

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

LUCIANA AFONSO GUIMARÃES

**SOROPREVALENCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO
ASSOCIADOS A PROTOZOÁRIOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM
CAPRINOS E DETECÇÃO MOLECULAR DE *T. gondii* EM CODORNAS NO
ESTADO DA BAHIA**

**ILHÉUS – BAHIA
2018**

LUCIANA AFONSO GUIMARÃES

**SOROPREVALENCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO
ASSOCIADOS A PROTOZOÁRIOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM
CAPRINOS E DETECÇÃO MOLECULAR DE *T. gondii* EM CODORNAS NO
ESTADO DA BAHIA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como exigência para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. George Rego Albuquerque

Coorientação: Prof^a. Dra. Daniele de Santana Rocha

**ILHÉUS – BAHIA
2018**

G963 Guimarães, Luciana Afonso.
Soroprevalência e identificação de fatores de risco associados a protozoários da família sarcocystidae em caprinos e detecção molecular de *T. gondii* em codornas no estado da Bahia / Luciana Afonso Guimarães. – Ilhéus : UESC, 2018.
94f. : il. Anexos.
Orientador : George Rego Albuquerque.
Co-orientador : Daniele de Santana Rocha.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz.
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Inclui referências.

1. Caprino – Criação – Bahia. 2. Codorna – Criação – Bahia.
3. Parasitas. I. Albuquerque, George Rego. II. Rocha, Daniele de Santana. III. Título.

CDD – 636.39

LUCIANA AFONSO GUIMARÃES

**SOROPREVALENCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO
ASSOCIADOS A PROTOZOÁRIOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM
CAPRINOS E DETECÇÃO MOLECULAR DE *T. gondii* EM CODORNAS NO
ESTADO DA BAHIA**

Ilhéus – BA, 25/05/2018

George Rego Albuquerque – DSc
UESC - Orientador

Daniele de Santana Rocha - DSc
UESC – Coorientadora

Renata Santiago Alberto Carlos – DSc
UESC

Rodrigo Alves Bezerra – DSc
Faculdade de Ilhéus - CESUPI

Aristeu Vieira da Silva - DSc
UEFS

**ILHÉUS – BAHIA
2018**

DEDICATÓRIA

A MEU PAI, por estar ao meu lado em todos os momentos, mesmo quando nos deixou fisicamente de uma forma tão inesperada, pela educação, pelo amor, pelos ensinamentos, pela compreensão e dedicação, pelo sacrifício, pelas lembranças, cobranças e incentivo e principalmente pelo exemplo proporcionado, por me transmitir sempre a força, a confiança e a disposição necessárias para vencer os obstáculos da vida, visto que em momentos críticos mostrou de que vale a perseverança e a fé em Deus. Sinto a tua presença e a tua força aqui comigo, é ela que faz seguir em frente diante de tantos entraves encontrados. Te amarei pra sempre! OBRIGADA MEU PAI!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.

Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Apreendi no decorrer da minha vida e principalmente por meu pai, que não conseguiremos realizar nada se estivermos sozinhos, assim, essa parte da tese seria a que ocuparia maior espaço pois mostra que unindo forças somos capazes de superar qualquer obstáculo e crescer sempre. Se realmente colocasse os nomes de todos que me ajudaram seriam inúmeras páginas...

À Deus, Nosso Senhor, sempre presente, iluminando e guiando-me, em tudo. Dando-me forças para chegar com sabedoria e disposição à conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Zildo Guimarães Junior (*in memoriam*) e Cátia Regina Afonso Guimarães, responsáveis pela minha existência, pessoas mais importantes da minha vida, exemplos de dedicação, honestidade, força e perseverança, verdadeiros exemplos para a minha fortaleza, minha base, meu esteio, meu TUDO! Agradeço por proporcionarem o que eu necessitei. Por fazerem o que sou hoje. Pela força para seguir em frente mesmo na hora em que o coração apertou e as lágrimas escorreram pelos olhos. Não conseguiria realizar meus objetivos sem o apoio de vocês. Muito Obrigado!

Aos meus irmãos, Zildo Guimarães Neto e Leandro Afonso Guimarães, verdadeiros arrimos às minhas decisões, além da torcida pelo meu sucesso, por compartilharem momentos inesquecíveis e alegrarem minha vida a todo instante, pelo companheirismo, pelo amor e apoio em todas as horas, dignidade, respeito e exemplos de luta, trabalho, amor e fé.

A minha sobrinha, Laura Lavinsky Guimarães que chegou provando que temos que ter força para seguir em frente e enfrentar os obstáculos que a vida nos mostra.

A todos os meus familiares que acompanharam os meus passos mesmo estando longe, avós, tios, primos. Em especial a minha madrinha Izolda Nunes Guimarães pelo exemplo de força e superação a quem sempre me orgulho. Agradeço MUITO o apoio de todos vocês.

Ao meu namorado Pablo Nascimento e toda a sua família, que nunca mediram esforços na concretização desse trabalho. Obrigado pelo apoio, carinho, dedicação, estímulo, amor, empenho e força.

A meu orientador Professor Dr George Rego Albuquerque, por aceitar me orientar, pela confiança, atenção, paciência, pressão, pelo astral, pelo incentivo e dedicação com que transmitiu seus conhecimentos. A ele meu “muito obrigada”.

A meu braço direito, amiga e coorientadora Daniele de Santana Rocha, grande colaboradora. Que por muitas vezes me socorreu, fortalecendo-me sempre com iniciativa, determinação, otimismo, alegria. Sempre ao meu lado. Valeu! Obrigado pela companhia, força, ensinamento e carinho. Minha eterna gratidão!

Aos diversos professores do programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz, principalmente a Dr. Alexandre Dias Munhoz, Dr. Bianca Mendes Maciel e Dr. Amauri Arias Wenceslau, grata pelos ensinamentos, paciência e compreensão.

Ao Prof. Jurandir Ferreira Cruz junto com a UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pelo fornecimento dos dados através da PROCRIAR, e também a Dalmar Dutra Santos e Alexandre Soares Andrade pela disponibilidade e apoio nas coletas.

Aos meus amigos do “coração” e aos amigos “acadêmicos”, por fazerem parte da minha vida e por não me permitirem desanimar. Pois amigos são nossos irmãos que a vida nos deu e o coração escolheu.

As bolsistas de Iniciação Científica, Camila Albano, Cassia Ribeiro, Jamile Carvalho, Mariana Guimarães Nilsson, por toda ajuda, disponibilidade e dedicação com esse trabalho.

Aos meus colegas de doutorado os quais se tornaram grandes parceiros: Gideão Galvão, Hellen Ferraz, Graziela Deiró, Pedro Alcântara, Luana Karla Nogueira, Tatiani Harvey, Josiane Rocha, Luciana Carvalho, Gabriela Mota.

Obrigado pelo apoio, incentivo, conversas, coletas, companheirismo... Enfim, por me ajudarem, vocês fazem parte desta vitória.

Aos funcionários e técnicos do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz, pelo apoio, carinho e paciência.

A todos os colegas, bolsistas, estagiários, funcionários, técnicos que anônimamente ajudaram que este trabalho fosse concluído, meus sinceros agradecimentos.

Aos fornecedores de material para o projeto como proprietários das fazendas estudadas, Sr. Antonio Carlos pelo fornecimento dos tecidos das codornas, BabyBode e ao Sr. "Zé do Bode" pela receptividade e fornecimento dos tecidos dos caprinos. Em especial a Sr^a Izamara Matos que nos permitiu a coleta do material. Obrigado por terem acreditado na importância deste projeto e disponibilizado alguns animais para estudo, permitindo a realização das coletas material imprescindível para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a concretização desse trabalho

O meu muito OBRIGADO!

SOROPREVALENCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO ASSOCIADOS A PROTOZOÁRIOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM CAPRINOS E DETECÇÃO MOLECULAR DE *T. gondii* EM CODORNAS NO ESTADO DA BAHIA

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho realizar uma pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em caprinos na mesorregião centro sul baiano através de inquérito soropidemiológico, identificando os principais fatores de risco associados com a infecção destes agentes, utilizando-se a Reação de Imunofluorescência Indireta, bem como isolar *T. gondii* de caprinos oriundos da microrregião de Feira de Santana e também detectar *T. gondii* através de análise molecular em codornas oriundas da microrregião de Ilheus-Itabuna. Foram analisados 553 soros de caprinos provenientes de 25 propriedades, distribuídas em 04 municípios na mesorregião centro sul baiano. Detectou-se uma reatividade de 7,59% (42/553) de *T. gondii*, sendo que 48,83% foram reagentes ao título de 64; 25,58% para o título de 256 e 16,28% para 1024, o maior título observado foi o de 4096 (9,3%). Dez das 25 propriedades avaliadas não apresentaram nenhum animal reagente. Porém, todos os quatro municípios analisados apresentaram pelo menos um animal sororreagente. No modelo de regressão logística foi encontrado faixa etária ($p= 0,03$), sexo ($p=0,03$) e área total da propriedade ($p=0,01$) como fatores de risco associados a infecção por *T. gondii*. Anticorpos contra *N. caninum* foram encontrados em 12 (2,17%) caprinos. O presente estudo investigou pioneiramente a prevalência de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. em caprinos no estado da Bahia, encontrando 44 (7,96%) caprinos soro reagentes. Foi observada associação estatística entre a soropositividade e tamanho do rebanho ($p = 0,03$). Dos tecidos dos caprinos utilizados na inoculação nos camundongos, foi obtida amplificação do DNA de *T. gondii* no coração e cérebro de um (1/13) caprino e no coração de um camundongo inoculado. Dos tecidos (coração e cérebro) de 105 codornas coletadas na microrregião de Ilhéus-Itabuna, quatro (3,81%) amostras, sendo três de coração e uma de cérebro, apresentaram-se positivas para *T. gondii* utilizando

a técnica de PCR em tempo real. Conclui-se que os caprinos e as codornas na Bahia estão expostos à infecção causada por *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp

Palavras-chave: IFI, neosporose, PCR, sarcocistose, toxoplasmose

**SOROPREVALENCE AND IDENTIFICATION OF RISK FACTORS
ASSOCIATED WITH A PROTOZOANS OF THE SARCOCYSTIDAE FAMILY
IN GOATS AND MOLECULAR DETECTION OF *T. gondii* IN QUAILORS IN
THE STATE OF BAHIA**

ABSTRACT

The objective of this work was to carry out a research of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.* In the south central Bahia mesoregion through a seroepidemiological survey identifying the main risk factors associated with the infection of these agents, using the Indirect Immunofluorescence reaction, as well as isolating *T. gondii* from goats from the Feira de Santana microregion and also to detect *T. gondii* through molecular analyzes in quail from the Ilheus-Itabuna microregion. A total of 553 sera of goats from 25 farms were analyzed, distributed in 04 municipalities in the mesoregion of south central Bahia. A positivity of 7.59% (42/553) of *T. gondii* was detected, with 48.83% being titre reagents of 64; 25.58% for the title of 256 and 16.28% for 1024, the highest achieved was 4096 (9.3%). Ten of the 25 evaluated properties did not present any reactive animals. However, all 04 municipalities analyzed had at least one seroreagent animal. In the logistic regression model, age ($p = 0.03$), sex ($p = 0.03$) and total area of the property ($p = 0.01$) were found as risk factors associated with *T. gondii* infection. Antibodies against *N. caninum* were found in 12 (2.17%) goats. The present study investigated the prevalence of anti-*Sarcocystis spp.* antibodies in goats in the state of Bahia, with 44 (7.96%) goats reactive sera. Statistical association was observed between seropositivity and herd size ($p = 0.03$). Amplification of *T. gondii* DNA was found in the heart and brain of one (1/13) goat and in the heart of an inoculated mouse. From the tissues (heart and brain) of 105 quail collected in the Ilhéus-Itabuna microregion, 04 (3.81%) samples, being 03 from the heart and 01 from the brain, were positive for *T. gondii* using the real time PCR technique. It is concluded that goats and quails in Bahia are exposed to infection caused by *T. gondii*, *N. caninum* and *Sarcocystis spp.*

Key words: IFI, neosporosis, PCR, sarcocystosis , toxoplasmosis.

LISTA DE FIGURA

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> (adaptado de Dubey, 1998).....	24
2	Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i> (adaptado de Dubey, 1999).....	34
3	Ciclo de vida de <i>Sarcocystis</i> spp. (Adaptado de Dubey, 2016).....	40
4	Localização da mesorregião Centro-Sul baiano.....	48
5	Localização da microrregião Ilhéus- Itabuna	69

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Soroprevalência de <i>Toxoplasma gondii</i> em caprinos no Brasil.....	28
2	Soroprevalência de <i>Neospora caninum</i> em caprinos no Brasil.....	36
3	Soroprevalência de <i>Neospora caninum</i> em caprinos no Mundo.....	36
4	Detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Neospora caninum</i> e <i>Sarcocystis</i> spp. em caprinos e sua distribuição nos municípios analisados.....	51
5	Análise multivariada para fatores de risco associados à presença de <i>Toxoplasma gondii</i> em rebanhos caprinos do Sudoeste da Bahia	52
6	Análise multivariada para fatores de risco associados à presença de <i>Sarcocystis</i> spp. em rebanhos caprinos do Sudoeste da Bahia	52

LISTA DE ABREVIATÓES

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
HAI	Reações de Hemaglutinação
LAT	Teste de aglutinação em látex
MAD	Método de Aglutinação Direta
MAT	Teste de Aglutinação Modificada
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SNC	Sistema Nervoso Central
SRD	Sem Raça Definida

SUMÁRIO

	Resumo.....	VIII
	Abstract.....	X
	Lista de Figura	XI
	Lista de Tabelas	XII
	Lista de Abreviações.....	XIII
1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	OBJETIVOS	18
2.1.	Geral	18
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1.	A importância da caprinocultura	19
3.2.	A importância da coturnicultura	20
3.3.	<i>Toxoplasma gondii</i>	21
3.3.1.	Histórico de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
3.3.2.	Morfologia e Biologia de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
3.3.3.	Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	24
3.3.4.	Toxoplasmose em caprinos	26
3.3.5.1	Distribuição da Toxoplasmose caprina	27
3.3.5.2.	Fatores de risco associados a Toxoplasmose caprina	29
3.3.5.	Toxoplasmose em codornas	30
3.4.	<i>Neospora caninum</i>	31
3.4.1.	Histórico de <i>Neospora caninum</i>	31
3.4.2.	Morfologia e Biologia de <i>Neospora caninum</i>	33
3.4.3.	Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i>	35
3.4.4.	Neosporose em caprinos	35
3.3.4.1.	Fatores de risco associados a Neosporose caprina	37
3.5.	<i>Sarcocystis</i> spp.....	38
3.5.1.	Histórico de <i>Sarcocystis</i> spp.....	38
3.5.2.	Morfologia e Biologia de <i>Sarcocystis</i> spp.....	39
3.5.3.	Ciclo de vida de <i>Sarcocystis</i> spp.....	39
3.5.4.	Sarcocistose em caprinos	41
3.6	Diagnóstico	42

4.	CAPÍTULO I - SOROPREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO ASSOCIADOS A <i>Toxoplasma gondii</i>, <i>Neospora caninum</i> E <i>Sarcocystis</i> spp. EM REBANHOS CAPRINOS.....	44
4.1.	INTRODUÇÃO.....	45
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4.3.	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.4.	RESULTADOS	51
4.5.	DISCUSSÃO	53
4.6.	CONCLUSÃO.....	56
5.	CAPÍTULO II – ISOLAMENTO DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM CAPRINOS NA BAHIA	57
5.1.	INTRODUÇÃO.....	58
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
5.3.	MATERIAL E MÉTODOS	60
5.4.	RESULTADOS	62
5.5.	DISCUSSÃO	63
5.6.	CONCLUSÃO.....	65
6.	CAPÍTULO III – DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM CODORNAS (<i>Coturnix japonica</i>) NA BAHIA, BRASIL	66
6.1.	INTRODUÇÃO.....	67
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	68
6.3.	MATERIAL E MÉTODOS	69
6.4.	RESULTADOS	72
6.5.	DISCUSSÃO	73
6.6.	CONCLUSÃO.....	75
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
	REFERENCIAS	77
	ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade econômica explorada em todos os continentes, presente em áreas sob as mais diversas características bioclimatológicas. O Nordeste brasileiro tem se destacado na exploração de pequenos ruminantes domésticos, principalmente caprinos, pelo potencial da vegetação natural para a manutenção e sobrevivência dos animais desta espécie. O Brasil conta com rebanho caprino de nove milhões de animais, sendo que 92,7% (sete milhões e 900 mil caprinos), encontram-se na região Nordeste, colocando a Bahia como maior produtor nacional, com 2.742.733 animais (BRASIL, 2016).

Essa atividade é de fundamental importância sócio-econômica para o Nordeste, pois representa uma alternativa na oferta de carne, leite e derivados. Conseqüentemente, a caprinocultura conquista um grande número de pessoas, colaborando de forma significativa para a fixação do homem no campo. Contudo, a produção desses animais ainda apresenta limitações decorrentes de problemas sanitários, nutricionais e manejo inadequado, o que contribui para o aumento da incidência de enfermidades. Nesse contexto, as doenças parasitárias ocupam lugar de destaque, causando sérios problemas para a saúde animal e resultando em elevadas perdas econômicas, em decorrência do déficit no crescimento do animal, perda de peso e problemas reprodutivos.

