na placenta. Pode haver infecção via transplacentária do feto e o aborto pode
58 ocorrer com ou sem invasão fetal (Jones et al. 2000). Em fêmeas com até 90 dias de gestação,
59 a infecção é responsável pela ocorrência de morte embrionária, mumificação, aborto,
60 natimortalidade e morte neonatal (Dubey & Towle 1986, Barberan & Marco 1997).

61 O diagnóstico da toxoplasmose congênita pode ser feito pela identificação do agente
62 em cortes histológicos e reação da cadeia de polimerase (PCR), utilizando-se fetos abortados
63 e placentas (Pereira-Bueno et al. 2004). O isolamento do parasito em tecidos infectados (fetos
64 e membranas fetais) pode ser realizado por meio da inoculação em camundongos, contudo,
65 este processo geralmente é lento e dispendioso (OIE 2004).

66 Diversos estudos demonstraram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos
67 específicos de DNA a partir de tecidos de fetos abortados e placentas (Duncanson et al., 2001;
68 Terry et al., 2001; Masala et al., 2003; Pereira-Bueno et al., 2004).

69 O objetivo deste trabalho foi estudar a participação de *T. gondii* em falhas reprodutivas
70 através da PCR *nested* e exame histopatológico de fetos e placentas em casos naturais de
71 abortos em ovinos no estado de Pernambuco, Brasil.

72

73

MATERIAL E MÉTODOS

74

75 Foram colhidos 245 órgãos de fetos e 28 placentas de 35 abortos e natimortos procedentes de
76 ovelhas criadas em propriedades no Estado de Pernambuco, Brasil. Os fetos e placentas foram
77 obtidos de casos naturais de abortos encaminhados ao Laboratório de Doenças Infecciosas da
78 Universidade Federal Rural de Pernambuco.

79 Os procedimentos de necropsia dos fetos e coleta de material foram realizados de
80 acordo com Perez et al. (2003). À necropsia foram anotadas as alterações macroscópicas
81 como variações de cor dos tecidos, inflamação, presença de focos de necrose nos cotilédones
82 e fígado fetal, presença de exsudato e edema. Posteriormente foram coletados fragmentos de
83 cérebro, cerebelo, medula, pulmão, coração, baço, fígado e placenta para realização do PCR
84 *nested* e histopatológico.

85 As amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10%.
86 Posteriormente, o material foi recortado e submetido à técnica rotineira de desidratação,
87 diafanização e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo a 4µm, as
88 lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina e montadas (Prophet et al. 1992). Os achados
89 histológicos foram classificados em ausentes, lesões não relacionadas, consistentes ou
90 características da toxoplasmose.

91 Todas as amostras de tecido fetal e placentário foram submetidas à extração de DNA
92 com o kit comercial “Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen®, Hilden -
93 Alemanha), utilizando-se o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi analisado e

94 quantificado em gel de agarose a 0,8% com marcador de peso molecular 100pb, corado com
95 brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

96 Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um
97 volume final de 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico, 10µM de cada iniciador, 2,75µL
98 de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega) de acordo
99 com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foi feito em
100 termociclador MJ-96G (Biocycle Co. Ltd, Hangzhou - China) e seguido de acordo com o
101 protocolo descrito em Spalding et al. (2006).

102 Todas as amostras negativas e controles foram submetidos a PCR *nested*, utilizando
103 1µL do produto do PCR simples e adicionado à mistura de reação em um volume final de
104 12,5µL contendo 10µM de cada iniciador, 4,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de
105 MasterMix de acordo com o protocolo do fornecedor. O ciclo das reações consistiu de uma
106 desnaturação do DNA inicial a 95°C (4minutos) e seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto
107 para a desnaturação, 62°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a
108 extensão e um período de extensão final de 10 minutos a 72°C.

109 Os pares de iniciadores utilizados são fragmentos da seqüência do gene *BI*. Para a
110 primeira amplificação, foram utilizados TOXO-C1/TOXO-N1, amplificado em 197pb. E para
111 a segunda amplificação foram utilizados TOXO-C2/TOXO-N2, amplificado em 97pb (Burg
112 et al. 1989, Spalding et al. 2006).

113 O controle positivo foi feito utilizando-se suspensão de lavados intra-peritoneal de
114 camundongos previamente infectados com taquizoítos da cepa RH na concentração
115 10^4 taquizoítos/mL para posterior extração do DNA parasitário. Os produtos amplificados
116 foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e
117 visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. Para confirmação da identidade
118 dos fragmentos amplificados foi utilizado o sequenciamento de DNA. Os fragmentos de DNA
119 analisados apresentaram valores de similaridade e identidade com as seqüências já existentes
120 no GenBank que variaram de 93 a 99% com $E = 1e^{-100}$.

