



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA MOREIRA DA FONSECA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *TOXOPLASMA GONDII* E
MONITORAMENTO DE *NEOSPORA CANINUM* NO LEITE CRU DE VACAS
NATURALMENTE INFECTADAS

CURITIBA

2022

FLÁVIA MOREIRA DA FONSECA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *TOXOPLASMA GONDII* E
MONITORAMENTO DE *NEOSPORA CANINUM* NO LEITE CRU DE
VACAS NATURALMENTE INFECTADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Clínica Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof. Dra. Rosângela Locatelli Dittrich
Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Constanza Rodriguez

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Fonseca, Flávia Moreira da

Diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii* e monitoramento de *Neospora caninum* no leite cru de vacas naturalmente infectadas. / Flávia Moreira da Fonseca. – Curitiba, 2022.
1 recurso online: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profa. Rosangela Locatelli Dittrich.

Coorientadora: Profa. Maria Constanza Rodriguez

1. Diagnóstico molecular. 2. Sorologia. 3. Protozoários. 4. Bovinos de leite. I. Dittrich, Rosangela Locatelli. II. Rodriguez, Maria Constanza. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de FLAVIA MOREIRA DA FONSECA intitulada: *Diagnóstico molecular de Toxoplasma gondii e monitoramento de Neospora caninum no leite cru de vacas naturalmente infectadas*, sob orientação da Profa. Dra. ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Outubro de 2022.

Assinatura Eletrônica

11/10/2022 10:45:53.0

ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/10/2022 08:24:47.0

JOÃO HENRIQUE PEROTTA

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/10/2022 08:32:51.0

RENATO ANDREOTTI E SILVA

Avallador Externo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA)

Assinatura Eletrônica

10/10/2022 08:24:33.0

IVAN ROQUE DE BARROS FILHO

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/10/2022 08:54:16.0

LUIZ DANIEL DE BARROS

Avallador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: cpgcv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 225963

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prrpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 225963

Dedico esse trabalho a todos que de alguma forma contribuíram para que esse projeto fosse possível. E a todos amigos de focinhos e quatro patas que me acompanharam durante esse trabalho, em especial as vacas: Mika, Bele, Patativa, 126, 37, 64, Michele, 100, Drica, Red, Parda e Veneza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto e me acompanharam nessa caminhada.

Aos meus pais, Marli Cecília e Urandi, pelo incentivo, gratidão especial a minha mãe que sempre deu todo o suporte e apoio para que eu tivesse condições de seguir esse caminho.

Ao meu irmão Tiago, por me apoiar, aconselhar e ser um grande incentivador para que eu siga o caminho acadêmico.

À minha prima do coração Eliane Cristina Pereira, *In memoriam*. Que sempre torceu por mim.

Aos amigos da vida por sempre torcerem por mim e me apoiarem: Juliane, Christiane e Jéssica. Em especial à minha amiga Delaine, por me ouvir e fazer rir nos momentos difíceis. E aos amigos que mesmo de longe se fazem presentes, em especial ao Everton, por ser a leveza e o bom humor nos dias difíceis, por vibrar junto com cada conquista e pelo incentivo e carinho de sempre.

À minha psicóloga Mariangela Freitas pelo acolhimento nos momentos de fragilidade e ansiedade, por me guiar no caminho do autoconhecimento e por sempre me incentivar a acreditar mais em mim mesma.

À minha orientadora Prof. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich pela paciência e dedicação com que conduziu essa orientação, e pelo estímulo para que eu continue no meio acadêmico. Por sempre me fazer acreditar que sou capaz, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha co-orientadora Maria Constanza Rodríguez por toda ajuda e ensinamentos, pela paciência, carinho e dedicação com que conduziu essa co-orientação. Pela oportunidade de aprender novas técnicas e me contagiar com o “mundo” do PCR em tempo real.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária. Aos ex-residentes e residentes Daiane, Maiara, Wesley, Penélope, Maritza e Osayane, ao técnico Olair Carlos Beltrame e as pós-

graduandas Aline e Luciana. Pela convivência diária, a descontração e os cafés que tornaram os dias no laboratório ainda melhores

À técnica Louise Cristine Cândido, por estar sempre disponível para ajudar, ser sempre tão solícita e prestativa. Pela amizade, os momentos de descontração e as melhores risadas.

Em especial, a minha amiga, parceira de laboratório e doutorado Ana Paula Sato, pela parceria e amizade; por ouvir meus desabafos quando tudo parecia dar errado, por todo aprendizado e cumplicidade, pelas risadas, por tornar essa jornada mais leve, sem o apoio mútuo essa caminhada seria mais difícil.

Às amigas e colegas Gabriela e Giovana por toda ajuda e apoio nas coletas e idas as propriedades. Pela parceria em madrugar para acompanhar as ordenhas e o “empurrãozinho” quando tudo parecia dar errado e foi necessário recomeçar, sem vocês não teria sido possível.