Protozoários da família Sarcocystidae, que inclui os gêneros *Neospora*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma*, apresentam importância como agentes etiológicos, determinando diferentes enfermidades tanto em animais como em humanos.

A toxoplasmose resulta em significativas perdas animais e econômicas, e também tem implicações para saúde pública, pois é uma importante zoonose. O consumo de carne contaminada é uma importante via de transmissão para seres humanos. Em adultos saudáveis, a enfermidade é normalmente assintomática, mas em mulheres grávidas pode causar danos reprodutivos como abortamento, morte neonatal, hidrocefalia e retardo mental, e em humanos imunocomprometidos lesões no SNC e encefalites.

Clinicamente, a infecção por *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em caprinos é assintomática, porém, cabras podem desenvolver distúrbios reprodutivos, como abortamento, natimortos e nascimentos de indivíduos doentes. Estudos mais aprofundados são necessários no sentido da comprovação de *Sarcocystis* spp. como causa de aborto, já que ainda não há relato de alterações clínicas em caprinos.

A coturnicultura exerce importante papel na avicultura, sendo o setor que obteve maior desenvolvimento nos últimos tempos. Torna-se uma alternativa na produção animal, pela rapidez no retorno de capital, baixo investimento, utilização de pequenas áreas e baixos gastos com mão-de-obra, pois na maioria dos criatórios esses animais ficam soltos no ambiente. Seus principais produtos são a carne de alta qualidade e os ovos cada vez mais apreciados pelos consumidores.

A infecção de *T. gondii* em codornas é geralmente assintomática, porém os animais são considerados eficientes hospedeiros intermediários e bons indicadores de contaminação ambiental já que possuem o hábito de alimentação diretamente no solo. O consumo humano de carne malcozida ou de ovos crus/malcozidos podem representar uma fonte de infecção por protozoários para a população humana.

O crescente interesse pela caprinocultura e cortunicultura no estado da Bahia, e considerando a importância da toxoplasmose, neosporose, e sarcocistose tanto em aspectos econômicos quanto de saúde animal e pública, demonstra a necessidade de estudos que visem identificar os agentes parasitários que comprometem a produtividade dos animais, através de levantamentos epidemiológicos que permitam contribuir para um melhor entendimento da enfermidade, particularmente no que se refere aos fatores de risco relativos às fontes de infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Realizar um estudo sobre a neosporose, sarcocistose e toxoplasmose em caprinos enfatizando o inquérito soropidemiológico dos parasitos e isolamento de *Toxoplasma gondii*, assim como realizar a detecção molecular de *T. gondii* em codornas destinada ao consumo humano na Bahia.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A importância da caprinocultura

A cabra foi o primeiro animal domesticado pelo homem capaz de produzir alimento, leite e carne, há cerca de 6000 anos. Desde então, distribuiu-se pelo mundo, sempre acompanhando a história da humanidade, conforme atestam os diversos relatos históricos, mitológicos e até mesmo bíblicos. Animais de características dócil e de fácil manejo, pouco exigentes em termos alimentares, os caprinos são facilmente adaptáveis a qualquer clima (BRASIL, 2006).

O efetivo caprino brasileiro é de 9.780.533 de cabeças em 2016, com crescimento em relação ao ano de 2015. O Brasil é o 22º criador mundial de caprinos, e o Nordeste a região que abrange 92,7% do rebanho nacional, a Bahia o estado com o maior plantel, com cerca de 3 milhões de indivíduos (IBGE, 2016). A caprinocultura é uma importante fonte de recurso econômico no Brasil, no nordeste estes animais estão concentrados na região semiárida (NOBREGA, 2016).

A criação desses animais tem importância social e econômica regional, dadas as poucas alternativas para o semiárido brasileiro. Devido a grande capacidade de adaptação e resistência à seca, o que os torna uma importante fonte de renda para os produtores baianos, a caprinocultura é reconhecida como uma atividade economicamente viável, sendo responsável por geração de renda, inserção de pequenos produtores e redução do êxodo rural. As condições precárias de manejo sanitário das criações, juntamente a ausência ou uso inadequado de tecnologias de manejo dos rebanhos, constituem as principais causas da baixa produção e da mortalidade desses animais (BRASIL, 2006).

Com o desenvolvimento da caprinocultura, foram criadas normas e diretrizes, na condução das atividades do setor. Em maio de 2004, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou a Instrução Normativa nº 87, que Aprova o regulamento técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos – PNSCO para assegurar à cadeia produtiva

da ovinocaprinocultura, os requisitos de segurança sanitária necessários ao seu acesso aos mercados, bem como a segurança alimentar (BRASIL, 2012).

A grande demanda por carne e leite de cabras nos países em desenvolvimento devido ao crescimento populacional, à urbanização e às mudanças nas preferências alimentares e nos hábitos dos consumidores contribui para o aumento da produção no Brasil. Esses pequenos ruminantes são economicamente importantes nessa região e são uma importante fonte de carne e leite para consumo humano e de renda para os proprietários de terras (MORAES et al., 2011).

3.2. A importância da coturnicultura

A codorna é uma ave originária do norte da África, da Europa e da Ásia. (PINTO et al. 2002). Presume-se que a codorna doméstica teria chegado ao Brasil em 1959. A expansão da comercialização da ave teve início em 1989, na região sul do país quando uma grande empresa avícola resolveu implantar o primeiro criatório comercial de grande escala com a finalidade de exportação de carcaças de codornas congeladas (SILVA et al., 2011).

Segundo dados do IBGE (BRASIL, 2016) o Brasil dispõe atualmente de 15.099.683 codornas, estando a Bahia com cerca de 342 mil aves, ocupando o 9º lugar dentre o ranking nacional. As três principais regiões que mais produzem ovos de codorna no Brasil é a região Sudeste com 77,08% da produção total, seguido pela região Sul com 10,42% e em terceiro lugar a região Nordeste com 9,18% da produção nacional. A produção de ovos de codorna em 2016 foi de 273,3 milhões de dúzias.

A avicultura brasileira é de grande destaque no cenário mundial e seu elevado crescimento contribui significativamente com a geração de emprego e renda, fortalecendo a agropecuária nacional. A coturnicultura é uma ramificação da avicultura, onde codornas são criadas para produção de ovos e/ou carne para abate (PASTORE et al., 2012). Essa atividade tem se expandido bastante, principalmente devido ao seu baixo custo de investimento inicial quando comparada a outros tipos de produção, o que possibilita um

rápido retorno do capital investido (MORI et al., 2005), além da ave apresentar uma precoce maturidade sexual e alta produtividade (MOURA et al., 2008).

3.3. *Toxoplasma gondii*

3.3.1 Histórico de *Toxoplasma gondii*

Em 1908, Nicolle e Manceaux encontraram um protozoário em tecidos de um roedor semelhante ao hamster, o gundi (*Ctenodactylus gundi*), que estava sendo utilizado para pesquisa de leishmaniose no Instituto Pasteur em Tunis. Ambos inicialmente acreditavam que o parasita seria uma forma particular de *Leishmania*, mas logo perceberam que tinham descoberto um novo organismo e o nomearam de *Toxoplasma gondii*, com base na sua morfologia (toxó = arco, plasma = forma) e no hospedeiro encontrado (*Ctenodactylus gundi*). No mesmo ano, Afonso Splendore descobriu o mesmo parasita num coelho em São Paulo, no Brasil (DUBEY, 2008). O ciclo de vida heteroxeno de *T. gondii* foi esclarecido no final dos anos 1960, após ter sido descoberto que as fezes dos gatos poderiam conter um estágio infeccioso deste parasita que induzia uma infecção quando ingeridos por hospedeiros intermediários. Em 1970, foi descoberto os estágios sexuais do ciclo de *T. gondii* no intestino delgado de gatos (DUBEY et al., 1998).

Feldman e Miller (1956) estudando rebanhos caprinos no estado de Nova York, E.U.A. encontraram a primeira ocorrência nesta espécie. Os australianos foram os primeiros a demonstrar a toxoplasmose como uma importante causa para os problemas reprodutivos em caprinos. Entre os animais domésticos, os caprinos, suínos e ovinos são mais suscetíveis (DUBEY; BEATTIE, 1988).

3.3.2 Morfologia e biologia de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório de baixa especificidade, pois, pode infectar animais homeotérmicos, invadindo diferentes tecidos, células nucleadas e líquidos orgânicos (DUBEY, 1996). Existem três

formas de *T. gondii* que são infecciosas para os hospedeiros: taquizoítos em colônias celulares, bradizoítos contidos em cistos teciduais e esporozoítos em oocistos esporulados (DUBEY et al., 1998).

Os gatos eliminam oocistos após ingerirem qualquer uma das três formas infectantes de *T. gondii*. Porém, apenas 50% dos gatos eliminam oocistos junto com as fezes após ingerirem taquizoítos ou oocistos. Enquanto que quase na sua totalidade, ao ingerirem cistos teciduais, liberam oocistos (DUBEY, 1996).

Os taquizoítos tem forma de meia lua, medindo de 4 a 8 μm de comprimento por 2 a 4 μm de diâmetro. Invadem a célula hospedeira por penetração ativa da membrana e torna-se rodeado por um vacúolo parasitóforo, que o protege dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Os taquizoítos são encontrados durante a fase aguda da infecção (denominada forma livre ou proliferativa, é a forma de multiplicação rápida), multiplicam-se assexuadamente por repetidas divisões binárias em processo especializado chamado endodiogenia, repetido até a ruptura da célula hospedeira (DUBEY, 2004).

São sensíveis às condições ambientais, sendo facilmente destruídos pela desidratação e variáveis osmóticas; são também menos resistentes a tripsina ou pepsina e são geralmente mortos rapidamente fora do hospedeiro. Taquizoítos são mortos por pasteurização e aquecimento. Desempenham papel importante na transmissão vertical de *T. gondii* (TENTER et al., 2000). Embora o parasita seja intracelular, os taquizoítos podem sobreviver por breves períodos nos líquidos intersticiais e exsudatos, como saliva, urina e leite de cabras (CHIARI; NEVES, 1984; DUBEY, 2008). Do ponto de vista médico, a fase de taquizoíto é importante, porque o parasito fica vulnerável aos fármacos (DUBEY et al., 2012).

Depois de um número desconhecido de divisões, taquizoítos dão origem a outro estágio chamado de bradizoítos que formarão os cistos teciduais. Cistos crescem e permanecem intracelularmente. Eles variam em tamanho de 5-70 μm e podem conter centenas de bradizoítos (JONES; DUBEY, 2010). São formas de multiplicação lenta, que se multiplicam por endodiogenia. Os

bradizoítos estão presentes em infecções crônicas e são também chamados de cistozoítos (DUBEY, 2008).

Jacobs e colaboradores (1960) forneceram uma primeira caracterização biológica de cistos. Descobriram que a parede do cisto era destruída pela pepsina e tripsina, mas os organismos císticos eram resistentes a digestão pelo suco gástrico, enquanto taquizoítos eram destruídos imediatamente. Embora cistos teciduais possam se desenvolver em diversos órgãos, incluindo pulmões, fígado e rins, eles são mais prevalentes em tecidos musculares e nervosos, incluindo o cérebro, musculatura esquelética e cardíaca. Cistos teciduais podem persistir durante a vida do hospedeiro (DUBEY et al., 1998). Assim, os cistos de tecido mostram-se importantes no ciclo de vida de *T. gondii*, pois hospedeiros carnívoros podem ser infectados pela ingestão de carne contaminada (DUBEY, 2008).

Em animais de produção de carne, cistos teciduais de *T. gondii* são mais frequentemente observados em suínos, ovinos e caprinos e, com menos frequência, em aves de capoeira, bovinos e equinos. Apesar de cistos teciduais serem menos resistentes às condições ambientais do que oocistos, eles são relativamente resistentes a mudanças de temperatura e permanecem infectantes sob refrigeração (1 a 4°C) por até três semanas. Também sobrevivem a temperaturas de congelamento entre -1 e -8°C por mais de uma semana. Porém, a maioria é inativado a temperaturas de -12°C ou menor, por 24 horas e em temperatura de aquecimento à 67°C. Alguns cistos podem permanecer infectantes, se o processo de cozimento usado na carne for de forma desigual, como por exemplo, o uso de microondas (TENTER et al., 2000).

Os oocistos são as formas infectantes provenientes da reprodução sexuada do parasito (gametogonia) no interior das células do epitélio intestinal dos felídeos. São esféricos com aproximadamente 12 µm de diâmetro e são excretados pelas fezes de felídeos (DUBEY et al., 1998). No solo, os oocistos se tornam infectantes por esporulação, em até 21 dias, dependendo da temperatura, umidade e oxigenação. Oocistos esporulados contêm dois esporocistos, que contêm quatro esporozoítos. Podem permanecer viáveis no solo úmido por até 18 meses, visto que possuem uma parede dupla bastante

resistente às condições ambientais, sendo portanto uma forma de resistência e de disseminação ambiental dessa parasitose (TENTER et al., 2000). Os oocistos não são mortos por tratamentos químicos e físicos da água, aplicados atualmente nas estações de tratamento, incluindo a cloração, o tratamento de ozônio e os raios ultravioletas (JONES; DUBEY, 2010).

A eliminação de oocistos junto com as fezes dos felídeos resulta na contaminação de alimentos, água ou ambiente e essa contaminação ambiental é a única fonte de infecção pós natal dos animais herbívoros que ocorrem durante a alimentação (DUBEY et al, 2012).

3.3.3. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii tem ciclo de vida heteroxeno facultativo (figura 1) com duas fases distintas quanto à reprodução: a fase sexuada (gametogonia), que ocorre no intestino dos hospedeiros definitivos (Felídeos), e a fase assexuada que pode ocorrer em qualquer hospedeiro intermediário (DUBEY, 1998).

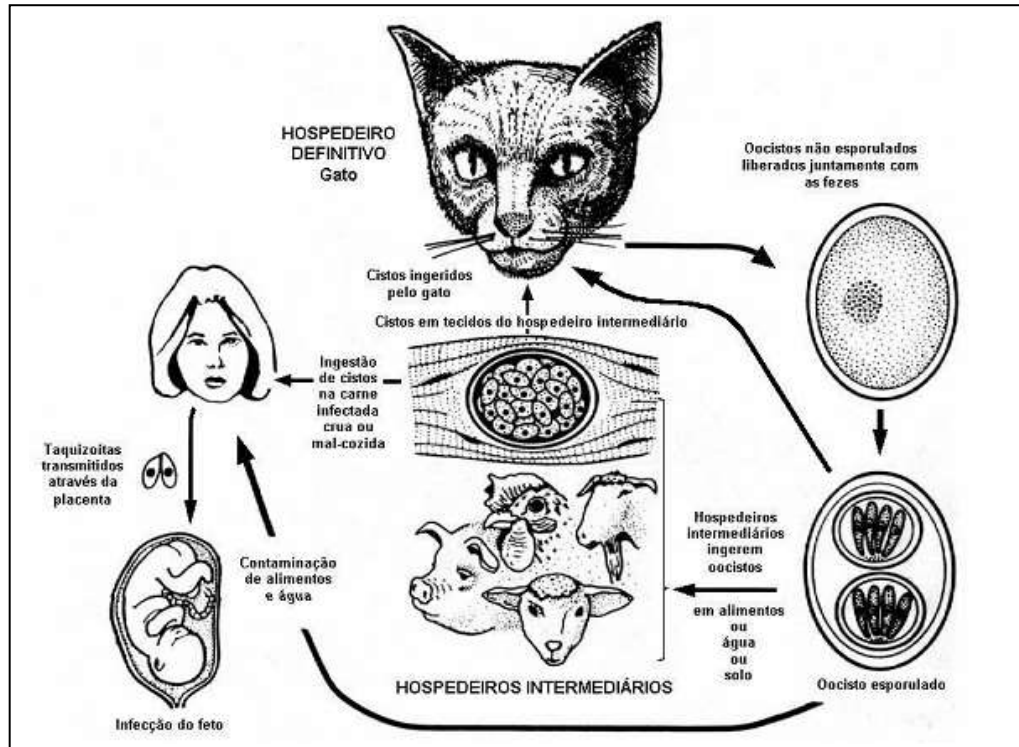


Figura 1. Ciclo de vida de *T. gondii* (modificado de Dubey et al., 1998)

O ciclo sexuado ocorre no intestino delgado dos felídeos. Após uma série de esquizogonias ou merogonias, originando diversos merozoítos, realizam então a gametogonia que darão origem aos gametas masculinos e femininos no intestino delgado dos felídeos. O gameta masculino, denominado microgameta, tem dois flagelos que permitem sua movimentação, nada e penetra no gameta feminino ou macrogameta. Após fecundação, há a formação do zigoto e da parede do oocisto que, ao atingir a maturidade, promove a ruptura das células do epitélio intestinal, liberando então os oocistos para o meio ambiente junto com as fezes (DUBEY et al., 1998).

Felídeos iniciam a eliminação de oocistos dependendo da fase de *T. gondii* ingerido, de três a dez dias após a ingestão de cistos teciduais ou bradizoítos, e, após ingerirem taquizoítos ou oocistos, tem um período pré-patente maior (13 a 18 dias) (DUBEY, 2008). Os felídeos geralmente só eliminam um grande número de oocistos após uma infecção primária por *T. gondii*. A eliminação de oocistos após a reinfecção é rara, assim como a re-eliminação pelo felino. Um único gato pode eliminar mais de 100 milhões de oocistos no ambiente (DUBEY, 2004).