121 Para o estudo de concordância entre os testes de diagnóstico utilizou-se o coeficiente
122 Kappa (K) e a interpretação convencional dos valores K adotadas foram: 0,00 - 0,20 =
123 concordância fraca, 0,21 - 0,40 = regular, 0,41 - 0,60 = moderada, 0,61 - 0,80 = boa, 0,81-
124 1,00 = muito boa e valores negativos foram interpretados como equivalentes a 0,00 (Landis &
125 Koch 1977).

126

127

RESULTADOS

128

129

130 Através da PCR *nested* foram confirmados três abortos e dois natimortos, 5/35 (14,3%)
131 positivos para *T. gondii*. Destes cinco animais foi detectado o parasito em todos os órgãos
132 fetais e placentário com porcentagens variadas entre 100% nos corações fetais e placentas,
133 80% no baço, cérebro, fígado e pulmão e 60% no cerebelo e medula, perfazendo um total de
134 32/40 (80%) dos tecidos positivos. Os 30/35 (85,7%) fetos e natimortos restantes foram
135 negativos nas duas técnicas.

136 Ao exame macroscópico, a aparência dos fetos e natimortos foi classificada de acordo
137 com o estado de conservação, sendo 10/35 (28,6%) considerados frescos e 25/35 (71,4%)
138 autolisados. Ao analisar apenas os cinco fetos positivos na PCR *nested* observaram-se 3/5
139 (60%) frescos e 2/5 (40%) autolisados. Não se observou nenhum achado macroscópico
140 característico da toxoplasmose nos órgãos, sendo estes considerados inespecíficos como
141 autólise em 42,3% dos órgãos, edema pulmonar em 10%, áreas de hemorragia no coração e
142 cérebro em 6,7%. Quanto às cinco placentas pertencentes aos fetos positivos no exame
143 molecular, observaram-se lesões características da toxoplasmose como infiltrado de células
144 mononucleares, múltiplos focos de necrose e mineralização, além da presença de cistos nos
145 cotilédones.

146 A concordância entre a positividade da PCR *nested* e exame histopatológico no
147 diagnóstico da toxoplasmose congênita nos órgãos e placentas foi de $K=0,07$, resultando em
148 uma concordância fraca com sensibilidade de 15,6% e especificidade de 100% (Tabela 1).

149

DISCUSSÃO

150

151 Os problemas reprodutivos, especialmente os abortos e natimortos são os mais descritos
152 associados à toxoplasmose congênita em ovinos no mundo (Weissmann 2003). No Brasil, não
153 existem dados sobre a participação de *T. gondii* em abortos e natimortos na espécie ovina,
154 sendo esse até o momento, o estudo que utilizou maior número de amostras teciduais em
155 casos naturais de abortos. Nesse estudo observou-se uma frequência de 14,3% de abortos
156 associados à infecção por *T. gondii*. Este valor encontra-se dentro do limite de variação da
157 frequência observada em outros países. A menor percentagem encontrada foi 10,6% relatada
158 por Steuber et al. (1995) na Alemanha. Masala et al. (2003 e 2007) encontraram na Itália
159 11,1% e 18,1%, respectivamente. Nos USA foi relatado em 17,5% dos casos de abortos
160 (Dubey & Kirkbride 1990). Já na Espanha já foi registrado em 16,9% (Hurtado et al. 2001) e
161

162 23,1% por Pereira-Bueno et al. (2004). Essa variação nas frequências observadas nos
163 diferentes países pode ocorrer devido à utilização de diferentes técnicas de diagnóstico
164 utilizada. À semelhança dos resultados obtidos por Pereira-Bueno (2004), os abortos
165 ocorreram geralmente na metade final da gestação.

166 A utilização de técnicas que detectam ou isolam o parasito no tecido fetal ou
167 placentário confirmam a causa do aborto por *T. gondii* (Owen et al. 1998a, Hurtado et al.
168 2001, Masala et al. 2003). Quando da comparação entre o PCR *nested* e o exame
169 histopatológico, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram fraca concordância entre os
170 resultados obtidos nas duas técnicas avaliadas pelo índice kappa ($K= 0,07$). Estes resultados
171 diferem daqueles descritos anteriormente por Pereira-Bueno et al. (2004) que estudaram
172 tecidos de fetos ovinos abortados na Espanha e encontraram boa correlação entre PCR *nested*
173 e exame histopatológico. Já Hurtado et al. (2001) demonstraram que a PCR *nested* pode ser
174 mais sensível e específica no diagnóstico da toxoplasmose congênita em ovinos, concordando
175 com os resultados do presente estudo. Ainda, de acordo com Pereira-Bueno (2004), o número
176 de estudos envolvendo a PCR no diagnóstico da toxoplasmose congênita ainda é reduzido.
177 Dessa forma ainda são necessárias investigações nesse sentido para ampliar as possibilidades
178 de realizar o correto diagnóstico da etiologia do aborto na espécie ovina.