À técnica Kelly Barba, *In memoriam*. Por estar sempre disponível para ajudar e tirar dúvidas e sempre nos receber com carinho no Laboratório de Biologia Molecular.

À Dra. Marília Koch de Oliveira pela amizade e a paciência e disposição em auxiliar e tirar dúvidas mesmo a distância.

Aos médicos veterinários do Setor de Grandes Animais da UFPR, Mateus Mohr e Jéssica Janiszewski pelo auxílio nas coletas de sangue, em especial a doutoranda e servidora Ana Paula Busch pela parceria nas coletas, pela paciência em ensinar as técnicas de coletas e sobre o mundo dos ruminantes.

Aos servidores do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti pela oportunidade de aprendizado, por estarem sempre disponíveis a ajudar e os receber com tanta gentileza, em especial as médicas veterinárias Mara, Claudinha e Cidinha.

Ao seu Pedro Bilonicki por se disponibilizar no seu serviço de motorista nos diversos trajetos do laboratório e até as saídas de madrugada para acompanhar as ordenhas, pela paciência, os conselhos e a amizade.

Aos produtores das propriedades inclusas no projeto pela colaboração, em especial ao seu Luiz Roberto da Chácara Estopa por

fornecer informações e permitir a realização da etapa de monitoramento em sua propriedade e sempre nos receber com paciência e gentileza.

Ao Médico Veterinário Cirino pela indicação e contato dos produtores da Região Metropolitana de Curitiba para inclusão no projeto.

Aos Professores Ivan de Barros Filho e João Henrique Perotta pelo auxílio no contato com os produtores e nas coletas

À instituição Universidade Federal do Paraná (UFPR), aos Professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV-UFPR). Em especial à Gislaine, ex-secretária da Pós Graduação que sempre atendeu de forma atenciosa e prestativa as nossas demandas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

“Temos que acreditar em nós mesmos ou mais ninguém acreditará; temos de acompanhar as nossas aspirações com competência, coragem e determinação para atingir o sucesso”.

Rosalin Yalow

RESUMO

Estudos sobre a detecção de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* no leite de vaca são escassos e ainda existem lacunas no conhecimento sobre alguns aspectos da epidemiologia e diagnóstico desses protozoários. A presente tese está dividida em uma revisão de literatura e em quatro capítulos. O capítulo I compara os métodos sorológicos Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireta (ELISA) para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas leiteiras. Das 106 amostras de sangue coletadas, a prevalência de anticorpos foi de 24,5% na RIFI e 27,3% no ELISA e de 15% em ambos os testes. A concordância entre as técnicas foi moderada. Foram observadas divergências principalmente em níveis mais baixos de anticorpos e a concordância foi maior no ponto de corte de 1:100. O capítulo II teve como objetivos detectar o DNA de *T. gondii* em amostras de leite cru e avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em vacas leiteiras de seis pequenas propriedades do sul do Brasil. Foram coletadas amostras pareadas de sangue e leite de 106 vacas e amostras de leite dos tanques foram coletadas de cada propriedade. A ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* pela RIFI foi de 14,1%. O DNA de *T. gondii* foi detectado pela *nested* PCR e os produtos confirmados por sequenciamento de Sanger em 2,8% das amostras de leite. Não foi detectado DNA em nenhuma amostra de leite dos tanques. O capítulo III objetivou padronizar e validar um ensaio de PCR em tempo real baseado em SYBR Green para detectar o segmento Nc5 do genoma de *N. caninum*. Foi selecionado o conjunto de primers NP7/NP10 e as condições de reação foram otimizadas. A análise da curva padrão estabeleceu uma eficiência de reação de 102,34%, um coeficiente de correlação (R²) de 0,999 e slope de -3.267. O limite de detecção (LOD) foi de 0,456 taquizoítos por reação. O ensaio de PCR em tempo real foi 100 vezes mais sensível que a PCR convencional. A análise de precisão demonstrou 100% de repetibilidade intra e inter-ensaio nas diluições 1-10⁻⁴. O ensaio exibiu alta especificidade pela análise da curva de dissociação e não foram observadas reações cruzadas com outros microrganismos. O ensaio foi aplicável à detecção de *N. caninum* em diferentes matrizes, incluindo o leite. O capítulo IV objetivou detectar o DNA de *N. caninum* em amostras de leite cru, monitorar a cinética de anticorpos séricos e a eliminação do protozoário no leite de vacas naturalmente infectadas. Amostras pareadas de sangue e leite de 12 vacas em lactação foram coletadas quinzenalmente por três meses. *Neospora caninum* foi detectado em 31,9% das amostras de leite testadas pela PCR em tempo real. Nenhuma amostra de leite foi positiva na PCR convencional. A eliminação do protozoário foi intermitente. Os níveis de anticorpos IgG detectados pela RIFI e o ELISA no soro flutuaram ao longo do tempo, mas não estiveram relacionados com a eliminação do protozoário no leite. Testes moleculares no leite podem ser ferramenta útil para a melhor compreensão da epidemiologia da toxoplasmose e da neosporose.