No hospedeiro intermediário, ocorre a fase extra-intestinal, onde *T. gondii* sofre duas fases de desenvolvimento assexuado. Na primeira fase taquizoítos se multiplicam rapidamente por sucessivas endodiogenias, onde o parasito se reproduz dentro dele mesmo gerando duas células filhas, que rompem a célula mãe e se disseminam através do sangue ou linfa pelo organismo do hospedeiro, caracterizando a fase aguda da doença, onde é observada a sintomatologia clínica. Taquizoítos da última geração iniciam a segunda fase de desenvolvimento que resulta na formação de cistos teciduais. Após esse período de intensa multiplicação, o sistema imune atua nesse protozoário e o mesmo se refugia dentro das células, diferenciando-se em bradizoítos. Dentro do cisto tecidual, bradizoítos se multiplicam lentamente por endodiogenia permanecendo em estado de latência (DUBEY et al., 1998).

Após a ingestão pelos gatos, a parede do cisto tecidual é digerida pelas enzimas proteolíticas no estômago e no intestino delgado e os bradizoítos são liberados. Em seguida, alguns penetram a lâmina própria do intestino e se multiplicam em taquizoítos. Dentro de algumas horas, *T. gondii* pode se difundir

para os tecidos extra-intestinais. Os bradizoítos que permanecem nas células epiteliais do intestino delgado iniciam o desenvolvimento de várias gerações de *T. gondii* e depois iniciarão a multiplicação sexuada. Com isso, apenas os felídeos podem exercer o papel de hospedeiros definitivo e intermediário (DUBEY, 2004).

3.3.4. Toxoplasmose em caprinos

Dentre os animais de produção, o caprino juntamente com os suínos e ovinos é um dos que mais comumente apresenta-se com *T. gondii*, (DUBEY, 2010). A toxoplasmose caprina é uma enfermidade parasitária de elevada importância veterinária e de saúde pública, uma vez que acarreta prejuízos aos animais de produção, além de servirem de fonte de infecção para o ser humano (DUBEY, 2008).

A infecção por *T. gondii* nos caprinos ocorre pela ingestão de oocistos esporulados presentes na água, nos alimentos e solo contaminados, através da via transplacentária (DUBEY; BEATTIE, 1988), venérea (MORAES et al., 2011) ou leite (CHIARI; NEVES, 1984). A infecção geralmente é assintomática, embora possa ser detectada febre nos primeiros dias. Abortamentos podem ocorrer em cabras de todas as idades quando a primo-infecção ocorre durante a gestação (MCCOLGAN et al., 1988). Outras desordens reprodutivas, como morte embrionária, reabsorção fetal, mumificação, natimorto e morte neonatal, neonatos fracos, que evoluem para óbito, geram perdas econômicas consideráveis em rebanhos caprinos (DUBEY, 2004).

Depois da infecção da cabra prenhe, os taquizoítos difundem-se pela corrente sanguínea para os cotilédones placentários, causando necrose. Os taquizoítos também acometem o feto, causando necrose em muitos órgãos (DAVIDSON, 2000). Os fetos abortados e natimortos podem apresentar encefalite não supurativa, meningoencefalite e gliose multifocal (lesões consideradas características) além de nefrite e hepatite. Enquanto que na placenta estarão presentes áreas de necrose (PESCADOR et al., 2007). Mas, uma vez infectada, as cabras albergam o parasito por toda a vida, porém,

geralmente não apresentarão abortos reincidentes consequentes à toxoplasmose (MCCOLGAN et al., 1988).

A toxoplasmose aguda adquirida em caprinos surge de uma a três semanas após a contaminação por oocistos. Os animais desenvolvem febre, anorexia, dispnéia, enterite e encefalite. Animais que sobrevivem desenvolvem anticorpos e passam a ter os cistos com bradizoítos na musculatura, caracterizando a fase crônica. Entretanto, fêmeas gestantes podem abortar. As cabras infectadas pela primeira vez durante a gestação, na primeira semana desenvolve-se a parasitemia, em seguida a infecção placentária seguida pela infecção do feto na terceira semana (DUBEY; BEATTIE, 1988). O diagnóstico clínico é bastante complicado, devendo ser confirmado por reações sorológicas e, se possível, pela demonstração e isolamento do parasita (PARK et al., 1993).

Com o aumento da pressão de infecção pela contaminação do ambiente com oocistos, animais mantidos em pastagens, como caprinos, mostram altas prevalências em muitas áreas do mundo. Isto é de particular importância, porque cistos teciduais foram encontrados em muitas partes comestíveis de caprinos, e os pequenos ruminantes são importantes tanto na produção de leite como de carne em todo o mundo (TENTER et al., 2000).

3.3.4.1. Distribuição da toxoplasmose caprina no Brasil

No Brasil (Tabela1), a toxoplasmose caprina foi encontrada numa variação de prevalência de anticorpos anti- *T. gondii* em caprinos de 3,76% no Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2015) até 81,8% em Fernando de Noronha/PE (COSTA et al., 2012) demonstrando a susceptibilidade destes animais como espécie hospedeira do parasito. As variações observadas na soroprevalência podem estar relacionadas a vários fatores epidemiológicos, regionais, aspectos nutricionais, manejo e aos testes sorológicos aplicados na sua determinação (TENTER et al., 2000).

A alta prevalência da toxoplasmose em caprinos pode decorrer da menor resistência desta espécie ao parasito e às próprias condições de exploração, que expõem estes animais à maior probabilidade de contato com os oocistos (LIMA et al., 2008).

Tabela 1. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em caprinos no Brasil

Fonte	Ano	Estado	Método ^a	Ponto de corte	Nº caprinos analisados	% caprinos positivos
Gondim et al.	1999	Bahia	LAT	64	439	28,9
Silva et al.	2002	São Paulo	RIFI	16	100	8
Meireles et al.	2003	São Paulo	Elisa	***	200	17
Uzeda et al.	2004	Bahia	RIFI	16	373	16,35
Araujo Neto et al.	2008	Rio Grande do Norte	RIFI	64	366	30,6
Soares et al.	2010	Maranhão	Elisa	***	92	36,95
Anderlini et al.	2011	Alagoas	RIFI	64	454	39
Bispo et al.	2011	Pernambuco	RIFI	16	164	47,6
Luciano et al.	2011	Rio de Janeiro	RIFI	64	206	29,12
Moraes et al.	2011	Maranhão	RIFI	40	46	4,35
Varaschin et al.	2011	Minas Gerais	RIFI	64	401	21,4
Pereira et al.	2012	Pernambuco	RIFI	64	167	31,7
Santos et al.	2012	Paraíba	RIFI	64	975	18,1
Nunes et al.	2013	Rio Grande do Norte	Elisa	***	338	37
Bezerra et al.	2015	Pernambuco	RIFI	64	248	22,58
Silva et al.	2015	Rio Grande do Norte e Paraíba	RIFI	64	186	3,76
Moura et al.	2016	Santa Catarina	RIFI	64	654	33,02
Nunes et al.	2016	Bahia	Elisa	100	375	25,1
Rego et al.	2016	Piauí	Elisa	100	1341	45,5
Rizzo et al.	2017	Sergipe	RIFI	64	1200	40,1

^aLAT, teste de aglutinação do látex; ELISA, ensaio imunoenzimático; RIFI, reação de imunofluorescência indireta

Fatores como a lotação das pastagens, o genótipo do parasito e do hospedeiro, o período e a duração da infecção antes da gestação são considerados fatores importantes na epidemiologia desta parasitose (SILVA et al., 2003).

3.3.4.2. Fatores de risco associados à toxoplasmose caprina

Alguns estudos vêm sendo realizados na tentativa de encontrar fatores associados à infecção toxoplásmica em caprinos, dentre esses, destacam-se: idade, índice pluviométrico, presença de gatos, alta umidade e a temperaturas amenas nas regiões onde os rebanhos são mantidos. (VAN DER PUJE et al., 2000; MODOLO et al., 2008 ; KAMANI et al.,2010). As temperaturas amenas e a umidade favorecem a esporulação e a sobrevivência dos oocistos. As condições climáticas, em particular chuvas, muitas vezes são responsáveis pelas diferenças na prevalência da infecção por *T. gondii*, uma vez que os oocistos sobrevivem mais tempo em local fresco e em condições úmidas (DUBEY et al., 2012). Gondim e colaboradores (1999) verificaram na Bahia uma maior soropositividade em caprinos da região do Recôncavo, região Litorânea (úmida), em relação à Caatinga (seca).

Os caprinos são animais mais susceptíveis à infecção com *T. gondii* em relação aos outros animais de abate (DUBEY; BEATTIE, 1988). A prevalência de toxoplasmose em caprinos é maior em animais mais velhos, com maior frequência nos rebanhos leiteiros em relação ao de exploração mista, e em sistema de criação intensivo quando comparado com o extensivo (SILVA et al., 2003; RAGOZO et al., 2008; KAMANI et al., 2010). Medeiros e colaboradores (2014) no Rio Grande do Norte e Van der Puje e colaboradores (2000) em Gana, também observaram aumento da prevalência conforme o aumento da idade dos caprinos.

A ausência de suplementação mineral para os animais, provavelmente é um fator de risco para infecção por *T. gondii*, pois está relacionada com a diminuição das defesas imunológicas dos animais suplementados

apresentando maior imunocompetência do que os não suplementados (MORAES et al., 2004).

Moura e colaboradores (2016) analisaram a prevalência de *T. gondii* em Santa Catarina, sul do Brasil, em 654 amostras de soros de caprinos oriundos de 57 municípios, utilizando a RIFI como teste sorológico e ponto de corte de 1:64, foi encontrado 49,9% de soropositividade, e presença de gatos na exploração agrícola, raça e região da propriedade como fatores associados à infecção com *T. gondii*. Dados similares ao encontrado no Estado de São Paulo, por Modolo e colaboradores (2008) que determinaram associação entre idade e presença de gatos e soropositividade.

Silva e colaboradores, (2003), em Pernambuco, examinando 213 amostras de soro de animais, encontraram uma taxa de prevalência de 19,7% de *T. gondii* e 100% das 10 propriedades foram positivas, com associações significativas para sexo, onde fêmeas apresentaram maior soropositividade com relação aos machos, raça (animais mestiços mais soro reagentes), região úmida, tipo de manejo intensivo e de exploração leiteira e falha reprodutiva das cabras. Enquanto que Zhao e colaboradores (2011) observaram maior frequência entre machos na pesquisa realizada na China. O alto percentual (100%) de propriedades com animais positivos está de acordo com os dados obtidos por Anderlini e colaboradores (2011) em Alagoas.

3.3.5 Toxoplasmose em codornas

Alguns animais domésticos são clinicamente resistentes, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, a exemplos de aves, sendo os pássaros mais susceptíveis à infecção do que aves domésticas (DUBEY, 2010; DUBEY et al., 2012).

Entretanto, galinhas, pardais e codornas podem ser sorologicamente negativos apesar de estarem infectadas por *T. gondii* (FRENKEL, 1981).

A toxoplasmose em aves, no Brasil, foi relatada em 1955, em um lote de frangos que tinham de dois a seis meses de idade, com mortalidade de 50% (NOBREGA et al., 1955). Codornas inoculadas com taquizoítos de *T. gondii* apresentaram esplenomegalia, hepatomegalia e hipertrofia pulmonar

(ALBUQUERQUE et al., 2002) como alterações macroscópicas da infecção por *T. gondii*.

Codornas podem desempenhar um papel importante na epidemiologia da toxoplasmose. Essas aves, devido ao seu hábito alimentar, diretamente no solo, favorece sua infecção através da ingestão de oocistos eliminados pelos felinos. Dessa forma, comportam-se como indicadores ambientais do parasito. Através de estudos de prevalência de anticorpos anti-*T.gondii* nesses animais tem-se a relação com a contaminação ambiental (DUBEY et al., 2010).

Alguns estudos (CAMARGO et al., 1995; DUBEY et al., 2003; DUBEY et al., 2006) indicam o papel dessas aves como fonte de infecção direta para humanos, por meio de consumo da carne e/ou ovos contaminados. Apesar dessa espécie também assumir importância significativa no ciclo de vida de *T. gondii*, é considerada, juntamente com outras aves e pequenos roedores, importante fonte de cistos desse protozoário para os gatos domésticos, devido ao hábito predatório desses felinos (DUBEY; FRENKEL, 1998). Os estudos relacionados à infecção de codornas por *T. gondii* ainda são escassos.

3.4. *Neospora caninum*

3.4.1. Histórico

O primeiro registro de neosporose em cães foi um surto em 1957 nos EUA (DUBEY, 2003). Em 1984 na Noruega, Bjerkas, Mohn e Presthus, encontraram em cães da raça Boxer de uma mesma ninhada com sinais neurológicos, cistos teciduais, no cérebro e tecido muscular, semelhantes a *T. gondii*, contudo, no teste sorológico, não foram detectados anticorpos contra este protozoário. Posteriormente, Dubey e colaboradores, (1988) em um estudo retrospectivo, verificaram em cortes histológicos, em 10 cães que apresentavam diagnóstico positivo para toxoplasmose. Entretanto, os parasitos observados na microscopia eletrônica eram estruturalmente diferentes de *T. gondii* sendo estes pertencentes a um novo gênero e espécie denominado *N. caninum*. Assim, através da imunistoquímica (IHQ) específica para *N.*

caninum, Bjerkas e Dubey (1991) confirmaram que os parasitos encontrados na ninhada de cães boxer da Noruega, eram *N. caninum*. No Brasil, o primeiro relato em cães foi realizado em Minas Gerais por Cabral e colaboradores (1999).

3.4.2 Morfologia e biologia de *Neospora caninum*

Embora *N. caninum* e *T. gondii* sejam parasitas intimamente relacionados estruturalmente, geneticamente e imunologicamente, deve-se ter cuidado ao generalizar tais protozoários, porque a neosporose e toxoplasmose são doenças biologicamente distintas. *Toxoplasma gondii* é uma das principais doenças de ovino, caprinos e humanos e nem tanto de bovinos, em contra partida, a neosporose é doença importante nos bovinos, e não há evidência de infecção humana. *N. caninum* é o agente responsável pela neosporose, e os hospedeiros definitivos desses parasitas são os canídeos, enquanto que *T. gondii* causa a toxoplasmose, e os felídeos são os hospedeiros definitivos deste agente (DUBEY, 2003).

Neospora caninum, assim como *T. gondii*, possui três formas infectantes: esporozoítos, em oocistos esporulados; taquizoítos e bradizoítos (no interior dos cistos teciduais). Os taquizoítos constituem a forma proliferativa e aguda da doença, são ovóides ou lunar, encontrados nos hospedeiros intermediários, tem aproximadamente 6µm X 2µm e são resultantes da multiplicação assexuada do parasito, por endodiogenia, provocando lise celular e infectando novas células. Pode estar presente em diversos tipos celulares (DUBEY, 2003).

Bradizoítos, encontrados nos cistos teciduais, são caracterizados pela multiplicação lenta e assexuada. Os cistos teciduais, de formato oval chegam até 107µm e podem ser encontrados principalmente no cérebro e na musculatura (DUBEY, 2003).

Os esporozoítos estão presentes no interior dos oocistos e são resultantes da multiplicação sexuada gametogênica que ocorre no epitélio intestinal dos canídeos (DUBEY, 2003). Os oocistos geralmente tem um tamanho de 11,7 x 11,3 µm. Os esporozoítos são alongados e tem geralmente

6,5x2µm, sendo que cada esporocisto contem quatro esporozoítos e um corpo residual. Os oocistos são excretados nas fezes dos canídeos e esporulam no ambiente em até 24 horas. Pouco se sabe sobre a resistência e a frequência de eliminação do oocisto no ambiente, assume-se que seja similar ao de *T. gondii* (DUBEY, 2003).

Os oocistos são a chave na epidemiologia da neosporose. O número de oocistos eliminados geralmente é baixo quando comprado com *T. gondii* (DUBEY, 2003). Os oocistos podem ser eliminados nas fezes de cães por três semanas (AL-MAJALI et al., 2008). *Neospora caninum* pode ser transmitido da mãe para os neonatos durante os estágios terminais da gestação ou pós-natal via leite. Ao contrário do bovino, a transmissão vertical de *N. caninum* em cães é considerada altamente variável e pouco provável de persistir na ausência de infecção horizontal.

Dados de prevalência relacionados com a idade indicam que a maioria dos cães são infectados após o nascimento. Prevalências mais altas foram documentadas em cães mais velhos quando comparados com cães mais jovens. A ingestão de tecidos infectados é a fonte mais provável de infecção para carnívoros. Teoricamente, os tecidos de qualquer animal contendo cistos teciduais podem ser uma fonte de infecção para cães (DUBEY; SCHARES, 2011).

3.4.3. Ciclo biológico

Neospora caninum é um protozoário coccídio intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa. Dentro do gênero *Neospora* foram identificadas duas espécies, a *N. caninum*, na qual o hospedeiro definitivo são os canídeos (DUBEY, 2003) e a *N. hughesi* proposta por Marsh e colaboradores (1998) ser um parasita de equinos, mas com hospedeiro definitivo ainda não identificado.