179 Nesse estudo, a PCR *nested* foi hábil em detectar o DNA parasitário em 80% dos
180 tecidos fetais e placentários pertencentes aos cinco casos de abortos confirmados. Estes
181 resultados são superiores aos descritos por Hurtado et al. (2001) e Pereira-Bueno et al. (2004)
182 que relataram um aspecto negativo associado à PCR e ao exame histopatológico devido à
183 pobre distribuição do parasito nos tecidos fetais, especialmente quando o cérebro é utilizado
184 para diagnóstico. Aqui todos os órgãos examinados tiveram percentagem de 60 a 100% de
185 positividade, destacando o coração e a placenta como os tecidos de predileção. Geralmente a
186 musculatura (Masala et al. 2003), cérebro e pulmão (Hurtado et al. 2001) são órgãos indicados
187 para o diagnóstico, contudo, vários estudos vêm demonstrando o potencial da placenta como
188 material de eleição (Owen et al. 1998ab, Hurtado et al. 2001, Masala et al. 2003, Pereira-
189 Bueno et al. 2004). Nesse estudo, 100% das placentas pertencentes aos 5/35 animais positivos
190 na PCR *nested* também foram positivas no exame histopatológico através da presença de
191 cistos e nesse caso a concordância foi de 100% entre as técnicas utilizadas no diagnóstico.

192 Existe concordância entre diversos estudos no que diz respeito aos tecidos fetais e
193 placentários como sendo os materiais de eleição para a técnica de PCR. Spalding et al. (2002)
194 testaram a técnica de PCR em amostras de sangue e placenta humana e Masala et al. (2003)
195 em fetos e placentas de ovinos para diagnosticar a toxoplasmose congênita. Relataram que o

196 tecido placentário é um excelente material para diagnóstico da toxoplasmose congênita,
197 diferentemente da sorologia fetal que pode detectar anticorpos maternos através da ingestão
198 do colostro resultando em falso-positivo. Em outro estudo, Owen et al. (1998b) também
199 confirmaram que nas placentas foram encontrados maior número do parasito.

200 Ao exame macroscópico, a aparência dos fetos foi classificada de acordo com o estado
201 de conservação, sendo observado que 71,45% deles estavam autolisados. Esta frequência se
202 aproxima daquela relatada por Engeland et al. (1998) que examinaram abortos em caprinos na
203 Noruega e relataram que 65% estavam autolisados. No entanto, a autólise observada na
204 maioria dos animais examinados neste trabalho deve ser atribuída à demora na colheita e
205 envio ao laboratório e má conservação dos fetos. Este é um fator limitante no diagnóstico por
206 meio do exame histopatológico, podendo atribuir a este fator a baixa sensibilidade dessa
207 técnica nesse estudo, onde das amostras que foram positivas na PCR *nested*, 27 amostras
208 (67,5%) não foram detectadas no exame histopatológico.

209 A transmissão vertical de *T. gondii* em ovinos ainda tem aspectos a ser investigados e
210 a técnica de PCR está sendo muito útil em estudos desta natureza (Williams et al. 2005, Hide
211 et al. 2009). Esse estudo comprova o envolvimento de *T. gondii* em fetos abortados e em
212 placentas de ovinos naturalmente infectados no Brasil; esses dados não haviam sido descritos
213 anteriormente na literatura nacional.

214

215 **Agradecimentos** - Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento
216 Científico e Tecnológico (CNPq) sob Processo no. 472459/2008-2.