Palavras-chave: diagnóstico molecular; sorologia; rebanhos leiteiros; protozoários.

ABSTRACT

Studies on the detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in cow's milk are scarce and there are still gaps in knowledge about some aspects of the epidemiology and diagnosis of these protozoa. This thesis is divided into a literature review and four chapters. Chapter I compares the serological methods Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of anti-*N. caninum* antibodies in dairy cows. From 106 blood samples collected, the prevalence of antibodies was 24.5% in the IFAT and 27.3% in the ELISA, and 15% in both tests. The agreement between the techniques was moderate. Differences were observed mainly at lower levels of antibodies and agreement was higher at the cutoff point of 1:100. Chapter II aimed to detect *T. gondii* DNA in raw milk samples and to evaluate the occurrence of anti-*T. gondii* antibodies in dairy cows from six small farms in southern Brazil. Paired blood and milk samples were collected from 106 cows, and bulk-tank milk samples were collected from each farm. The occurrence of anti-*T. gondii* antibodies by IFAT was 14.1%. *T. gondii* DNA was detected by nested PCR and the products confirmed by Sanger sequencing in 2.8% of the milk samples. No DNA was detected in any milk sample from the bulk-tank. Chapter III aimed to standardize and validate a SYBR Green-based real-time PCR assay to detect the Nc5 segment of the *N. caninum* genome. The NP7/NP10 primer set was selected and reaction conditions were optimized. Standard curve analysis established a reaction efficiency of 102.34%, a correlation coefficient (R²) of 0.999 and slope of -3.267. The limit of detection (LOD) was 0.456 tachyzoites per reaction. The real-time PCR assay was 100 times more sensitive than conventional PCR. Precision analysis demonstrated 100% intra- and inter-assay repeatability at dilutions 1-10⁻⁴. The assay exhibited high specificity by dissociation curve analysis and no cross-reactions with other microorganisms were observed. The assay was applicable for detection of *N. caninum* in different matrices, including milk. Chapter IV aimed to detect *N. caninum* DNA in raw milk samples, monitor serum antibody kinetics and protozoan shed in milk from naturally infected cows. Paired blood and milk samples from 12 lactating cows were collected every other week for three months. *Neospora caninum* was detected in 31.9% of the milk samples tested by real-time PCR. No milk samples were positive by conventional PCR. The excretion of the protozoan was intermittent. IgG antibody levels detected by IFAT and ELISA in serum fluctuated over time, but were not related to shed of the protozoan in milk. Molecular testing of milk may be a useful tool for better understanding the epidemiology of toxoplasmosis and neosporosis.

Keywords: molecular diagnosis; serology; dairy herds; protozoa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivos gerais	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
REFERÊNCIAS	19
2. REVISÃO DE LITERATURA COM ENFÂSE NO DIAGNÓSTICO E TRANSMISSÃO LACTOGÊNICA	22
2.1 NEOSPORA CANINUM	22
2.2 <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	25
2.3 DIAGNÓSTICOS DA NEOSPOROSE E DA TOXOPLASMOSE	27
2.4 RISCO DE TRANSMISSÃO LACTOGÊNICA	29
REFERÊNCIAS	31
3. CAPÍTULO I. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-NEOSPORA CANINUM EM VACAS LEITEIRAS NO SUDESTE DO PARANÁ	38
3.1. INTRODUÇÃO	40
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.2.1 Animais e área de estudo	42
3.2.2. Coleta e processamento das amostras	42
3.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	43
3.2.4. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (ELISA)	43
3.2.5 Estatística	44
3.3. RESULTADOS	44
3.4 DISCUSSÃO	46
3.5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50
4. CAPÍTULO II. DETECTION OF TOXOPLASMA GONDII DNA IN MILK FROM DAIRY COWS	54
4.1 INTRODUCTION	55
4.2. MATERIALS AND METHODS.....	56

4.2.1 Animals and study area	57
4.2.2 Sample collection	58
4.2.3 Serological test - Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT).....	58
4.2.4 Sample pre-treatment and DNA extraction	59
4.2.5. Nested PCR.....	59
4.2.6 Real time PCR.....	60
4.2.7 Sequence analysis	61
4.2.8 Statistical analysis	61
4.3 RESULTS.....	62
4.4 DISCUSSION	64
4.5 CONCLUSION	67
REFERENCES.....	67
5. CAPÍTULO III. STANDARDIZATION OF A SYBR GREEN REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF THE Nc5 SEGMENT FROM NEOSPORA CANINUM	73
5.1 INTRODUCTION.....	74
5.2 MATERIAL AND METHODS	76
5.2.1 Validation of primer sequences	76
5.2.2 Optimization.....	77
5.2.3 Tachyzoites quantification	77
5.2.4. DNA Extraction	78
5.2.6 Real-time PCR assay	79
5.2.6.1 <i>N. caninum</i>	79
5.2.6.2 18S	79
5.2.7 Efficiency - Standard Curve.....	80
5.2.8 Precision, Analytical Sensitivity and Specificity	80
5.2.9 Statistical analysis	81
5.3 RESULTS.....	81
5.3.2 Efficiency/ Standard curve.....	82