Seu ciclo de vida (Figura 2) envolve hospedeiros definitivos e intermediários, caracterizando-se, portanto, em um ciclo heteroxeno facultativo, no qual a fase assexuada ocorre no hospedeiro intermediário e a sexuada ocorre no hospedeiro definitivo (DUBEY, 2003).

Como hospedeiros definitivos, já foram confirmados até o momento todos do gênero *Canis* incluindo os cães domésticos (*Canis familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004a), dingos (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e lobo cinza (*Canis lupus lupus*) (DUBEY et al, 2011). Bovinos, ovinos, caprinos, equinos entre outros animais homeotérmicos, podem ser considerados hospedeiros intermediários quando naturalmente infectados (GONDIM, et al. 2004b; LOBATO, 2006). Os caninos também podem desempenhar o papel de hospedeiros intermediários. *Neospora caninum* pode causar doença clínica em cães de todas as idades. A maioria dos casos clínicos de neosporose canina tem sido em cães infectados congenitamente. a maioria dos casos, os cães nascem assintomáticos e começar a desenvolver sinais clínicos três ou mais semanas após nascimento. Nem todos os filhotes na ninhada são afetados (DUBEY, 2003).

O ciclo evolutivo de *N. caninum*, em geral, é muito semelhante ao de *T. gondii*. Desta forma, apresenta três estágios infecciosos: os taquizoítos, em formas de proliferação rápida; os bradizoítos em cistos teciduais e os oocistos. Os taquizoítos e os bradizoítos são estágios intracelulares encontrados no hospedeiro intermediário, enquanto que os esporozoítos se desenvolvem dentro dos oocistos no processo de esporulação (DUBEY et al., 2007).

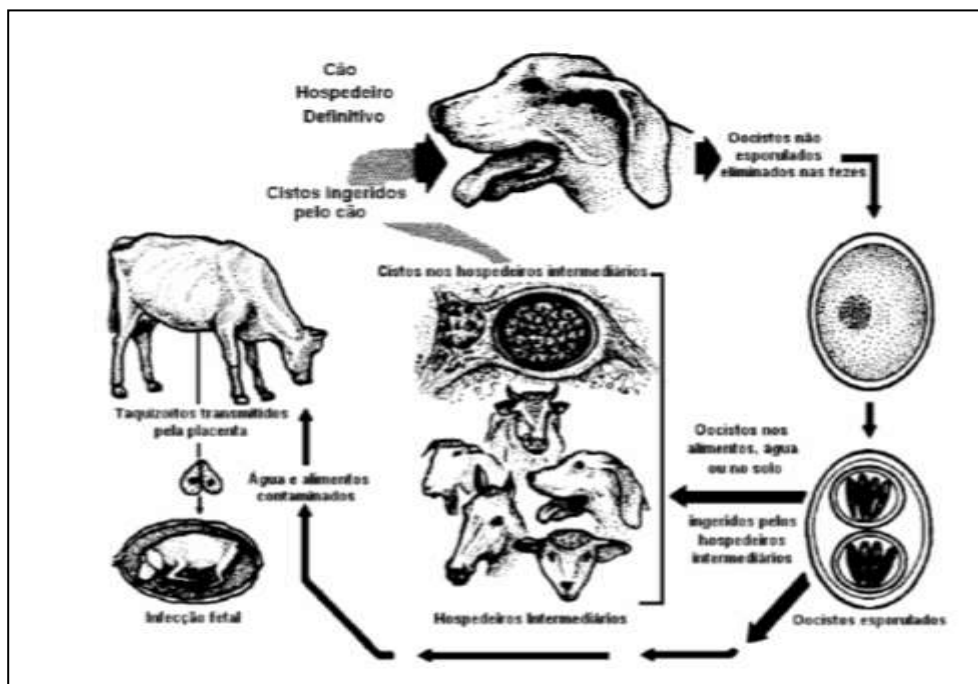


Figura 2. Ciclo de vida de *N. caninum* (modificado de Dubey, 1999).

O hospedeiro intermediário ingere o oocisto esporulado, ocorrendo a liberação dos esporozoítos na luz intestinal e penetração dos mesmos nas células, onde passam a ser denominados de taquizoítos, se dividem rapidamente, provocando a lise e imediatamente infectando novas células (McALLISTER et al., 1998). Posteriormente, devido à resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos contidos em cistos teciduais (DUBEY, 2003). Quando o cisto com bradizoítos for ingerido, por um hospedeiro definitivo, neste, ocorre a digestão da parede do cisto no estômago, liberando os bradizoítos. Estes penetram nas células da parede intestinal onde ocorre a diferenciação sexual do parasito, com formação de oocistos que são excretados nas fezes (LINDSAY, et al., 1999).

3.4.4. Neosporose em caprinos

A importância econômica, clínica e epidemiológica da infecção de *N. caninum* entre os caprinos permanecem incerto. A neosporose em caprinos não apresenta a mesma relevância que em bovinos, porém, em propriedades que essas duas espécies são criadas juntas, os caprinos podem participar da epidemiologia da infecção (DUBEY; SCHARES, 2011). Abortamento e mortalidade neonatal associados a *N. caninum* foi relatado em cabras nos EUA, Costa Rica e Brasil. Pouco é conhecido da soroprevalência de *N. Caninum* anticorpos em cabras. Cabras inoculadas com *N. caninum* durante a gestação abortaram fetos infectados (DUBEY, 2003).

Recentes pesquisas sorológicas no Brasil (Tabela 2) indicam uma alta variação de prevalência de 1,05% a 26,6% (LIMA et al., 2008; TEMBUE et al., 2011). Assim como em *T. gondii*, as variações observadas na soroprevalência podem estar relacionadas a vários fatores epidemiológicos, regionais, aspectos nutricionais, manejo e aos testes sorológicos aplicados na sua determinação (ANDERLINNI et al., 2011).

Os estudos de neosporose em caprinos ainda são escassos, entretanto, a literatura relata abortamento e mortalidade neonatal como sinais da enfermidade (MORENO et al., 2012). No Brasil, neosporose neonatal foi

diagnosticada em caprinos com sinais neurológicos, em propriedades com histórico de abortamento no Rio Grande do Sul (COBERLLINI et al., 2006). Lesões macroscópicas associadas à neosporose são raras. Varaschin e colaboradores (2007), num estudo em Minas Gerais observaram malformação cerebral em um caprino soropositivo para *N. caninum* e positivo a imunohistoquímica. Cabras inoculadas com *N. caninum* durante a gestação abortaram fetos infectados (LINDSAY et al., 1999).

O papel desse protozoário como causa de abortamento natural em pequenos ruminantes deve continuar a ser investigado, uma vez que a sua inoculação experimental com o protozoário durante a gestação causa uma condição muito semelhante à observada em bovinos (Buxton et al., 2002). A infecção pode causar reabsorção fetal, mumificação, abortamento, parto prematuro e óbito fetal. No entanto, a maioria dos fetos infectados durante a gestação sobrevive e nasce infectado congenitamente (transmissão transplacentária), mas clinicamente saudável. Raramente, cabritos congenitamente infectados podem ter sinais nervosos que variam de leve ataxia a tetraparalisia. Ocasionalmente, os animais adultos podem apresentar sinais clínicos, principalmente de encefalite (DUBEY; SCHARES, 2003).

Estudos de prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em caprinos (Tabela 3) foram realizados na Espanha (DIAZ, et al., 2016), Grécia (ANASTASIA et al., 2013), Polônia (CZOPOWICZ et al., 2011), Romênia (LOVU et al., 2011) e Gabão (MAGANGA et al., 2016), porém, ainda em número pouco expressivo se comparado ao número de investigações sorológicas da neosporose na espécie bovina (ANDERLLINI et al., 2011).

Tabela 2. Soroprevalência de *Neospora caninum* em caprinos no Brasil

Fonte	Ano	Estado/País	Método ^a	Ponto de corte	Nº caprinos analisados	% caprinos positivos
Filgliuolo et al.	2004	São Paulo	RIFI	50		6,4
Stachissini	2005	São Paulo	RIFI	25	923	17,44
Faria et al.	2007	Paraíba	RIFI	50	306	3,3
Uzeda et al.	2007	Bahia	RIFI	32	384	15
Lima et al.	2008	Rio Grande do Norte	RIFI	50	381	1,05
Anderlinni et al.	2011	Alagoas	RIFI	50	454	5,3
Moraes et al.	2011	Maranhão	RIFI	25	46	17,39
Varaschin et al.	2011	Minas Gerais	RIFI	50	401	10,7
Tembue et al.	2011	Pernambuco	RIFI	50	319	26,6
Costa et al.	2012	São Paulo	RIFI	***	923	17,23
Andrade et al.	2013	Rio Grande do Norte	RIFI	***	667	10,7
Topázio et al.	2014	Santa Catarina	RIFI	50	654	4,58

^aRIFI, reação de imunofluorescência indireta

Tabela 3. Soroprevalência de *Neospora caninum* em caprinos no mundo

Fonte	Ano	Estado/País	Método ^a	Nº caprinos analisados	% caprinos positivos
Czopowicz et al.	2011	Polônia	ELISA	1060	9
Lovu et al.	2011	Romênia	ELISA	512	2,3
Anastasia et al.	2013	Grécia	ELISA	375	6,9
Maganga et al.	2016	Gabão	ELISA	106	31,3
Diaz et al.	2016	Espanha	ELISA	638	6

^a ELISA, ensaio imunoenzimático

Lima e colaboradores (2008) com o objetivo de verificar a soroprevalência de *N. caninum* em caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte, coletaram amostras de soro de 381 animais (324 fêmeas e 57 machos) de 14 propriedades e foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta com ponto de corte de 1:50. Das 14 propriedades analisadas, quatro (28,6%), apresentaram animais positivos. Dos 381 animais amostrados, quatro (1,05%), estavam positivos para anticorpos anti- *N. caninum*.

Um estudo de prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em caprinos no estado de Alagoas, foi realizado em dez municípios, em 24 propriedades de produção caprina com animais de aptidão mista. Foram coletadas amostras sanguíneas de 454 animais utilizando a técnica de imunofluorescência indireta. Em cada propriedade foi aplicado questionário investigativo com questões referentes ao sistema de produção e manejo nutricional, reprodutivo e sanitário. A soroprevalência encontrada foi de 5,3% com 62,5% das propriedades apresentando pelo menos um animal positivo. Não foi observada associação significativa para as variáveis referentes aos fatores de risco pesquisados (ANDERLINNI et al., 2011).

3.4.4.1. Fatores de risco associados a neosporose caprina

Os principais fatores de risco para infecção por *N. caninum* em caprinos encontrados nos estudos foram: sexo (MOORE et al., 2007), a idade dos animais (TEMBUE et al., 2011); contato direto com cães, problemas reprodutivos (TOPÁZIO et al., 2014) e sistema de manejo nas propriedades (UZEDA et al., 2007).

No oeste maranhense, Nordeste do Brasil, amostras de sangue de 46 caprinos, provenientes de cinco propriedades, foram coletadas, e a RIFI utilizada para o diagnóstico sorológico. Foi encontrado 17,39% de positividade de *N. caninum* e presença de animais com problemas reprodutivos como fator de risco em caprinos (MORAES et al., 2011).

Em Minas Gerais, VARASCHIN e colaboradores (2011) analisando 401 amostras de soro caprinos provenientes de 11 propriedades que foram submetidas à RIFI, a prevalência de animais positivos foi de 10,7%. Havendo

uma diferença significativa entre as faixas etárias. Os maiores índices de positividade, foram observados nos caprinos acima de três anos de idade. Estes apresentaram uma probabilidade 2,6 e 4,8 maior, em relação aos animais de até um ano de idade. TEMBUE et al., (2011) também encontraram reatividade à sorologia contra *N. caninum* associada com a idade nos caprinos no estudo em Pernambuco.

Já no estado de Santa Catarina, amostras de sangue foram coletadas de 654 caprinos em 57 cidades. Trinta amostras (4,58%) foram soropositivas para o agente infeccioso com títulos variando entre 1:50 a 1:6400. Problemas reprodutivos presentes nas fazendas, bem como a dieta e o contato direto com cães foram detectados como fatores de risco para a enfermidade (TOPAZIO et al., 2014).

3.5. Sarcocystis spp

3.5.1 Histórico

Sarcocystis foi relatado pela primeira vez por Lankester em 1882 com a presença de cisto no músculo esquelético estriado de um rato na Suíça. Posteriormente, o parasita foi encontrado em camundongo (*Mus musculus*) sendo chamado de *Sarcocystis muris*. O ciclo de vida de Sarcocystis permaneceu desconhecido até 1972 (DUBEY, et al., 2016).

3.5.2. Morfologia e biologia

Sarcocystis spp., um protozoário apicomplexa, uma vez considerado como um parasita não patogênico foi encontrado associado a condições de doença nos animais. (DUBEY et al.,2015).

Há um debate considerável sobre o número de espécies no gênero *Sarcocystis*. Parece existir 196 espécies, no entanto, ciclos de vida completos são conhecidos apenas por 26 deles (DUBEY et al., 2016).

Sarcocystis spp. são parasitas protozoários obrigatoriamente intracelulares, formadores de cistos, com uma ampla gama de hospedeiros e

distribuída em todo o mundo. Apresenta um ciclo de vida heteroxeno obrigatório, sendo necessários hospedeiros intermediários (herbívoro ou onívoro) e hospedeiros definitivos (carnívoros) para completarem seu ciclo (DUBEY, 1976; TENTER, 1995).

O número e distribuição de sarcocistos variam de hospedeiro para hospedeiro e incluem o número de organismos (esporocistos) ingeridos, as espécies de *Sarcocystis*, as espécies de hospedeiro assim como o estado imunológico. No hospedeiro definitivo, a maioria dos *Sarcocystis* spp. se desenvolve nos músculos estriados do coração, língua, esôfago, diafragma, e músculos esqueléticos (DUBEY et al., 2016).

3.5.3. Ciclo de vida

Sarcocystis spp. tem um ciclo de vida presa-predador obrigatório de 2 hospedeiros (Figura 3). Estágios assexuados desenvolve-se apenas no hospedeiro intermediário, que, na natureza, é freqüentemente um animal presa. Estágios sexuais se desenvolvem somente no hospedeiro definitivo, que é carnívoro (predador). Hospedeiros intermediários e definitivos variam para cada espécie do protozoário. Algumas espécies de *Sarcocystis* podem completar o ciclo de vida na mesma espécie hospedeira, mas não no mesmo animal (DUBEY et al., 2016).

O hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de tecido contendo sarcocistos maduros. Os bradizoitos são liberados do sarcocisto pela digestão no estômago e no intestino. Os bradizoitos se movem ativamente, penetram na mucosa do intestino delgado e se transformam em gametas feminino e masculino. Após a fertilização, uma parede se desenvolve ao redor do zigoto e o oocisto é formado. Todo o processo de gametogonia e a fertilização pode ser completada em até 24 horas. Porém, gametas e oocistos podem ser encontrados ao mesmo tempo no mesmo hospedeiro. A parede do oocisto é fina e freqüentemente se rompe liberando os esporocistos que são eliminados nas fezes. Os períodos pre-patente e patente variam, mas para a maioria das

espécies de *Sarcocystis*, os oocistos são excretados primeiro nas fezes entre 7 e 14 dias após a ingestão de sarcocistos (DUBEY, et al., 2016).

O hospedeiro intermediário é infectado pela ingestão de esporocistos, contendo quatro esporozoítos, em alimentos ou água. Os esporocistos liberam os esporozoítos no intestino delgado. Os merozoítos liberados da geração terminal da esquizogonia iniciam a formação do sarcocisto. A formação de cistos no tecido muscular, geralmente, não é patogênico para o hospedeiro. (DUBEY, et al., 2016)

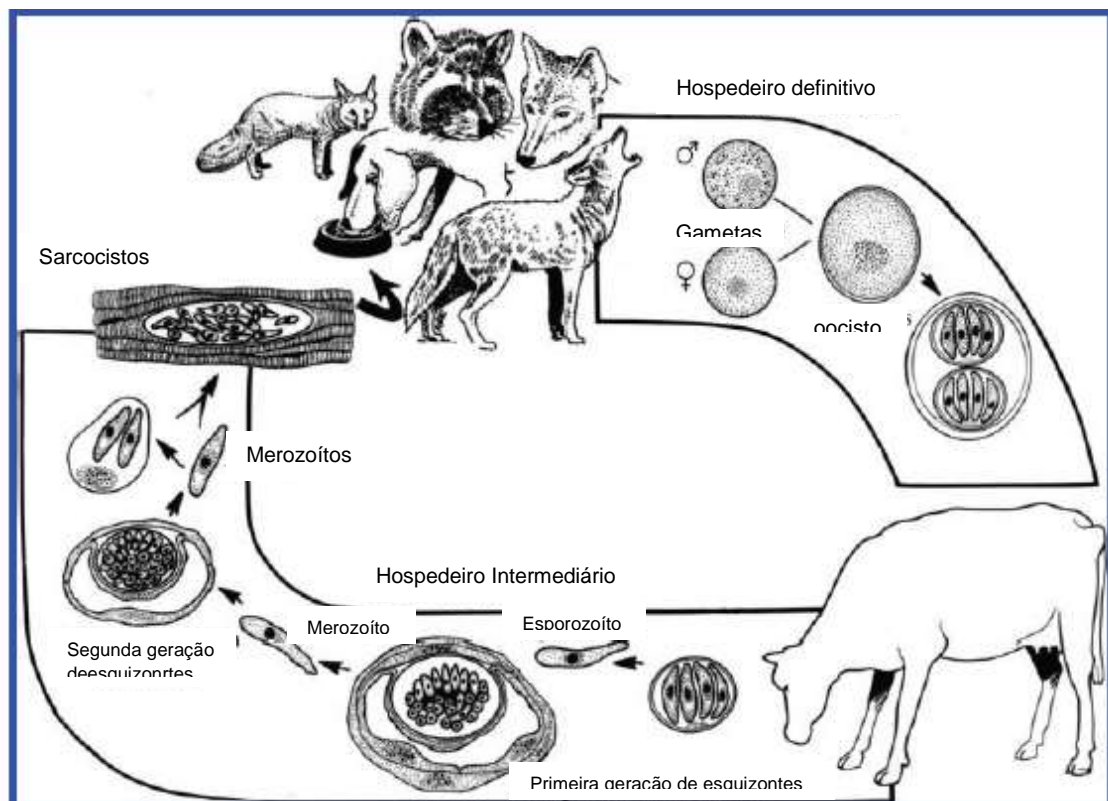


Figura 3 – Ciclo de vida *Sarcocystis* spp. (modificado Dubey, 2016).