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

REFERÊNCIAS

- 230
231
- 232 Amato Neto, V., Campos, R., Barazzi, R.G., Duarte, M.I.S., 1995. Toxoplasmose. Editora
233 Salvier, São Paulo: 4^a ed., 154p.
234
- 235 Barberan, M., Marco, J.C., 1997. Patogenia, cuadro clinico y lesional-Toxoplasmosis. Revista
236 Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina, Madrid. 52, 35-49.
237
- 238 Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P., Boothoyd, J.C. Direct and sensitive detection of
239 pathogenic protozoan. 1989. *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin.
240 Microbiol. 27, 1787-1792.
241
- 242 Buxton, D., Maley, W.S., Eright, S. E., Rodger, S., Bartley, P., Innes, E.A., 2007. *Toxoplasma*
243 *gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. Vet. Parasitol. 149, 25-28.
244
- 245 Dubey, J.P., Kirkbride, C.A., 1990. Toxoplasmosis and other causes of abortions in sheep
246 from the north central United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196, 287–290.
247
- 248 Dubey, J.P., Towle, A., 1986. Toxoplasmosis in Sheep: A Review and Annotated
249 Bibliography. Commonwealth Institute of Parasitology, St. Alberts, Herts, UK, pp. 1–152.
250
- 251 Dubey, J. P., 1986. A review of toxoplasmosis in cattle. Vet. Parasitol., 22, 177-202.
252
- 253 Duncanson, P., Terry, R. S., Smith, J. E., Hide, G., 2001. High levels of congenital
254 transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. Int. J. Parasitology 31,
255 1699-1703.
256
- 257 Engeland, I.V.O., Waldeland, H., Andresen, O., Loken, T., Björkman, C., Bjerkas, I., 1998.
258 Foetal loss in dairy goats: an epidemiological study in 22 herds. Small Ruminant
259 Research, 30 :37-48.
260
- 261 Hide, G., Morley, E. K., Hughes, J. M., Gerwash, O., Elmahaishi, M. S., Elmahaishi, K. H.,
262 Thomasson, D., Wright, E. A., Williams, R. H., Murphy, R. G., Smith, J. E., 2009.

- 263 Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. Parasitology, 136,
264 1877-1885.
265
- 266 Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Barandika, J., García-Pérez, A. L., 2001. Single tube
267 nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted
268 ewes. Vet. Parasitology, 102, 17-27.
269
- 270 Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W. Patologia Veterinária. 6^a. ed. São Paulo: Ed. Manole.
271 2000. 1415 p.
272
- 273 Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data.
274 Biometrics, 33,159-174.
275
- 276 Masala, G., Porcu, R., Madau, L., Tanda, A., Ibba, B., Satta, G., Tola, S., 2003. Survey of
277 ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. Vet.
278 Parasitol., 117,15-21.
279
- 280 Masala, G., Porcu, R., Daga, C., Denti, S., Canu, G., Patta, C., Tola, S., 2007. Detection of
281 pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. J. Vet.
282 Diagn. Invest. 19, 96–98.
283
- 284 OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (Organização Mundial de Saúde
285 Animal). Toxoplasmosis. Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines. 4^a. ed.,
286 2004.
287
- 288 Owen, M.R., Clarkson, M.J., Trees, A.J., 1998a. Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by
289 polymerase chain reaction. Vet. Rec. 142, 445-448.
290
- 291 Owen, M.R., Clarkson, M.J., Trees, A.J., 1998b. Acute phase toxoplasma abortions in sheep.
292 Vet. Rec. 142, 480-482.
293
- 294 Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozaolo, A., Perez-Perez, V., Alvarez-Garcia, G., Collantes-
295 Fernandez, E., Ortega-Mora, L.M., 2004. Evaluation of ovine abortion associated with

- 296 *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. Vet. Parasitol., 121, 33-
297 43.
298
- 299 Pérez, A.L.G., Moreno, B., Aduriz, G., 2003. Necropsia y toma de muestras de abortos
300 ovinos. Revista Ovis: Tratado de Patología y Producción Ovina, n.86, p.65-76.
301
- 302 Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H., 1992. Laboratory Methods in
303 Histotechnology. Washington, American Registry of Pathology.
304
- 305 Silva, M.U.D., Silva, E.D.F., 1988. Possíveis causas de aborto em caprinos. Diagnóstico,
306 tratamento, Profilaxia. Comunicado Técnico EMBRAPA, n.12, 11p.
307
- 308 Spalding, S. M., Amendoeira, M. R. R., Coelho, J. M. C., Angel, S. O., 2002. Otimização da
309 reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e
310 placenta de gestantes. J. Bras. Pat. Med. Lab., 38, 105-110.
311
- 312 Spalding, S. M., Angel, S. O., Amendoeira, M. R. R., 2006. Toxoplasmose. In: Rossetti, M.
313 L, Silva, C. M. D., Rodrigues, J. J. S. (eds.), Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular
314 (Brasil, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), 102-111.
315
- 316 Steuber, S., Niu, A., Bauer, C., Reetz, J., Roth, A., Janitschke, K., 1995. Der Nachweis von
317 *Toxoplasma gondii* in Abortgeweben vom Schaf mittels der Polymerase-Kettenreaktion.
318 Dtsch. Tierarztl. Wschr. 102, 91-93.
319
- 320 Terry, R.S., Smith, J.E., Duncanson, P., Hide, G., 2001. MGE-PCR: a novel approach to the
321 analysis of *Toxoplasma gondii* strain differentiation using mobile genetic elements. Int. J.
322 Parasitol., 31,155-61.
323
- 324 Vidotto, O., 1992. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal.
325 Semina: Clín. Agrária,13,69-75.
326