5.3.3 Precision and Limit of Detection (LOD)	83
5.3.4 Sensitivity	85
5.4 DISCUSSION	87
5.5 CONCLUSION	90
REFERENCES.....	90
6. CAPÍTULO IV. MONITORAMENTO DA CINÉTICA DE ANTICORPOS ANTI-NEOSPORA CANINUM NO SORO E DETECÇÃO MOLECULAR DO PROTOZOÁRIO NO LEITE DE VACAS NATURALMENTE INFECTADAS	95
6.1 INTRODUÇÃO	97
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	99
6.2.1 Seleção dos animais e desenho do estudo	99
6.2.2 Coleta e processamento das amostras	99
6.2.3 Sorologia	100
6.2.4 Pré-tratamento das amostras de leite e extração do DNA	101
6.2.5 PCR convencional	101
6.2.6 PCR em tempo real	102
6.2.7 Análise estatística.....	103
6.3 RESULTADOS	103
6.4 DISCUSSÃO	107
6.5 CONCLUSÃO.....	110
REFERÊNCIAS.....	110
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
REFERÊNCIAS.....	117
APÊNDICE 1 - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS DE LEITE	132
APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO REALIZADO COM OS PRODUTORES DAS PROPRIEDADES INCLUÍDAS NO ESTUDO	134
ANEXO 1.....	142
ANEXO 2	143

1. INTRODUÇÃO GERAL

Neospora caninum e *Toxoplasma gondii* são parasitos intracelulares obrigatórios e de distribuição mundial (ANTONY; WILLIAMSON, 2001; DUBEY, 2008, MEIRELLES *et al.*, 2014). Esses protozoários compartilham algumas semelhanças morfológicas, mas são biologicamente distintos (DUBEY; SCHARES, 2011). Ambos pertencem ao filo Apicomplexa e estão comumente relacionados à abortamentos e distúrbios reprodutivos em bovinos (SANTOS *et al.*, 2005), ovinos e caprinos (MOTTA *et al.*, 2008; NAYERI *et al.*, 2021), causando perdas econômicas importantes nos rebanhos (LIU *et al.*, 2020).

A infecção por *N. caninum* é considerada uma causa importante de abortamento em bovinos, com perdas econômicas estimadas em mais de um bilhão de dólares em nível mundial (GEORGIEVA; PRELEZOV; KOINARSKY, 2006; REICHEL *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2019). A soroprevalência em bovinos no Brasil é elevada (RAGOZO *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2019) e a ocorrência do protozoário já foi relatada em todas as mesorregiões do Paraná (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2019). Devido ao seu alto potencial de transmissão congênita, mais de 80% dos bezerros de vacas soropositivas nascem infectados, a neosporose pode permanecer cronicamente por várias gerações nos rebanhos (DUBEY, 2003; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Cerca de um terço da população humana mundial já foi exposta ao *T. gondii* (MOLAN; WANG; HUNTER, 2019; SHARIATZADEH *et al.*, 2021) e anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em mais de 50% das mulheres brasileiras em idade reprodutiva, fazendo do Brasil um dos grandes cenários de surtos da doença com grandes implicações na saúde pública (DUBEY *et al.*, 2012). A toxoplasmose apresenta alta prevalência em seres humanos e animais no Brasil, é uma causa importante de infecção congênita e acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos (DUBEY *et al.*, 2012; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Alguns aspectos da epidemiologia da toxoplasmose em bovinos ainda são desconhecidos (GOMES *et al.*, 2020). As vacas aparentemente são clinicamente

resistentes ao *T. gondii* (NAYERI *et al.*, 2021), mas a soroprevalência do protozoário é relativamente elevada nessa espécie e os bovinos atuam como hospedeiros intermediários e reservatórios do parasito (DUBEY & JONES, 2008; SHARIATZADEH *et al.*, 2021).

O papel do leite na transmissão de *N. caninum* e de *T. gondii* ainda não é claro (BOUGHATTAS, 2017). Acredita-se que taquizoítos circulantes excretados no leite podem ser uma fonte de infecção (DEHKORDI *et al.*, 2013). Embora não existam relatos de infecção natural, estudos experimentais demonstraram que bezerros podem ser infectados com leite e colostro inoculados com taquizoítos de *N. caninum* (UGGLA *et al.*, 1998; DAVISON *et al.*, 2001). Em seres humanos, casos de transmissão da toxoplasmose pelo consumo de leite de cabra não pasteurizado já foram registrados (SACKS; ROBERTO; BROOKS, 1982; CHIARI; NEVES, 1984) e consumo de leite cru de vaca é considerado um fator de risco (SILVA *et al.*, 2014).