3.5.4. Sarcocistose em caprinos

A sarcocistose é uma enfermidade parasitária emergente em animais de produção, causada por um protozoário coccídeo do gênero *Sarcocystis* que infecta uma grande variedade de animais domésticos, incluindo pequenos ruminantes (DUBEY et al., 2015).

A infecção por *Sarcocystis* é comumente observada em ovinos e caprinos. Animais infectados podem apresentar anemia, perda de peso e

redução de ganho de peso. Quando o sistema nervoso central é afetado, os animais podem apresentar fraqueza nos membros posteriores, ataxia, paresia, miopatia e morte (Buxton 1998). Apesar da apresentação da sarcocistose clínica em pequenos ruminantes ser esporádica, existe um grande impacto econômico em algumas regiões devido à condenação de carcaças de ovinos e caprinos contendo cistos macroscópicos de *Sarcocystis* spp (BITTENCOURT , et al, 2016).

Caprinos são hospedeiros intermediários para três espécies: *S. capracanis*, *S. hircicanis* e *S. moulei*. As duas primeiras espécies podem causar cistos musculares microscópicos, enquanto que *S. moulei* produz cistos macroscópicos. *Sarcocystis capracanis* é a espécie mais patogênica para caprinos e cabras infectadas expressam febre, perda de peso, anorexia, abortamento e morte, dependendo do número de esporocistos ingeridos. Apenas 5000 esporocistos causam doença clínica e 100.000 esporocistos são geralmente fatais (DUBEY et al., 2016).

Poucos estudos tem sido realizados para determinar a prevalência de *Sarcocystis* spp. em caprinos. Em bibliografia consultada, tem-se uma variação entre 33,6% e 99,4%, por microscopia e exame de esfregaços (LATIF et al., 1999; SHEKARFOROUSH et al., 2005). *Sarcocystis capracanis* também foi relatado no Brasil (Estado da Bahia), Índia (Bangalore), Nigéria (Makurdi) e Tunísia (DAFEDAR et al, 2008; BITTENCOURT et al., 2016; AMAIRIA et al, 2017; OKITA et al, 2017).

Em trabalhos realizados em outros países, demonstram uma alta infecção, como a realizada no Iraque em 826 caprinos da região de Bagdá, encontrando 33,6% dos animais positivos utilizando o exame macroscópico de presença de cistos teciduais (LATIF et al., 1999). Outro estudo foi conduzido para determinar a prevalência da infecção de *Sarcocystis* em cabras abatidas em alguns matadouros de Makurdi, na Nigéria. A investigação histológica foi realizada e, das 224 cabras examinadas, 84 (37,50%) estavam infectadas (OKITA et al., 2017).

Prevalência mais elevada foi encontrada no trabalho realizado na Bahia onde tecidos de 120 cabras e 120 ovelhas foram examinados para *Sarcocystis* spp. por avaliação macroscópica, microscopia de luz, microscopia

eletrônica e testes moleculares. Cistos microscópicos de *Sarcocystis* spp. foram detectados em 95,8% dos ovinos e 91,6% dos caprinos. *Sarcocystis tenella* e *Sarcocystis arieticanis* foram observados em ovinos e *Sarcocystis capracanis* em caprinos (BITENCOURT et al., 2016)

3.6. Diagnóstico

O diagnóstico de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. apresenta uma variedade de técnicas com diferentes níveis de sucesso para os parasitas que consiste em uso de técnicas sorológicas, histológicas, moleculares e isolamento do parasita através de ensaio biológico e cultura celular (HILL; DUBEY, 2002).

O diagnóstico imunológico é feito pela identificação de anticorpos específicos, através de sorologia. Os testes sorológicos são utilizados com frequência na confirmação de diagnóstico de doenças parasitárias nos animais. Devido a facilidade de obtenção de amostras de sangue, baixo custo e rapidez na execução do teste e resultados (CAMARGO, 1995).

Técnicas de diagnóstico como medição do teor de albumina, análise de immunoblot, western blot, imunoistoquímica, histopatologia, e métodos moleculares, estão entre as mais utilizadas para detecção de *Sarcocystis* spp. (DUBEY et al., 2015). Os testes sorológicos como o RIFI e ELISA podem ser utilizados ao lado de sintomas clínicos da doença para diferenciá-la de outras etiologias (LOPES, 2004).

Entre os testes sorológicos, aqueles mais empregados são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), reação de hemaglutinação (HAI), aglutinação do látex (LAT), soroaglutinação direta e western Blot, teste de aglutinação modificado (MAT), método da aglutinação direta (MAD) e Teste de aglutinação Neospora (NAT) para o agente *N. caninum* (MCALLISTER et al., 1998; SILVA et al., 2002; DUBEY; SCHARES, 2007; WAPPENAR et al., 2007; RAGOZO et al., 2008).

Entre os testes parasitológicos destacam-se os exames imunoistoquímico, histopatológico, isolamento *in vitro* e *in vivo* e detecção

direta do DNA do parasito pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (CAMARGO, 1995).

O isolamento é uma técnica que auxilia na detecção do hospedeiro intermediário. Em *T. gondii* é realizada a partir de amostras de tecido através do ensaio biológico em animais de laboratório ou pela cultura celular. Os métodos moleculares podem ser utilizados ou não concomitantemente aos sorológicos. Entre os métodos para detecção de DNA, o mais utilizado é a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), esta é uma técnica eficiente que permite à amplificação enzimática do material genético do agente a ser pesquisado utilizando iniciadores (primers) específicos, facilitando a sua visualização. Contudo, essa técnica possui um custo elevado, o que restringe a sua utilização em diagnósticos de rotina (LEFEVRE-PETTAZZONI et al., 2006).

A RIFI é uma técnica que merece destaque devido à sua sensibilidade e é considerado seguro como método de diagnóstico, podendo ser usado tanto na fase aguda (pesquisa de IgM) quanto na fase crônica (pesquisa de IgG). É um método de fácil execução, boa sensibilidade e especificidade, praticamente isento de problemas de infecção acidental para os laboratórios, sendo muito utilizado em laboratórios de rotina (SILVA et al., 2002).

A detecção de anticorpos através da sorologia é de fundamental importância para o tratamento e controle de tais parasitoses, uma vez que a infecção, tanto em humanos como nos animais, pode assumir quadros clínicos facilmente confundidos com diversas doenças, além da grande maioria ser assintomática (SILVA et al., 2002).

4. CAPÍTULO I

SOROPREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO ASSOCIADOS A INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. EM CAPRINOS DO SUDOESTE DO ESTADO DA BAHIA, BRASIL.

4.1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura representa uma atividade econômica explorada em todos os continentes, estando presente em áreas sob as mais diversas características climáticas. O rebanho caprino brasileiro é de 8.646.621 de cabeças com 90,68% na região Nordeste. E a Bahia, o estado que detém o maior efetivo do país (BRASIL, 2016). Em função das características climáticas, a pecuária tem se constituído, ao longo do tempo, na atividade básica das populações rurais distribuídas pelos milhões de hectares do semiárido. A grande demanda por carne e leite de cabras nos países em desenvolvimento devido ao crescimento populacional, à urbanização e às mudanças nas preferências alimentares e nos hábitos dos consumidores contribui para o aumento da produção no Brasil (MORAES et al., 2011).

Toxoplasma gondii tem distribuição cosmopolita. Os felídeos exercem papel fundamental na disseminação deste agente por serem os hospedeiros definitivos. Possui um ciclo de vida heteroxeno facultativo e podem infectar animais homeotérmicos, inclusive os humanos, caracterizando assim uma zoonose (DUBEY; JONES, 2008; DUBEY, 2009). Os caprinos, assim como os ovinos, exercem o papel de hospedeiros intermediários. A toxoplasmose pode causar sérios problemas reprodutivos e é uma das principais causas de abortamento em pequenos ruminantes (DUBEY, 2010). No Brasil a prevalência varia de 8 – 47,6 % (SILVA et al., 2002; BISPO et al., 2011) e animais mais velhos, contato com gatos, sistema de criação e fonte de água são alguns dos principais fatores de risco identificados como associados à toxoplasmose caprina identificados (ABU-DAUBOUL et al., 2010; ANDERLINI et al., 2011; GARCIA et al., 2012).

Neospora caninum, devido a semelhança morfológica, durante muito tempo foi confundido com *T. gondii*, sendo reconhecido como um novo gênero e espécie após o isolamento em cultura de cérebro de cão infectado congenitamente (DUBEY et al, 1988). *Neospora caninum* é responsável por falha reprodutiva em várias espécies de animais. Estudos na espécie caprina ainda são limitados quando comparados com outras espécies de ruminantes, especialmente bovinos (DUBEY; SCHARES, 2011). Embora investigações

tenham isolado tal coccídeo e descrito lesões em fetos abortados de cabras, a importância epidemiológica real da neosporose nestes pequenos ruminantes não foi completamente elucidada (MORENO et al., 2012). No entanto, abortamento e mal formação são sinais encontrados relacionados a *N. caninum* (VARASCHIN et al., 2007). Os principais fatores de risco para infecção por *N. caninum* em caprinos foram: sexo (MOORE et al., 2007); idade dos animais (TEMBUE et al., 2011); contato direto com cães, problemas reprodutivos (TOPÁZIO et al., 2014) e sistema de manejo nas propriedades (UZEDA et al., 2007).

Sarcocystis spp. possui ciclo heteroxeno e muitas espécies estão associadas ao seu ciclo presa-predador. Os esporocistos eliminados pelos hospedeiros definitivos, carnívoros, são infecciosos para o hospedeiro intermediário (LOPES, 2004). Os caprinos se infectam através da ingestão de oocistos esporulados ou esporocistos em alimentos ou água contaminadas. Perdas econômicas associadas à *Sarcocystis* spp. em caprinos, incluem perda de peso, anorexia, diminuição da produção de leite, anemia e prostração (DUBEY, 2016).

Esses pequenos ruminantes são economicamente importantes nessa região e uma importante fonte de renda para os proprietários. Em vista da crescente importância de caprinos no nordeste do Brasil e potenciais perdas econômicas por estes agentes, considerando a importância dessas parasitoses e a escassez de informação epidemiológica no estado da Bahia, objetivou-se com este estudo determinar a frequência da infecção de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em rebanhos caprinos da mesorregião centro-sul, no Sudoeste da Bahia, bem como identificar os possíveis fatores de risco associados à infecção.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

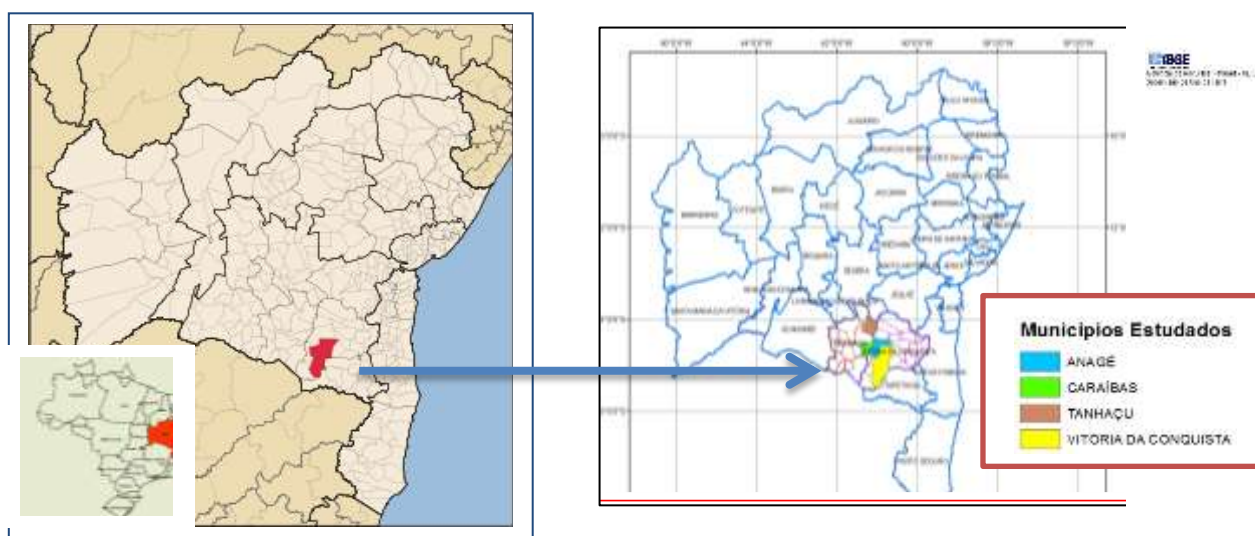
- 1) Determinar a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. na mesorregião centro sul da Bahia;
- 2) Identificar possíveis fatores de risco associados à infecção caprina por *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. na mesorregião centro sul da Bahia;

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. Área de estudo e período de coleta

As coletas de sangue foram realizadas entre abril de 2014 a dezembro de 2015. A área selecionada para a coleta das amostras foi a microrregião de Vitória da Conquista no Estado da Bahia. A mesorregião Centro-Sul baiano (Figura 4) possui clima predominante semiárido caracterizando-se por clima quente e seco, com duas estações, a seca e a úmida. Suas características são temperaturas médias elevadas, em torno de 27° C, e amplitude térmica em torno de 5° C. As chuvas, além de irregulares, não excedem os 800 mm/ano.

Figura 4 – Localização dos municípios da mesorregião do Centro-Sul Baiano onde foram coletadas amostras de caprinos para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma*, anti-*Neospora* e anti-*Sarcocystis*.



4.3.2. População de estudo sorológico

O estudo sorológico envolveu 553 animais selecionados por conveniência, em 25 propriedades agrícolas cadastradas na Procriar - Programa de Apoio a Caprino-ovinocultura do Sudoeste da Bahia, distribuídas em quatro municípios. As propriedades foram selecionadas com base em

aceitação do proprietário e fácil acesso. O tamanho amostral mínimo foi calculado em 467 animais pelo programa estatístico EPI-INFO versão 3.5.1, considerando uma perspectiva de prevalência de 50%, com erro amostral de 5% e grau de confiança de 99%, para uma população de 64.000 animais (BRASIL, 2012).

O rebanho foi composto basicamente por animais sem raça definida. A idade dos animais foi estimada pela observação da dentição e os animais foram categorizados em dois grupos de idade: acima e abaixo de 36 meses (GUIMARÃES, et al. 2013). Não foram coletadas amostras de sangue em cabritos abaixo de seis meses de idade devido a possibilidade da presença de anticorpos colostrais.

4.3.3. Coleta de sangue e questionário epidemiológico

O sangue foi coletado pela punção da veia jugular e o soro foi separado após centrifugação de 1200rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada MEGAFUGE 16R, e armazenado em -20°C até a sua utilização. A realização do estudo foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA-UESC 016/2011 – anexo 1).

Para determinação dos fatores de risco, foi elaborada uma entrevista estruturada com perguntas objetivas relativa à informação sobre características gerais da propriedade, assim como dados referentes aos caprinos (Apêndice 1)

4.3.4. Detecção de anticorpos

Para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, anti- *N. caninum* e anti-*Sarcocystis* spp. foi realizada a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Nela, foram utilizadas lâminas apropriadas para IFI, contendo antígenos da cepa RH de *T. gondii*, Nc-Ba de *N. caninum* e SN-138 de *S. neurona* cedidas pelo laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz; soros controles positivo e negativo oriundos de infecção natural aos parasitos e conjugado anti-caprino com Isotiocianato de Fluoresceína (F-7634, Sigma-Chemical, EUA). A diluição inicial foi de 1:64,

contra *T. gondii*, 1:50 contra *N. caninum* (LIMA et al., 2008) e 1:16 contra *Sarcocystis* spp. (GORMAN et al., 1986) com diluições seriadas com base 4 até negatização da amostra.

As reações foram visualizadas sob o microscópio de epifluorescência OLYMPUS® BX51 e foram consideradas positivas quando os taquizoítos apresentaram fluorescência completa de verde-fluorescente periférica e o tamanho, aparência e densidade de coloração foram comparadas com um controle positivo. A reação negativa mostrou uma marca de cor avermelhada uniforme e também comparada com o controle negativo.