327 Weissmann, J., 2003. Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. *Canad. Vet. J.*
328 *Rev.*, 44, 322-324.

329

330 Williams, R.H., Morley, E.K., Hughes, J.M., Duncanson, P., Terry, R.S., Smith, J.E., Hide,
331 G., 2005. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and
332 cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine
333 hosts. *Parasitology* 130, 301–307.

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357 **Tabela 1** - Resultados comparativo da técnica histopatológico em relação a PCR *nested* em 40 amostras (35
 358 fetos e 5 placentas) dos 5 casos confirmados para *T. gondii*.

		PCR <i>nested</i>		
		Pos.	Neg.	Total
Histopatológico	Pos.	5 (12,5%)	0 (0%)	5 (12,5%)
	Neg.	27 (67,5%)	8 (20%)	35 (87,5%)
	Total	32 (80%)	8 (20%)	40 (100%)

359

360 Pos.: Número de amostras positivas; Neg.: Número de amostras negativas



ISSN 0100-736X *versión impresa*
ISSN 1678-5150 *versión online*

Objetivo e política editorial

O objetivo da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira** é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve porém conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência em Word 7.0), ao editor da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**, no endereço abaixo. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, os editores, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em **Título, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinações destes três últimos), **Agradecimentos e Referências**:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) um **Abstract**, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;

c) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, **Resumo** e **Abstract** trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

d) a **Introdução** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do trabalho;

e) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

f) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na **Discussão** os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

h) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

i) os **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

j) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; Resumo e *Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da 1ª página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não

publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As **figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os **quadros** deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo abordou alguns aspectos epidemiológicos de transmissão de *Toxoplasma gondii*, além do diagnóstico da toxoplasmose adquirida na espécie ovina. Os resultados obtidos confirmam a eliminação de taquizoítos de *T. gondii* na infecção natural em reprodutores e comprova a infecção venérea por este parasito em ovelhas experimentalmente inoculadas via sêmen contaminado. A partir desses resultados até então inéditos na literatura mundial, levanta-se uma discussão sobre a participação dessa via na transmissão de *T. gondii* nessa espécie.

A utilização de técnicas de biologia molecular nesse estudo proporcionou com eficiência o diagnóstico da parasitemia na infecção experimental, além da detecção do parasito em tecidos fetais e placenta em casos naturais de abortos por *T. gondii* no estado de Pernambuco, Brasil, contribuindo desta forma para a inclusão desse parasito como importante agente envolvido nos distúrbios reprodutivos nessa espécie.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, principalmente no que se refere à infecção das ovelhas via sêmen, espera-se estimular a realização de outros estudos, envolvendo esse parasito. Sugere-se a utilização de machos experimental ou naturalmente infectados em experimentos com monta natural nas diferentes fases da infecção (aguda e crônica), para se avaliar a real importância dessa via na transmissão de *T. gondii*.

Espera-se, contudo que esse estudo tenha contribuído para o estudo da transmissão e diagnóstico do *T. gondii* e dessa forma preencha algumas lacunas ainda existentes no estudo da toxoplasmose ovina.

ANEXO A

Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRPE)

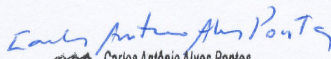


UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

LICENÇA PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISALicença nº: 021/2009Protocolo nº: 23082.008731/2009Nome do Solicitante: Rinaldo Aparecido MotaInstituição do Solicitante: UFRPETítulo do projeto: Aspectos clínicos, epidemiológicos e reprodutivos da infecção experimental em ovinos pelo *Toxoplasma gondii*

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS concede licença para uso de animais em pesquisa para o projeto acima referenciado uma vez que atende às normas éticas de uso de animais, conforme estabelecidas na legislação vigente e no regimento interno da CEUA-UFRPE, de acordo com a Resolução 269/2007 do CEPE-UFRPE, tendo a presente licença validade de dois anos a partir da data de sua expedição. O projeto foi recebido no dia 03/03/2009 e aprovado com modificações na reunião extraordinária do dia 25/05/2009.

Recife, 19 de Junho de 2009.


Carlos Antônio Alves Pontes
Presidente
CEUA - UFRPE