O leite de vaca é consumido no mundo todo (BOUGHATTAS, 2017; BORAWSKI *et al.*, 2021), o Brasil se destaca como o segundo maior rebanho de vacas leiteiras do mundo (FAO, 2022) e segundo dados do IBGE o Paraná é o segundo maior estado produtor de leite no país (IBGE, 2021). No entanto, evidências sobre a detecção do *N. caninum* e do *T. gondii* no leite de vaca ainda são limitadas (BOUGHATTAS, 2017). Os aspectos que influenciam a excreção desses protozoários no leite bem como as suas implicações, ainda são desconhecidos e precisam ser melhor investigados (MOSKWA; CABAJ, 2007).

O diagnóstico da neosporose e da toxoplasmose é baseado em métodos diretos e indiretos e inclui análises sorológicas, moleculares e histopatológicas (LINDSAY, DUBEY *et al.*, 2020). A ausência de um padrão-ouro para o diagnóstico de *N. caninum* é um grande desafio para o controle dessa infecção nos rebanhos e para a validação de novos métodos (MCALLISTER, 2016; MANSILLA *et al.*, 2019). Alternativas para o diagnóstico *in vivo* (SINNOTT *et al.*, 2017) e o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos e confiáveis para a detecção do protozoário vem sendo o foco dos estudos nas últimas décadas (REICHEL; WAHL; ELLIS, 2020). Testes moleculares em amostras de leite podem ser uma alternativa, mas ainda são pouco explorados para o diagnóstico de protozoários e são necessárias maiores investigações para serem implementados na rotina.

A presente tese está dividida em uma Revisão de literatura sucinta sobre o diagnóstico da neosporose e toxoplasmose, e a possibilidade da transmissão lactogênica e em quatro artigos científicos na forma de capítulos.

O capítulo I “Comparação de métodos sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas leiteiras no Sudeste do Paraná” determina a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* comparando os métodos RIFI e ELISA em rebanhos leiteiros do Sudeste do Paraná”. O capítulo II “Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in milk from dairy cows” descreve a detecção do DNA de *T. gondii* em amostras de leite cru e estabelece a soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em vacas leiteiras em pequenas propriedades da região Sudeste do Paraná. O capítulo III “Standardization of a SYBR green real-time PCR assay for detection of the Nc5 segment for diagnosis of *Neospora caninum* ” consiste na padronização e validação de um protocolo de PCR em tempo-real baseado em SYBR green para a detecção do segmento Nc5 para o diagnóstico de *N. caninum* em diferentes tipos de matrizes, incluindo o leite. O capítulo IV “Monitoramento da cinética de anticorpos anti-*Neospora caninum* no soro e da detecção molecular do protozoário no leite de vacas naturalmente infectadas” relata o monitoramento da cinética de anticorpos no soro e da detecção molecular do *N. caninum* no leite cru de vacas naturalmente infectadas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

- Verificar a soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos leiteiros.
- Detectar *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em amostras de leite de vaca cru por meio de técnicas moleculares.
- Padronizar um método de PCR por tempo-real (qPCR) para o diagnóstico de *Neospora caninum* em amostras de leite.

- Monitorar a eliminação de *Neospora caninum* no leite de vacas leiteiras naturalmente infectadas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Comparar e avaliar a concordância dos métodos ELISA indireto (iELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) na detecção de soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em rebanhos leiteiros.
- Detectar o DNA de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em amostras leite cru utilizando a reação da polimerase em cadeia (PCR).
- Adaptar, otimizar e validar um método de PCR convencional para qPCR por SYBR green para o diagnóstico de *Neospora caninum* em diferentes tipos de amostras
- Monitorar por PCR a presença de *Neospora caninum* em leite de vacas soropositivas
- Monitorar a cinética de anticorpos séricos anti-*Neospora caninum* no soro de vacas naturalmente infectada

REFERÊNCIAS

- ANTONY, A.; WILLIAMSON, N. B. Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, n. 2, p. 42-47, 2001.
- BOUGHATTAS, S. Toxoplasma infection and milk consumption: Meta-analysis of assumptions and evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2924-2933, 2017.
- CHIARI, C. A.; NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 3, p. 337-340, 1984.
- DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, 1999.
- DEHKORDI, F.S. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 120-125, 2013.
- 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.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- DUBEY, J.P. The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.
- DUBEY, J.P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, 2011.
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. **FAO STAT - Livestock Primary**. Roma, Italy, 2022. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 10 Jul. 2022.
- GEORGIEVA, D. A.; PRELEZOV, P. N.; KOINARSKI, V. T. S. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. A review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-26, 2006.
- GOMES, D.F.C., *et al.* *Toxoplasma gondii* in cattle in Brazil: A review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v29, e015719, 2020.

GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, P.J.; ELLIS, J.T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133-150, 2013.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA; **Estatística. Produção agropecuária PPM - Pesquisa Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha>. Acesso em: 13 de dezembro de 2022.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants: an update. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 205-222, 2020.

LIU, Y.; REICHEL, M.P.; LO, W-C. Combined control evaluation for *Neospora caninum* infection in dairy: Economic point of view coupled with population dynamics. **Veterinary Parasitology**, v. 277, 108967, 2020.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 191-195, 2008.

MANSILLA, F.C. *et al.* Development and validation of a novel ELISA for the detection of *Neospora caninum* antibodies in bovine sera. **Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v.7, n.2, não p. , 2019.

MCALLISTER, M.M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

MEIRELLES, A.C.F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta.. **Ciência Rural**, v. 44, n. 12, p. 2204-2209, 2014.

MOLAN, A.A.L., WANG, W., HUNTER, M.L. Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots. **Tropical Biomedicine**, 36, p.898-925, 2019.

MOTTA, A.C. da. *et al.* Aborto em ovinos associado à toxoplasmose: Caracterização sorológica, anátomo-patológica e imunoistoquímica. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 204-208, 2008.

NAYERI, T. *et al.* Global prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the aborted fetuses and ruminants that had an abortion: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 290, 109370, 2021.

RAGOZO, A.M.A *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

REICHEL, M.P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

REICHEL, M.P.; WAHL, L.C.; ELLIS, J.T. Research into *Neospora caninum*—what have we learnt in the last thirty years? **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 505, 2020.

RIBEIRO, C.M. *et al.* Meta-analysis of the prevalence and risk factors associated with bovine neosporosis. **Tropical animal health and production**, v. 51, n. 7, p. 1783-1800, 2019.

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

SANTOS, A.P.M.E. *et al.* Dairy cow abortion associated with *Neospora caninum* and other infectious agents. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 545-547, 2005.

SHARIATZADEH, S.A. *et al.* The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in bovines: A systematic review and meta-analysis. **Parasitology**, v. 148, 1417-1433, 2021.

SILVA, da M.G. *et al.* Epidemiological factors associated with seropositivity for toxoplasmosis in pregnant women from Gurupi, State of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 469-475, 2014.

SINNOTT, F.A. *et al.* Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011–2016). **Veterinary Parasitology**, v. 239, p. 19-25, 2017.

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

UGGLA, A. *et al.* Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1467-1472, 1998.

2. REVISÃO DE LITERATURA COM ENFÂSE NO DIAGNÓSTICO E TRANSMISSÃO LACTOGÊNICA

2.1 NEOSPORÁ CANINUM

Em 1984 foi identificado um protozoário causador de encefalomielite e miosite em cães (BJERJKAS, MOHN, PRESTHUS, 1984), que em 1988 foi reconhecido como *Neospora caninum* (DUBEY *et al.*, 1988). Desde então esse parasito formador de cistos tem sido detectado em uma ampla variedade de animais domésticos e em alguns animais selvagens (DUBEY; SCHARES, 2011, DONAHOE *et al.*, 2015; LINDSAY; DUBEY, 2020).

No Brasil, *N. caninum* foi relatado pela primeira vez em 1999, em feto bovino (GONDIM *et al.*, 1999). A infecção por *N. caninum* possui uma elevada soroprevalência em bovinos no Brasil, que pode variar entre 12,7 e 97,2 % conforme a região do país e foi reportada em vários estados, como Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro (RAGOZO *et al.*, 2003; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; DUBEY; SCHARES, 2011).