4.3.5. Análise estatística

Os resultados da sorologia foram associados a variáveis relacionadas a espécies e informações coletadas no questionário. Para identificar fatores de risco associados à infecção por tais agentes, foi conduzida uma análise bivariada usando o Teste do Qui-quadrado e o Teste exato de Fisher com nível de significância a 5%, utilizando o programa estatístico EPI-INFO versão 3.5.1. Todas as variáveis com $p \leq 0,2$ na análise bivariada foram submetidas a uma análise de colinearidade determinada pelo Teste de Spearman, no programa BioEstat 5.0, e, posteriormente uma análise multivariada de regressão logística não condicional foi executada no programa EPIINFO versão 3.5.1.

4.4 RESULTADOS

Anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados em 42 (7,59%) caprinos, com títulos de 64 (16/42 – 38,3%), 256 (14/42 – 34,2%), 1024 (8/42 – 18,3%) e 4096 (4/42 - 9,2%). Dos 25 imóveis analisados 15 apresentaram animais positivos com variação de 3,3% a 71,4% de positividade. Dentre os municípios analisados, Anagé foi o que apresentou uma maior frequência de animais positivos (10,81%) e o que apresentou menor positividade foi Tanhaçu (3,03%), conforme a Tabela 4.

Tabela 4 – Frequência absoluta de positivos / número total de amostras avaliadas e frequência relativa de soros positivos de caprinos para a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Neospora caninum* e anti-*Sarcocystis* spp, segundo o município de localização das propriedades avaliadas

Município	<i>T. gondii</i>		<i>N. caninum</i>		<i>Sarcocystis</i> spp.	
	Positivo/ total	%	Positivo/ total	%	Positivo/ total	%
Anagé	24/222	10,81	5/222	2,25	10/222	4,5
Caraíbas	2/64	3,13	2/64	3,13	3/64	4,69
Tanhaçu	3/99	3,03	1/99	1,01	2/99	2,02
Vitória da Conquista	13/168	7,74	4/168	2,38	29/168	17,26
Total	42/553	7,59	12/553	2,17	44/553	7,96

Anticorpos contra *N. caninum* foram encontrados em 12 (2,17%) caprinos, com títulos variando de 50 (5/12 – 41,7%), 200 (5/12 – 41,7%) e 800 (2/12 – 16,7%). Dentre os municípios analisados, Caraíbas foi o que apresentou maior frequência de animais positivos (3,13%). Assim como para *T. gondii* e *Sarcocystis* spp, o que apresentou menor positividade foi Tanhaçu (1,01%) (Tabela 4). Não foram observadas associações significativas na análise estatística para qualquer das variáveis analisadas.

O presente estudo investigou pioneiramente a prevalência de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. em caprinos no estado da Bahia, encontrando 44 (7,96%) caprinos soro reagentes, com título 16. Nos caprinos soropositivos para *Sarcocystis* spp. foi observada associação estatística entre a soropositividade e o tamanho do rebanho (p=0,02) (Tabela 6).

Entre os fatores de risco analisados, foi observada associação estatística entre a soropositividade e a faixa etária ($p= 0,03$), sexo ($p=0,03$) e área total da propriedade ($p=0,01$) (Tabela 5). Quando se estudou a variável gatos, a presença destes animais nas propriedades não foi estatisticamente significativo, porém, nas propriedades em que existia o contato direto dos felinos com os caprinos a positividade foi de 7,88%, e de 0% quando não existiam.

Tabela 5 - Análise multivariada dos fatores de risco associados a soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em caprinos do Sudoeste da Bahia

Variável	OR	IC 95%	Valor P
Faixa Etária	1.00		
<03 anos	2.05	1.05 – 4.02	0,0356
≥ 03 anos			
Sexo			
Macho	2.58	1.09 – 6.11	0,0308
Fêmea	1.00		
Área da propriedade			
≥ 100 hectares	1.00	0.13 – 0.79	0,0140
< 100 hectares	0.32		

-2*Log-Likelihood final: 278.3330

Tabela 6 - Análise multivariada dos fatores de risco associados a soroprevalência de *Sarcocystis spp.* em caprinos do Sudoeste da Bahia

Variável	OR	IC 95%	Valor P
Tamanho do rebanho			
≥ 100 animais	1.00	0.11 – 0.86	0,0140
< 100 animais	0.32		

-2*Log-Likelihood final: 287.9284

4.5. DISCUSSÃO

A baixa prevalência de *T. gondii* encontrada nesta pesquisa foi semelhante a achados anteriores na região da caatinga do nordeste brasileiro (GONDIM et al., 1999; MORAES, et al., 2011; SANTOS et al., 2012; SILVA et al. 2015). Moura e colaboradores (2016) em Santa Catarina (33,02%) e Gondim e colaboradores (1999), na região do recôncavo Baiano (41,97%) encontraram resultados superiores. As diferenças observadas podem ser devido as regiões diferentes e conseqüente variações climáticas. No presente estudo, a região estudada é caracterizada como semiárida com características climáticas de baixos valores de umidade e índice pluviométrico o que pode ter efeitos adversos na viabilidade e disseminação ambiental de oocistos de *T. gondii* (DUBEY, 2010), diminuindo a taxa de infecção dos animais.

Com a análise estatística multivariada, observou-se que as propriedades com área inferior a 100 hectares apresentaram uma maior soropositividade ($p=0,014$) quando comparado com propriedades maiores. As propriedades menores apresentavam uma densidade maior de animais, o que facilita o contágio pelo parasito. Rego e Colaboradores (2016) cita que um ambiente com densidade alta de animais tem uma probabilidade maior de concentração do parasito por área, bem como aumentar a chance de um dado animal entrar em contato com *T. gondii*.

Uma associação significativa relacionada ao sexo foi observada neste estudo, revelando maior número de machos soropositivos quando comparados às fêmeas, corroborando com os dados encontrados por Zhao e colaboradores (2011) e Ueno (2005). Para Ueno (2005), por não haver uma explicação biológica coesa, presume-se que alguma variável que não foi pesquisada pode estar relacionada ao sexo e a infecção de *T. gondii*.

Também foi encontrada associação da positividade com animais acima de três anos, resultado semelhante aos obtidos por Anderlini e colaboradores, (2011) e Medeiros e colaboradores, (2014). Animais mais velhos tem um maior tempo de exposição aos oocistos esporulados no ambiente tendo mais chances para se infectarem.

A baixa prevalência de *N. caninum* encontrada neste estudo (2,17%) corrobora com os achados encontrados em pesquisas realizadas na região Nordeste do Brasil (FARIA et al., 2007; LIMA et al., 2008; SILVA et al., 2009). Andelini e colaboradores (2011), no estudo realizado em Alagoas, sugere que a baixa prevalência observada na região, possa ser creditada aos animais das propriedades estudadas serem criados em regime extensivo e sem suplementação alimentar em comedouros. Este fato propiciaria o pastejo em gramíneas mais altas o que dificultaria o acesso aos oocistos do parasito presentes no solo, além dos fatores climáticos já descritos para *T. gondii*.

Não foram observadas associações significativas na análise multivariada para as variáveis analisadas para *N. caninum*, resultado também encontrado em alguns estudos realizados no Nordeste do país (FARIA et al., 2007; LIMA et al., 2008). Podendo ser explicado pela baixa positividade encontrada em tais pesquisas. Porém, embora não tenham sido identificados fatores de risco estatisticamente significantes relacionados à infecção, a existência de animais positivos indica a presença do parasito nos criatórios, constituindo-se em agente infeccioso preocupante envolvido em distúrbios reprodutivos (TOPÁZIO et al., 2014).

Poucas pesquisas relacionadas tem sido realizadas no Brasil, apesar da importância da infecção em animais domésticos e principalmente das lacunas ainda existentes no que diz respeito a epidemiologia desta infecção. Dubey e colaboradores (2016) identificaram perdas econômicas oriundas de infecções clínicas e subclínicas por *Sarcocystis* spp. em caprinos, devido à diminuição do crescimento, da produção de leite e de lã e abortamento.

Neste estudo, foi encontrada uma baixa soroprevalência para *Sarcocystis* spp. associado, possivelmente, a dificuldade de permanência dos oocistos ou esporocistos no ambiente devido as características climáticas desfavoráveis à manutenção do parasita (DUBEY, 2016). Bitencourt e colaboradores (2016) numa pesquisa também na Bahia com animais oriundos de diversas regiões do estado obtiveram uma frequência de cistos microscópicos de 8,3% a 91,6% nos tecidos utilizados. Assim, o método de diagnóstico, a quantidade de animais e a amostra utilizada podem influenciar na prevalência (BARCI et al., 1983). Segundo Bitencourt e colaboradores

(2016), a fonte de alimentação influenciou no resultado, onde animais locais, já adaptados, a principal fonte de alimentação é o pastejo; enquanto que caprinos menos rústicos recebem alimentação complementar (concentrado, cevada e feno). Estes suplementos são mais susceptíveis de serem contaminados pelas fezes dos carnívoros. Em nosso estudo, nenhuma fazenda fornecia suplementos alimentares aos animais, associando a baixas prevalências.

Rebanhos com até 100 animais foi considerado um fator de risco associado à infecção de *Sarcocystis* spp. Esses animais pertenciam a pequenas propriedades familiares, com maior densidade de animais, aumentando a exposição aos oocistos e esporocistos dispersos no ambiente (GAZONIS et al., 2015).

4.6. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram a presença de antígeno dos protozoários da família Sarcocystidae nos rebanhos caprinos estudados, com importância para a saúde animal e saúde pública.

5. CAPITULO II

SHORT COMUNICATION

DETECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* EM CAPRINOS (*Capras hircus*) NA BAHIA, BRASIL.

5.1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos tem importância social e econômica regional, dadas as poucas alternativas para o semiárido brasileiro. A grande capacidade de adaptação e resistência à seca os torna uma importante fonte de alimentos e renda para os produtores nordestinos. As condições precárias de manejo sanitário das criações, juntamente a ausência ou uso inadequado de tecnologias de manejo dos rebanhos, constituem as principais causas da baixa produção e da mortalidade desses animais (BRASIL, 2006).

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório com ciclo heteroxeno facultativo. Pode infectar os animais homeotérmicos, inclusive seres humanos. A toxoplasmose não só resulta em significativas perdas animais e econômicas, mas também tem implicações para saúde pública, já que é uma importante zoonose. O consumo de carne contaminada é uma importante via de transmissão para seres humanos. Em adultos saudáveis, a enfermidade é normalmente assintomática, mas em mulheres grávidas pode causar danos reprodutivos como abortamento, morte neonatal, hidrocefalia e retardo mental e em humanos imunocomprometidos lesões no sistema nervoso central e encefalites (DUBEY, 2008).

A infecção por *T. gondii* nos caprinos ocorre pela ingestão de oocistos esporulados presentes na água, nos alimentos e solo contaminados, por via transplacentária (DUBEY; BEATTIE, 1988), venérea (MORAES et al., 2011) ou leite (CHIARI; NEVES, 1984). A infecção geralmente é assintomática, embora possa ser detectada febre nos primeiros dias. Abortamentos podem ocorrer em cabras de todas as idades quando a primo-infecção ocorre durante a gestação (MCCOLGAN et al., 1988).

Presença de cistos teciduais em carne caprina para consumo humano já foi detectado no estado de São Paulo, com animais oriundos de outros estados brasileiros (RAGOZO et al., 2010). Na Bahia, ainda não se tem trabalhos com isolados de *T. gondii* em caprinos.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Detecção molecular de *T. gondii* a partir de tecidos de caprinos por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- 2) Obter isolados de *T. gondii* a partir de tecidos de caprinos, através do ensaio biológico.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. Área de estudo e período de coleta

As coletas foram realizadas entre Novembro de 2016 a Abril de 2017. O local selecionado para a coleta das amostras foi o Frigorífico Babybode localizado no município de Feira de Santana que recebe caprinos oriundos de toda região semiárida do estado da Bahia.

5.3.2. Coleta de sangue e órgãos

A realização do estudo foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA-UESC 016/2011 – Anexo 1).

As amostras de sangue de 104 caprinos foram obtidas durante a sangria no momento do abate dos animais. Depois de abatidos, os tecidos (coração e cérebro) foram coletados na linha de abate e acondicionados individualmente em sacos plásticos, armazenados em caixa de isopor com gelo e levados ao laboratório. As amostras de sangue também foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo até a chegada ao laboratório de parasitologia veterinária.

5.3.3. Sorologia e ensaio biológico em camundongos dos tecidos dos caprinos

As amostras de sangue foram centrifugadas e realizada sorologia utilizando o Método de aglutinação direta - MAT (LOPES et al., 2013). Os positivos foram selecionados para a digestão péptica dos tecidos e os ensaios biológicos em camundongos seguindo o protocolo utilizado por Ragozo (2007).

A digestão péptica foi realizada de acordo ao sugerido por Dubey (1998), e após o processo, 1 mL do produto foi inoculado por via intraperitoneal em cada um de cinco camundongos Swiss Webster (25-35g) utilizados por amostra. Cada grupo de cinco camundongos eram identificados e alojados na mesma caixa. O controle negativo foi um animal que recebeu solução salina tamponada de fosfatos (PBS). Os camundongos foram mantidos com ração própria para a espécie e água *ad libidum* durante os 42 dias de observação. Após este período foi realizada coleta de sangue para sorologia

utilizando MAT, os camundongos sofreram eutanásia, e seus órgãos (baço, cérebro, coração, fígado e pulmões) retirados para posterior análise molecular.

5.3.3. Extração do DNA de amostras de tecido de caprinos e camundongos.

Foram retirados fragmentos de cérebro e coração dos caprinos soropositivos ao MAT e de baço, cérebro, coração, fígado e pulmões dos camundongos para a extração de DNA, utilizando o kit comercial Easy-DNA® (Invitrogen), seguindo o protocolo 3, de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, cada amostra foi estocada a -20°C até a execução da PCR.

5.3.4. Detecção de DNA de *Toxoplasma gondii* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A amplificação do DNA de *T. gondii* foi realizada utilizando os *primers* Tox4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e Tox5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT), que resultou em um fragmento com 529 bp (Genebank N^o AFI46527) do DNA de *T. gondii*. A PCR foi desenvolvida com o DNA extraído, acrescido de uma mistura de 0,30µM de cada *primer*, 200µM de cada de cada dNTP (Invitrogen), Tris-HCl (pH 9,0), 2mM MgCl₂ e 0,5U de Taq DNA Polymerase Platinum® (Invitrogen). A reação foi feita em 35 ciclos, após a sua padronização nas seguintes condições: 95°C durante 4 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto e 72°C durante 1,5 minutos, seguido de extensão final a 72°C durante 2 minutos. Os controles positivos (DNA de *T. gondii* cepa RH) e negativo (água ultrapura) foram incluídos em cada PCR. Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose (2,5%), corados com SYBR® Safe (Invitrogen) e fotodocumentados.

5.4. RESULTADOS

Dos 104 caprinos obtidos no frigorífico, 13 (12,5%) foram considerados sororeagentes ao MAT e submetidos ao ensaio biológico em camundongos. Desses 13 caprinos, apenas um foi positivo na PCR, amplificando DNA de *T. gondii* no coração e cérebro.

Quanto aos camundongos inoculados com tecidos dos caprinos, nenhum teve alterações condizentes com a toxoplasmose e todos foram anestesiados e sofreram eutanásia com 42 dias após a inoculação. Apenas quatro camundongos reagiram positivamente a sorologia anti- *T. gondii*, oriundos de três caprinos distintos. O coração de um camundongo (1/65), também sororeagente, foi positivo na PCR para *T. gondii*.

5.5 DISCUSSÃO

A toxoplasmose caprina é uma enfermidade parasitária de elevada importância, uma vez que traz problemas aos animais, além de servirem de fonte de infecção para o ser humano (DUBEY, 2008).

A presença de *T. gondii* em musculatura cardíaca de caprinos mostra a importância desses animais como fonte de infecção aos humanos (RAGOZO et al., 2010) . Até o momento há poucos relatos de isolamento de *T. gondii* entre os pequenos ruminantes. No estado da Bahia, segundo bibliografia constatada, não há nenhum relato.

Para detecção de cistos teciduais em órgãos de hospedeiros, o método de digestão de tecidos seguido de bioensaio em camundongos pode ser utilizado a fim de aumentar a taxa de recuperação do parasito (DUBEY, 1998), visto que o número de cistos em animais maiores é baixo, em torno de um cisto por 25-250g de órgão. A digestão dos tecidos com tripsina permite o exame de maior quantidade de material, levando à dissolução da parede dos cistos, liberando bradizoítos (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Neste estudo foram obtidos camundongos positivos oriundos de três (3/13) caprinos. Corroborando com a nossa pesquisa, baixa positividade em tecidos de caprinos foi conseguida na região Nordeste do Brasil (CAVALCANTE et al., 2006; CLEMENTINO- ANDRADE et al., 2013). Segundo os autores, esse pequeno número de isolados obtidos pode ser explicado pela baixa soro-positividade encontrada nesses animais e uma baixa carga parasitária nos tecidos analisados.

Numa pesquisa realizada no estado de São Paulo, para obter um número maior de isolados, já que os resultados encontrados não estavam satisfatórios, os autores aumentaram a quantidade de tecido utilizado na digestão (de 05 para 15g) e uma quantidade maior de camundongos por amostra inoculada (de 05 para 15), alcançando 12 isolados de um total de 26 ensaios biológicos (46,2%). Esses caprinos foram oriundos de São Paulo, Bahia e Rio Grande do Norte. Porém, nenhum desses isolados provenientes da Bahia. Assim como, quando os isolados foram analisados de acordo com a cidade de origem do caprino, obtiveram que os animais oriundos do município de Marília, também não foi possível o isolamento a partir do bioensaio (5/0).