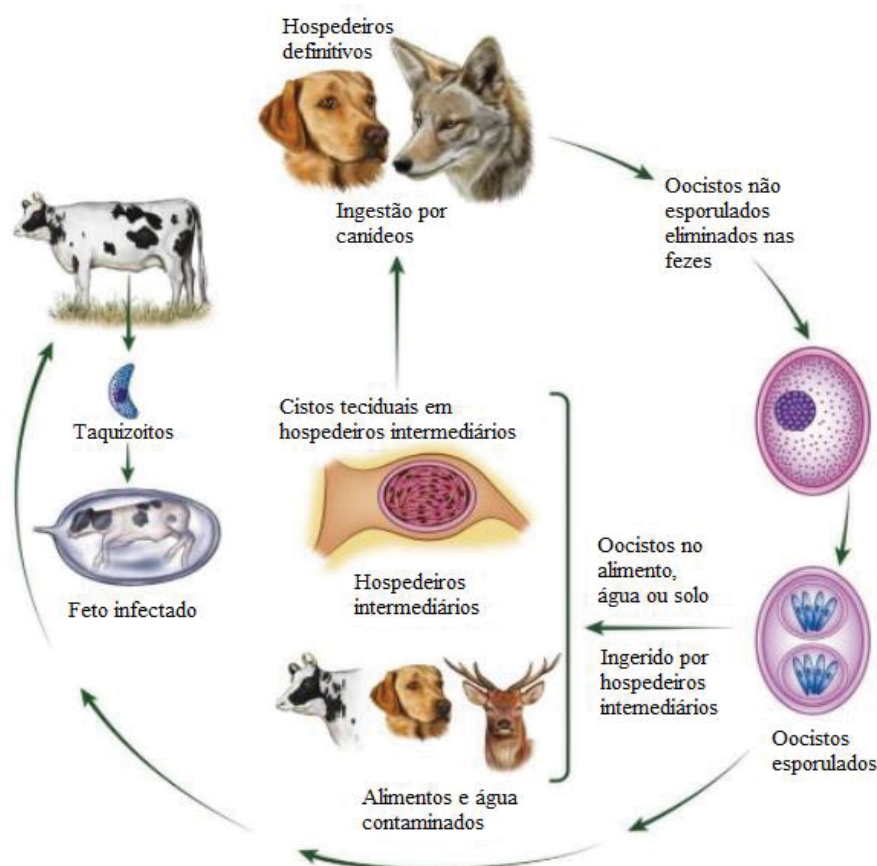
Apenas em 2003 foi registrado o primeiro caso de infecção pelo protozoário no Paraná, a partir do isolamento *N. caninum* no SNC de um bezerro (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003). Atualmente a neosporose está distribuída em todo território do Paraná, com soroprevalência em bovinos de 14,3 a 46,9% (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.* 2019). Nas vacas leiteiras, a soroprevalência pode variar entre 12 e 14,3% na região norte do estado (GUIMARÃES *et al.*, 2004; OGAWA *et al.*, 2005) a 24,2% e 34,8%, nas regiões sudoeste e dos Campos Gerais, respectivamente (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001; CAMILLO *et al.*, 2010).

A neosporose é uma das principais causas de distúrbios reprodutivos em bovinos e aumenta em 3,5 vezes o risco de abortamentos, levando a uma perda econômica global média de US \$1,298.3 bilhão por ano, sendo que um terço dessa perda, cerca de US \$842,9 milhões, ocorre na indústria leiteira. No Brasil, calcula-se

uma perda total de 152,3 milhões de dólares ao ano em abortos, sendo US \$51,3 milhões somente nos rebanhos leiteiros (DUBEY, 2003; REICHEL *et al.*, 2013).

O ciclo de vida de *N.caninum* (Figura 1) envolve três estágios infectantes: taquizoítos, bradizoítos (cistos teciduais) e oocistos. Os taquizoítos e bradizoítos são estágios intracelulares encontrados nos hospedeiros intermediários, como os bovinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos, cervos (DUBEY, 2003). Os taquizoítos se replicam nas células, disseminam a fase aguda da doença e são transmitidos via placenta (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Os bradizoítos são formas de multiplicação lenta que se encontram dentro dos cistos teciduais, localizados principalmente no sistema nervoso central e nos músculos (DUBEY, 2007). Os oocistos consistem na forma resistente do protozoário no ambiente e são excretados pelos hospedeiros definitivos: cães, coiotes, lobos e dingos (DUBEY; SCHARES, 2011).

Figura 1. Ciclo de vida de *Neospora caninum*



Fonte: LINDSAY e DUBEY, 2020

A transmissão pós-natal ocorre com a ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados, ou quando se ingere cistos teciduais contendo bradizoíto (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). A forma vertical acontece via transplacentária, da mãe para o feto, sendo a forma mais importante de infecção em bovinos (DAVISON; OTTER; TREES, 1999; MORÉ *et al.*, 2009).

Devido ao seu alto potencial de transmissão congênita, de 80-90% dos bezerros de vacas soropositivas nascem infectados (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013), a neosporose pode permanecer por várias gerações nos rebanhos (DUBEY, 2003). Existem duas possibilidades de transmissão transplacentária, a transmissão exógena e a transmissão endógena. A primeira ocorre quando a vaca se infecta durante a gestação e transmite o protozoário via placenta. A transmissão endógena resulta de uma infecção latente, quando a vaca se infectou antes da prenhez e durante a gestação ocorre uma reativação dos bradizoítos. Dessa forma, a transmissão endógena pode ocorrer em múltiplas gestações ou ser transmitida ao longo de várias gerações no rebanho (MCALLISTER, 2016). Uma possível transmissão vertical pela ingestão de colostro e leite, contaminados com taquizoítos, foi relatada em bezerros em dois estudos experimentais (UGGLA *et al.*, 1998; DAVISON *et al.*, 2001).

A principal manifestação clínica da neosporose em bovinos é o aborto, mas também pode estar associada à morte fetal, reabsorção, mumificação e autólise (DUBEY; SCHARES, 2011). O abortamento ocorre geralmente entre o quinto e o sexto mês de gestação, mas pode ocorrer em qualquer fase, a partir dos três meses de gestação (DUBEY; SCHARES, 2011).