Porém, quando considerado a soroconversão dos camundongos, obtiveram 6,67%, corroborando com o nosso estudo, que 4,61% dos camundongos inoculados foram positivos para *T. gondii*. (RAGOZZO, et al. 2007).

5.6. CONCLUSÃO

De acordo com as amostras de caprinos avaliadas, e uma baixa contaminação dos tecidos nos animais analisados, evidencia-se que a carne de caprino oriunda da Bahia, tem um baixo risco ao consumo humano.

6. CAPITULO III

SHORT COMUNICATION

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* EM CODORNAS (*Coturnix japonica*) NA BAHIA, BRASIL.

6.1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório com ciclo heteroxeno facultativo. Humanos são infectados principalmente pelo consumo da carne crua ou malcozida ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos eliminados pelos felídeos no ambiente (DUBEY, 2010).

As codornas se infectam com *T. gondii* pela ingestão de oocistos ao se alimentarem em ambiente contaminado. Apesar da infecção ser assintomática, essas aves são consideradas eficientes hospedeiros intermediários (DUBEY, 2010). Essas aves podem representar uma fonte de infecção por *T. gondii* para a população humana, através do consumo de carne e ovos crus/malcozidos, como também é um importante determinante de contaminação ambiental (DUBEY et al., 2012).

A toxoplasmose em aves pode se apresentar na forma subclínica ou clínica, em diversas espécies, como foi sumarizado por Dubey (2002). Em estudos com codornas infectadas experimentalmente com diferentes quantidades de oocistos de *T. gondii*, essas não desenvolveram sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose (ALBUQUERQUE et al., 2002; MUNHOZ et al., 2004).

Diversos estudos com detecção de *T. gondii* em galinhas no Brasil já foram realizados (DUBEY et al., 2008; SOARES et al., 2011; ROCHA, 2017), porém, nenhum envolvendo codornas naturalmente infectadas. Dessa forma, objetivou-se com este estudo detectar *T. gondii* em codornas criadas na Bahia por meio da detecção de DNA do parasito.

6.2. OBJETIVO ESPECÍFICO:

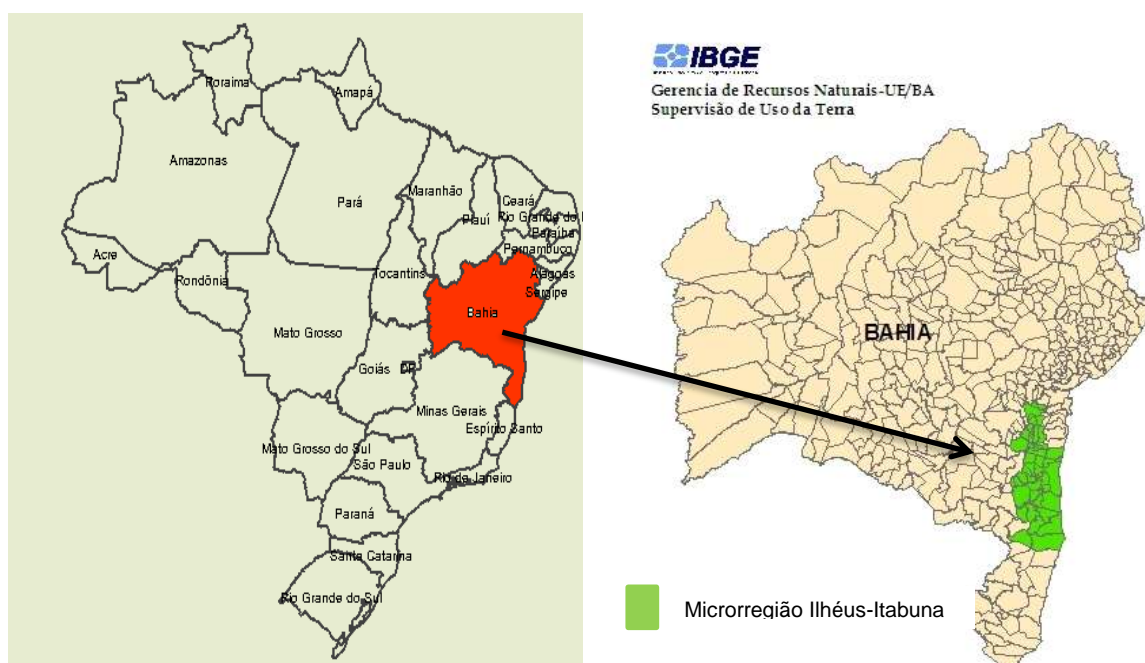
- 1) Detecção molecular de *T. gondii* a partir de tecidos de codornas por meio da reação em cadeia pela polimerase

6.3. MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1. Área de estudo e período de coleta

O estudo foi realizado entre setembro de 2017 e Fevereiro de 2018. A área selecionada para a coleta das amostras de tecido das codornas foi a microrregião de Ilhéus – Itabuna no Estado da Bahia. A microrregião de Ilhéus-Itabuna (Figura 5) possui uma área territorial de cerca de 22.000km², composta de 41 municípios. Com um clima predominante tropical úmido com chuvas regulares, temperatura média de 24^oC e uma precipitação pluviométrica média de 1750 mm anuais (BRASIL, 2016).

Figura 5 – Localização da microrregião Ilhéus - Itabuna



6.3.2. Amostras de estudo

Coração e cérebro de 105 codornas foram adquiridos em feira livres e abatedouro privado do município de Ilhéus.

6.3.3. Extração de DNA

Os dois órgãos foram macerados e homogeneizados individualmente. Após, realizou-se dois métodos para a extração de DNA.

No primeiro método, a extração de DNA dos tecidos (100µg) foi realizada utilizando o kit comercial Easy-DNA® (Invitrogen), seguindo o protocolo 3, de acordo com as recomendações do fabricante.

Para o segundo método, os tecidos restantes foram submetidos ao método da digestão péptica, seguindo o protocolo sugerido por Dubey (1998). Em seguida, a extração de DNA foi realizada também utilizando o kit comercial Easy-DNA® (Invitrogen), seguindo o protocolo 3, de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a extração, cada amostra foi estocada a -20°C até a execução da PCR.

6.3.4. Detecção de DNA de *Toxoplasma gondii* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real

A amplificação do DNA de *T. gondii* foi realizada utilizando os *primers* Tox4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e Tox5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT), que resultou em um fragmento com 529 bp (Genebank N^o AFI46527) do DNA de *T. gondii*. A PCR foi desenvolvida com o DNA extraído, acrescido de uma mistura de 0,30µM de cada *primer*, 200µM de cada de cada dNTP (Invitrogen), Tris-HCl (pH 9,0), 2mM MgCl₂ e 0,5U de Taq DNA Polymerase Platinum® (Invitrogen). A reação foi feita em 35 ciclos, após a sua padronização nas seguintes condições: 95°C durante 4 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto e 72°C durante 1,5 minutos, seguido de extensão final a 72°C durante 2 minutos. Os controles positivos (DNA de *T. gondii* cepa RH) e negativo (água ultrapura) foram incluídos em cada PCR. Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose (2,5%), corados com SYBR® Safe (Invitrogen) e fotodocumentados.

As análises por PCR em tempo real foram realizadas na plataforma Applied Biosystems 7500 Fast (Life Technologies). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando os *primers forward* 5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3' e *reverse* 5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3' e sonda (FAM) MGB TaqMan marcada com fluoróforo FAM-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG adaptado de acordo com Resch et al. (2003) disponíveis no banco de dados do GenBank (gb AF487550.1). Para a detecção (presença e ausência) do patógeno nas amostras, uma análise quantitativa foi realizada através da diluição seriada de 10X do DNA genômico de *T. gondii* (controle positivo da cepa RH) para determinar a curva padrão com, no mínimo, 6 pontos (10^0 a 10^5 cópias do gene) com correspondentes concentrações variando de 100 ng a 0,001 pg (RESCH et al., 2003). O ensaio foi realizado com uma mistura contendo 10uL de TaqMan Master Mix, 1 uL de cada par de *primer* e 3 uL de DNA genômico. O volume da reação foi completado para 20 uL com água ultra-pura estéril (livre de DNase e RNase). O procedimento foi feito conforme especificado por instruções do fabricante. As amplificações ocorreram nas seguintes condições: um passo inicial de desnaturação de 3 min a 95°C, 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. (LADEIRO et al., 2014).

6.4. RESULTADOS

Das 105 amostras de tecidos de codornas analisadas, 04 (3,81%), 03 de coração e 01 de cérebro, foram positivas na PCR em tempo real para *T. gondii*. Quando analisadas pela PCR, uma (0,95%) amostra de coração foi detectada a amplificação de *T. gondii*. Todas as amostras positivas foram extraídas diretamente com o kit, sem a digestão péptica.

6.5. DISCUSSÃO

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo para detecção de *T. gondii* em codornas naturalmente infectadas no Brasil. Estudos com infecção experimental foram realizados comprovando a suscetibilidade dessa espécie como hospedeiro intermediário assim como ausência de sinais clínicos específicos da infecção (ALBUQUERQUE et al., 2002; MUNHOZ et al., 2004; ATASEVER et al., 2017).

Seres humanos podem adquirir a infecção de *T. gondii* de animais doméstico ou selvagens. Os ovos e a carne de codorna são fontes de proteína populares na dieta humana no Brasil. Embora não tenha relato de infecção humana com *T. gondii* através do consumo de ovos de codorna, este parasita já foi isolado em ovos de galinha (TENTER et al., 2000). As codornas freqüentemente são abatidas em casa e as vísceras geralmente não são devidamente descartadas, servindo de fonte de infecção para felinos e humanos através da higiene inadequada no manuseio da ave e/ou utensílios utilizados, tornando uma fonte de infecção para o homem (DUBEY et al., 2012).

Neste estudo a positividade foi baixa (3,81%), semelhante a obtida por Cong e colaboradores (2017) na China com 6,4%. Kiliç e colaboradores (2017) não encontraram nenhum animal sororeagente para 144 codornas analisadas, sugerindo que condições de higiene e alimentação podem estar relacionadas com tal resultado. A forma de criação em gaiolas das aves também pode estar influenciando no resultado, devido ao espaço limitado dos animais.

A forma de criação em gaiolas das aves também pode estar influenciando no resultado. Em contraste, um estudo com galinhas criadas em contato com o solo, na mesma região da Bahia, revelou soropositividade de 27% a partir de 504 animais (ROCHA, 2017), apontando que o contato com o solo facilita a ingestão de oocistos eliminados pelos hospedeiros definitivos.

A PCR em tempo real vem sendo utilizada no diagnóstico da toxoplasmose e nesta metodologia os processos de amplificação e detecção são produzidos de maneira simultânea, usando marcadores fluorescentes (COSTA et al., 2004). No presente estudo, 3,81% das amostras analisadas foram positivas para *T. gondii* na PCR em tempo real. Quando analisadas pela

PCR, 01 (0,95%) amostra de coração foi detectada a amplificação do parasito, sendo todas as amostras positivas extraídas diretamente com o kit, sem a digestão péptica. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que os cistos não necessariamente serão localizados somente nos tecidos avaliados ou ainda a possibilidade de degradação do DNA durante o processo de digestão (AIGNER, et al., 2008).

Não houve diferença estatística significativa entre os métodos utilizados devido a baixa positividade encontrada.

6.6. CONCLUSÃO

Toxoplasma gondii foi detectado em tecidos de codornas, demonstrando a presença do parasito na carne destes animais e a necessidade de cuidados no consumo destes. Estudos mais aprofundados relacionados a caracterização genética de *T. gondii* devem ser realizados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo sobre a toxoplasmose, neosporose e sarcocistose realizado confirmou a presença na Bahia da contaminação de tais protozoários em caprinos e codornas, considerados animais de produção. Dentre os animais analisados, não foi observada sintomatologia clínica das enfermidades em nenhum deles, caracterizando a forma sub-clínica. De tal forma, torna-se importante a observação e cuidados com a população animal de tais espécies no sentido de controlar e prevenir contaminações com tais parasitos, evitando perdas econômicas com principalmente com problemas reprodutivos e contaminação humana através da ingestão de carnes contaminadas.

Outras pesquisas são necessárias para um levantamento soropidemiológico e do perfil genético do parasito para maior compreensão das características de *T. gondii* na região.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-DALBOUH, M.A. et al. Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. **Tropical Animals Health Production**, v.44, p.49–54, 2012.

AIGNER, C. P. et al. Real-time PCR-based quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of serologically positive outdoor chickens. **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n. 7, p. 935-937, 2010.

ALBUQUERQUE, G.R. et al., Alterações patológicas na infecção experimental de codornas (*Coturnix japonica*) com taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.**, v.11, n.1, p.43-46 2002.

AL-MAJALI, A. M., et al. Neosporosis in sheep and different breeds of goats from Southern Jordan: prevalence and risk factors analysis. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2008.

ALMERÍA, S. *Neospora caninum* and wildlife. International Scholarly Research Notices: **Parasitology**, v. 2031, p. 1-23, 2013.

AMAIRIA, S. et al., First detection and molecular identification of *Sarcocystis* spp. in small ruminants in North-West Tunisia. **Transbound Emerg Dis.** n 00, p. 1–6, 2017.

AMATO NETO, V.; et al. Toxoplasmosse. 4.ed. São Paulo, **Sarvier**, 1995, 154p.

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

ANDERLINI, G.A.; et al. Occurrence and risk factors associated with infection by *Toxoplasma gondii* in goats in the State of Alagoas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p.157-162, 2011.

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

ATASEVER, Ayhan et al. Japon Bildircinlarında (*Coturnix coturnix japonica*) Deneysel Toksoplazmozis. **Turkiye Parazitol Derg**, 41: 62-70, 2017.

BARCI, L. A.G., et al., Sarcocistose caprina: Prevalencia em animais provenientes do estado da Bahia-Brasil, com identificação do agente etiológico. **O Biológico**, v. 49, n. 4, p. 99 – 102, 1983

BEZERRA, M.J.G.; et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.62, p.421–424, 2015.

BISPO, M. S., et al. Frequência de anticorpos anti- *toxoplasma gondii* em propriedades de criação de caprinos e ovinos no estado de Pernambuco. **Ci. Animal Brasil.**, v.12, n.2, p. 291-297, 2011.

BITTENCOURT, M. V. et al. *Sarcocystis* spp. in sheep and goats: frequency of infection and species identification by morphological, ultrastructural, and molecular tests in Bahia, Brazil. **Parasitology Research**, v. 115, p. 1683 – 1689, 2016.

BJERKAS, I.; DUBEY, J. P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma* like parasite of Norwegian dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 32, p. 407-410, 1991.

CABRAL, D. D., et al. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de cães positivos e negativos a *Toxoplasma gondii*. In: **seminário brasileiro de parasitologia veterinária**, 11, 1999, Salvador, Anais... Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999.

CAMARGO, M.E. Alguns aspectos atuais do diagnóstico de laboratório da toxoplasmose. **Na. Academia Nacional de Medicina**, v.155, n.4, p. 236-239, 1995.

CAWTHORN, R. et al. In vitro excystation of *Sarcocystis capracanis*, *Sarcocystis cruzi*, and *Sarcocystis tenella* (Apicomplexa). **Journal of Parasitology**, v. 72, p. 880-884, 1986.

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

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

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

CLEMENTINO ANDRADE, M.M. et al. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.94, p.587-589, 2013.

COBERLLINE, L. G.; et al. Herd level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms Southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.74, p. 130-141, 2006

BRASIL, 2006. **CONAB**, 2006. Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento. Caprinocultura na Bahia. Disponível [on line: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/BA/caprinocultura_na_bahia.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/BA/caprinocultura_na_bahia.pdf).

CONG, W. et al., First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in common quails (*Coturnix coturnix*) intended for human consumption in China. **Infection, Genetics and evolution**, n. 49, p. 14-16, 2017.

CONRAD, P.A. et al. In vitro isolation and characterization of a *Neospora sp.* from aborted bovine fetuses. **Parasitology** v. 106, n. 3, p. 239–249, 1993.

COSTA, J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades Infecciosas. **Microbiología e Clínica**, v.22, n.55, p.299-305, 2004.

COSTA, D. G. C.; et al., Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Domestic and Wild Animals From the Fernando de Noronha, Brazil. **Journal Parasitology**, n. 98, v. 3, p. 679–680, 2012.

CZOPOWICZ, M. et al., Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. **Veterinary Parasitology**.v.178, p. 339-341, 2011.

DAFEDAR, M. A. et al., Prevalence of *Sarcocystosis* in Goats slaughtered at an abattoir in Bangalore, Karnataka state. **Veterinary World**, v.1, n. 11, p. 335-337

DAVIDSON, M. G. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North America small Animal Practice**,v. 30, p. 1051-1062, 2000.

DIAZ, P. et al., Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goats from north-western Spain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 23, n. 4, p. 587–590, 2016.

DUBEY, J. P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, p. 1061-1078, 1976.

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

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v.74, p. 75–77, 1998.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121-153, 2002.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. The Korean. **Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57–72, 2004.

DUBEY, J.P. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

DUBEY JP. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. **Boca Raton**: CRC Press, 2010

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

DUBEY, J. P.; et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal American Veterinary Medical Association** v. 192, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J.P, et al. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal Parasitology**, v. 32, p. 929–946, 2002.

DUBEY, J.P.; et al. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocysts shedding by cats. **Journal Parasitology**, v.89, n.4, p.861-863, 2003.

DUBEY, J.P.; et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. **Veterinary Parasitology**, 2006.

DUBEY, J. P. et al. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323–367, 2007.

DUBEY, J.P. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.157, p.299–305, 2008.

DUBEY, J.P. et al. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **Journal of Parasitology**, v. 96, p.709-712, 2010.

DUBEY, J. P. et al, Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, 2011

DUBEY, J.P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v.139, p.1375-1424, 2012.

DUBEY et al., An update *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, n. 209, p.1-42, 2015.

DUBEY et al., Sarcocystosis of Animals and Humans. Second edition. Ed **Boca Raton: CRC Press: 2016**

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis of rats: a review , with considerations of their value as an animal model and their possible role in Epidemiology. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 1-32, 1998.

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 1–34, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 90-108, 2011.

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

FAYER, R.; JOHNSON, A. J. Sarcocystis fusiformis: development of cysts in calves infected with sporocysts from dogs. **Proc. Helminthology Soc. Wash.**, v. 41, p. 105-108, 1974.

FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, n.104, p.133-148, 2009.

FIGLIUOLO, L. P. C. et al. Prevalence of anti- *Toxoplasma gondii* and anti- *Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 29-32, 2004.

FRENKEL, J.K. False-negative serologic tests for *Toxoplasma* in birds. **The Journal of Parasitology**, v. 67, n. 6, p. 952-953, 1981.

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

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**, n. 82, p.273-276, 1999.

GONDIM, L. F. P., et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 159-161, 2004a.

GONDIM, L. F. P., et al. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal Parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1361-1365, 2004b.

GONDIM, L. F. P., et al. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 33-39, 2005.

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 6, p. 247-252, 2006.

GORMAN, M. V. T. et al. Sarcoporysdirosis Y Toxoplasmosis caprina em la region metropolitana (Comunas de San Jose de Maypo y Til-til. **Archives Medicine Veterinary** v.18, n.2, 1986

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

Brasil, 2016. **IBGE**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário.

Disponível:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>>. Capturado em: 01/07/2017

JACOBS, L., et al., **Microbiologia Médica**. 18^oed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 518p, 1991.

JONES, J.L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis – Recent Developments. **Experimental Parasitology**. v. 124, p. 10–25, 2010.

KAMANI, J., et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep and goats in Borno state, Nigeria. **Tropical Animal Health and Production**, v.42, p. 793–797, 2010.

KILIÇ et al. Niğde Yöresinde Bildircinlarda (*Coturnix Coturnix Japonica*) *Toxoplasma Gondii* 'nin Seroprevalansı. **Kocatepe Veterinary Journal**, v.10, n. 3, p. 129 – 133, 2017.

KIM, J.H. et al. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korean **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 147–154, 2000.

KING, J. S., et al. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 945-950, 2010.

LADEIRO , M. P., et al. Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring. **Water Research**, n. 48, p. 148-155, 2014.

LATIF, B.M.A, et al., Prevalence of *Sarcocystis spp.* in meat-producing animals in Iraq. **Veterinary Parasitology**, n.84, p. 85–90, 1999.

LEFEVRE-PETTAZZONI, M. et al. Delayed maturation of immunoglobulin G avidity: implication for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. **European Journal Clinic Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 687-693, 2006.

LIMA, J.T.R.B.; et al.Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal veterinary Research animal Science**, v. 45, n. 2, 81-86, 2008.

LINDSAY, D. S. et al. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p. 1521-1523, 1999.

LOBATO, J. Detecção de anticorpos IgG anti- *Neospora caninum* em diferentes grupos de pacientes imunodeprimidos. 2006. 67f. **Dissertação** (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

LOPES, C. W. G. O gênero *Sarcocystis* (Lankester, 1882) (Apicomplexa: Sarcocystidae), uma questão a ser reavaliada no Brasil. **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária Ouro Preto**, MG, v.13, n.1, 2004

LOVU, A., et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy goats from Romania. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 470-474, 2012.

LUCIANO, D.M.; et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose em caprinos e ovinos de três municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 569-574, 2011.

MAGANGA, G. D., et al. Seroprevalence and risk factors of two abortive diseases, toxoplasmosis and neosporosis, in small ruminants of the Mongo County, Southern Gabon. **Small Ruminant Research**, n. 144, p. 56-61, 2016.

BRASIL, 2012. **MAPA**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 87, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2004. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/saude-de-caprinos-e-ovinos>. Capturado em 01/12/2017

MARSH, A.E., et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal Parasitology**, v. 84, n. 05, p. 983-991, 1998.

MCALLISTER, M. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal Parasitology**, v. 28, 1473–1478, 1998.

McCOLGAN C.; et al. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effect of subsequent challenge during pregnancy. **Veterinary Record**, v.123, p. 467-470, 1988.

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

MEDEIROS, A.D. de; et al. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in meat and dairy goat herds in Rio Grande do Norte, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 481-487, 2014.

MEIRELES, L.R.; et al. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal veterinary Research animal Science**, v. 40, n. 4, 2003.

MODOLO et al., Avaliação da ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, em soros de caprinos do estado de São Paulo, e associação com variáveis epidemiológicas, problemas reprodutivos e riscos à saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 606-610, 2008.

MOORE, D. P, et al. Serological evidence of *Neospora caninum* infections in goats from La Rioja Province, Argentina. **Small Rumin Res.**, n.73, p. 256-8, 2007.

MORAES, L.M.B., et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.**, Jaboticabal, v. 20, n. 4, p. 312-317, 2011.

MORENO, B., et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 312-318, 2012.

MÓRI, C, et al. Desempenho e qualidade dos ovos de codornas de quatro grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.34, n.3, p. 864-869, 2005.

MOURA, G.S.,et al . Dietas de diferentes densidades energéticas mantendo constante a relação energia metabolizável: nutrientes para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.37, n.9, p. 1628-1633, 2008.

MOURA, A.B. de; et al. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in goats in southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1367, 2016.

MUNHOZ, A.D.; et al. Studies of clinical signs and hematological alterations in japanese quails (*Coturnix japonica*) due to *Toxoplasma gondii* Nicolle and Monceaux, 1909 (Apicomplexa: toxoplasmatinae) experimental infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2004.

NÓBREGA P., et al. Toxoplasmose espontânea da galinha. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 22, p. 43-49, 1955.

NOBREGA, A. Estudo aponta tendências para caprinocultura e ovinocultura nos cenários nacional e internacional. 2016. Disponível on line: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8698648/estudo-aponta-tendencias-para-caprinocultura-e-ovinocultura-nos-cenarios-nacional-e-internacional>. Capturado em 01/12/2017.

NUNES, F.V.A.; VAEZ, R.J. Soroprevalência e fatores associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos de propriedades rurais do município de Mossoró. **Pesquisa de Veterinaria Brasileira**. n. 33, v. 5, p. 565-570, 2013.

NUNES, G.D.L.; et al. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the Bahia semi-arid goats. **Revista Brasileira de Ciencia Veterinária.**, v. 23, n. 3-4, p. 143-147, 2016.

OKITA, F. O. et al, Survey of Sarcocystis Species Infection in Slaughtered Goats in Makurdi Metropolis. **International Journal of Infectious Diseases and Therapy**, v.2, n.1, p. 4-8, 2017

PARK, B.K., et al. Comparative suscepibility of diferente cells lines of culture of *Toxoplasma gondii* in vitro. **Korean Journal of Parasitology**, v, 31, n.3, p.215-222, 1993.

PASTORE, S.M. et al. Panorama da coturnicultura no Brasil. **Revista eletrônica Nutritime**, v.9, n.6, p.2041-2049, 2012.

PEREIRA, M.F.; et al. Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 140-146, 2012.

PESCADOR, C.A.; et al. Perdas reprodutivas associadas com infeccao por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 27, p. 167-171, 2007.

PINTO, R. et al. Níveis de proteína e energia para codornas japonesas em Postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1761-1770, 2002.

RAGOZO, A. M. A. Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2007.

RAGOZO, A. M. A., et al. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo state, Brazil. **Journal Parasitology**, v.94 n.6, p. 1259–1263, 2008.

REGO, W. M. F., et al., Risk factors *Toxoplasma gondii* infection in goats and sheep raised in the state of Piauí in nostheast Brazil. **Small Ruminant Research**, n. 141, p. 17-23, 2016.

RIZZO, H., et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infectionin sheep in the northeastern region of Brazil. **Brazil Journal Veterinary Research Animal Science**. v. 54, n. 2, p. 139-146, 2017.

ROCHA, D. S., Levantamento sorológico, isolamento e caracterização genética de *Toxoplasma gondii* (Nicolle E Manceaux, 1909) em galinhas de vida livre (*Gallus domesticus*) abatidas na Bahia. 67p. **Tese** (Doutorado em Ciencia Animal), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

SANTOS, C.S.A.B., et al. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* seroprevalence in goats in the State of Paraíba, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, 399-404, 2012.

SHEKARFOROUSH, S. M. et al., Prevalence of Sarcocystis species in slaughtered goats in Shiraz, Iran S. S. **Veterinary Record**, n. 156, p. 418-420, 2005.

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

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

SILVA, L.A., et al. Toxoplasmose em ovinos e caprinos estudo Soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p. 115-119, 2003.

SILVA, F. W. S., et al. Toxoplasmose: uma revisão. **Ciência Animal**, v.16, n.2, p. 71-77, 2006.

SILVAM. S. A., et al. Detection of *hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**. n.162, p. 156-9, 2009

SILVA, J.H.V., et al. Exigências nutricionais de codornas. In: **XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia- ZOOTEC**, 21. Anais... Maceió: UFAL, 2011.

SILVA, J. G. da, et al. Occurrence of anti- *Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep and goats of local breeds reared in Northeastern Brazil. **Acta tropica**, v. 142, p. 145-148, 2015

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

SOARES, R.M. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, p.29-34, 2011.

STACCHISSINI, A. V. M., Influência da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina nos perfis soro-epidemiológicos em caprinos infectados pelo *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. 119p **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, 2005.

TEMBUE, A. M. S. M., et al., Serological survey of *Neospora caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 246-248, 2011.

TENTER, A. M. Current research on Sarcocystis species of domestic animals. **International Journal of Parasitology**, v. 25, p. 1311-1330, 1995.

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

TOPÁZIO, J. P., et al., Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in goats in Santa Catarina state, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 360-366, 2014

UENO, T. E. H. Prevalência das infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil. 2005. 107 f. **Dissertação** (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

UZEDA, R.S. et al., Fatores relacionados à presença de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros do Estado da Bahia. **Revista Brasileira Saude Produção Na.**, v.5, n.1, p.1-8, 2004

UZÊDA RS, et al., Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. **Small Rumin Res.** v. 70, p. :257-9, 2007.

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

VARASCHIN, M.S., et al. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2011.

WAPENAAR, W. et al., “Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle,”. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 166– 173, 2007.

ZHAO, G.H., et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy goats in Shaanxi Province, Northwestern China. **Parasites & Vectors**, n.4, v.47, 2011

ANEXO
QUESTIONÁRIO

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTOR

NOME _____ Propriedade: _____

Tel.: _____

Reside na propriedade? () Sim () Não

Município da propriedade: _____

Principal fonte de renda: () Caprino/ovinocultura () Outra. Qual? _____

Quantas pessoas da família:

Residem na propriedade? _____ pessoas. Trabalham na propriedade? _____ pessoas.

Número de funcionários da propriedade (exceto os familiares): _____ pessoas.

PROPRIEDADE

ÁREA: Total (ha): _____ De pastagens (ha): _____

Rebanho Caprino: _____ Rebanho Ovino: _____

Possui aprisco? () Sim () Não.

Qual o tipo de piso? () Chão batido () Ripado () Cimentado () Outro: _____

Faz divisão de pastagens? () Sim () Não

Características da propriedade: () Presença de vegetação nativa () Presença de águas limpas salobras ou alcalinas () Outros

Quais espécies cria na propriedade para fins de produção?

() Caprinos () Ovinos () Caprinos e Ovinos () Eqüinos () Suínos
() Aves () Bovinos

Presença de bovinos: () Na propriedade () Em propriedades vizinhas () Não há bovinos na propriedade ou áreas próximas a ela.

Presença de felinos: () Na propriedade () Em propriedades vizinhas () Não há felinos na propriedade ou áreas próximas a ela.

Presença de caninos: () Na propriedade () Em propriedades vizinhas () Não há caninos na propriedade ou áreas próximas a ela.

ALIMENTAÇÃO

Tipo de pastejo: () Rotacionado () Contínuo () Outro: _____

Suplementação: () Sim () Não

- () Feno. Tipo de forragem: _____
- () Cana. Com uréia? _____
- () Concentrado. Tipo:() Comercial () Feito na propriedade () Outro: _____
- () Sal mineral. Tipo:() Sal comum () Sal mineralizado

Na propriedade existe alguma instalação utilizada para estocar alimentos destinados à suplementação de caprinos e/ou ovinos?() Não () Sim.

E gatos (domésticos ou selvagens) têm acesso a estas instalações? () Não () Sim () Às vezes

A água oferecida aos caprinos/ovinos é proveniente de:

- () Cacimba () Açude () Lagoa () Poço profundo () Cisterna () Poço artesiano

A água é oferecida aos caprinos/ovinos em:

- () Vasilhames dentro das instalações () Vasilhames fora das instalações () Os animais bebem direto na fonte (açude, barragem, etc.)

Acompanhamento técnico? () Não () Sim.

MANEJO DAS CRIAS (CAPRINOS E/OU OVINOS)

Identificação individual dos animais:() Não faz () Brinco () Tatuagem () Medalha () Outro: _____

Corte e cura do umbigo:() Não faz () Com iodo () Com creolina () Outro: _____

Tipo de colostro dado aos filhotes: () Colostro de vaca () Colostro artificial () Colostro de ovelha () Colostro de cabra *in natura*

Aleitamento: () Natural () Artificial () Leite de cabra () Leite de ovelha () Leite de vaca

Castração:() Não () Sim

Idade de castração: () 10 a 30 dias () 31 a 60 dias () 61 a 90 dias () Mais de 90 dias

Idade da desmama (apartação):() 1 mês () 2 meses () 3 meses () 4 meses () 5 meses ou mais

REBANHO CAPRINO

Tipo de exploração:() Carne () Leite () Mista () Intensiva () Semi-intensiva () Extensiva

Reprodutores:() Comprados () Trocados () Emprestados Tempo de permanência do reprodutor na propriedade: _____

MANEJO SANITÁRIO DOS CAPRINOS

Alterações observadas no rebanho CAPRINO (**marque** comum “**X**” as observadas e **adicionalmente, sublinhe** as mais freqüentes:

- () Aborto
- () Nascimento de cordeiros fracos ou com anomalias
- () Artrites
- () Bicheira (Mífase)
- () Ceratoconjuntivite
- () Edema de face – inchaços no lábio, língua ou mandíbula
- () Corrimento nasal com aparecimento de crostas (cascas)
- () Diarréias freqüentes
- () Linfadenite caseosa (mal do caroço)
- () Pneumonias
- () Pododermatite – inflamação dos cascos e manqueira
- () Carrapatos
- () Bernes
- () Nenhum

Vermifugação: () Não () Sim. () O mesmo dos caprinos () Diferente dos caprinos. Freqüência: _____ Produto: _____

Alternância de produtos: () Não () Sim. Periodicidade: _____

Corte de cascos: () Não () Sim. Freqüência: _____

Reprodução: () Monta Natural () Monta Controlada () Inseminação Artificial
Estação de monta? () Não () Sim. Época e duração: _____

Os gatos têm acesso às baias de ovinos? () Sim () Não

Os gatos têm acesso à água oferecida aos ovinos? () Às vezes () Não () Sim

Na área onde está localizada a propriedade, é comum a presença de gatos selvagens?

() Não () Sim.

Em caso positivo, tem acesso às baias de ovinos? () Às vezes () Não () Sim

Os ovinos têm contato direto com: () Cães () Gatos () Animais silvestres.

Especificar: _____

() Bovinos () Caprinos () Equinos () Suínos

PRODUÇÃO DE CARNE E LEITE DE CAPRINOS

Vende os caprinos: () No próprio município () Para outras cidades () Para outros Estados

Vende os caprinos: () Em pé () Abatidos

Preço médio obtido por Kg: R\$ _____

Destino dos caprinos comercializados para abate: () Frigorífico () Intermediário ()

Mercado local (ao consumidor)

Época de maior procura de caprinos para abate:() Início do ano () Meio do ano ()

Final do ano

O abate é feito em que idade? () Com menos de 6 meses () Entre 6 e 12 meses ()

Mais de 12 meses

Peso médio dos caprinos ao abate:Jovens: _____ Kg Adultos: _____ Kg

Utiliza carne caprina para consumo familiar? () Não () Sim. Peso médio dos animais

consumidos: _____ Kg

Dificuldades encontradas na comercialização:() Preço () Falta de frigoríficos na região

() Longa distância dos frigoríficos () Falta de comprador () Falta de curtumes na região ()

Outras: _____