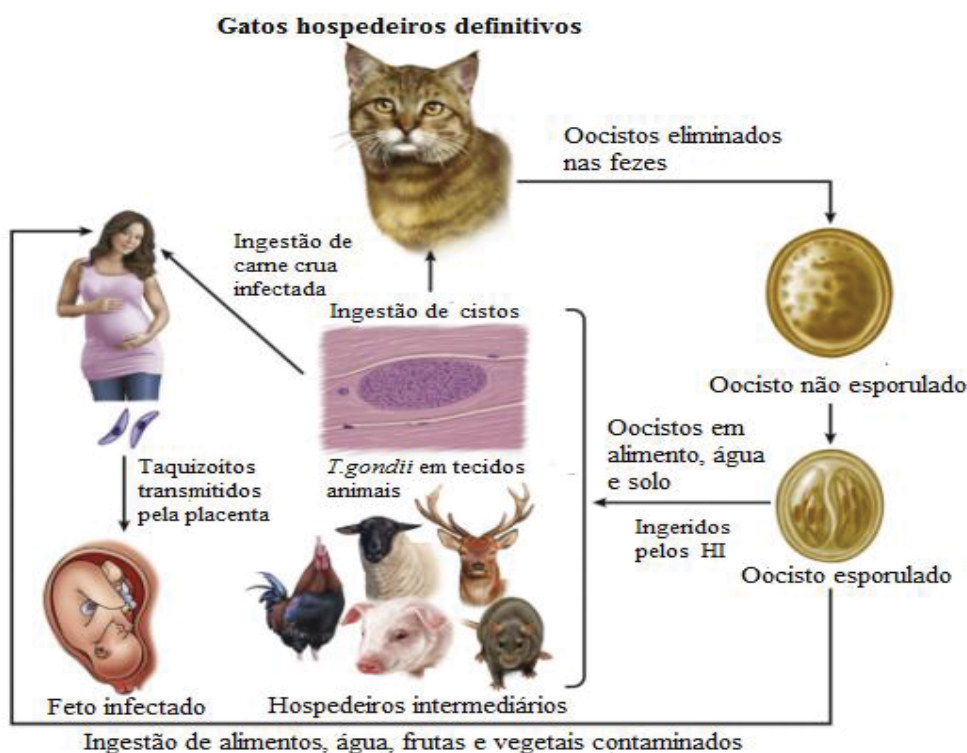
A infecção por *N. caninum* pode resultar em bezerros natimortos, prematuros ou com comprometimento neurológico (MCALLISTER *et al.*, 2016). No entanto, na maioria dos casos ocorre o nascimento de bezerros clinicamente saudáveis, mas persistentemente infectados, contribuindo para a manutenção da infecção no rebanho (DUBEY, 2003). Animais adultos normalmente não apresentam sinais clínicos da neosporose (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013), mas alguns estudos, embora escassos e inconclusivos, relacionam a infecção à perdas na produção, principalmente em vacas leiteiras (MCALLISTER, 2016).

2.2 TOXOPLASMA GONDII

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário coccídeo reconhecido desde 1908, mas o seu ciclo completo foi definido apenas a partir de 1970, quando se descobriu o papel do gato como hospedeiro definitivo e os oocistos como a sua forma resistente no ambiente (DUBEY, 2009). É o agente causador da toxoplasmose, uma doença de distribuição mundial e com característica zoonótica, que pode acometer todos os animais homeotérmicos (mamíferos e aves), incluindo os seres humanos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; BOUGHATTAS, 2017).

Apresenta um ciclo de vida heteroxênico facultativo (Figura 2), embora apresente estágios infectantes e ciclo similar ao do *N. caninum*, os hospedeiros definitivos de *T. gondii* são os gatos e os felinos selvagens que excretam os oocistos nas fezes. Em condições favoráveis no ambiente os oocistos podem se tornar infectantes dentro de um a cinco dias. (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; DUBEY, 2008; SCHLÜTER *et al.*, 2014).

Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*



Fonte: LINDSAY e DUBEY, 2020

A transmissão horizontal pode ocorrer pela ingestão de oocistos esporulados em água ou alimentos contaminados ou pela ingestão de carne crua ou mal-passada com cistos teciduais contendo bradizoítos. A transmissão vertical ocorre em animais e mulheres durante a gestação, com a passagem de taquizoítos pela placenta (SCHLÜTER *et al.*, 2014). A infecção por *T. gondii* em seres humanos também tem sido associada ao consumo de leite não pasteurizado, principalmente o leite de cabra (BOUGHATTAS, 2017).

O Brasil possui uma das mais altas prevalências de infecção de *T. gondii* (DUBEY *et al.*, 2012), sendo cenário de grande parte dos surtos de toxoplasmose relatados no mundo (DUBEY, 2021). A toxoplasmose é uma zoonose de grande importância na saúde pública, podendo causar infecção congênita e alterações no desenvolvimento fetal em gestantes e quadros graves em indivíduos imunossuprimidos (DUBEY *et al.*, 2012; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Embora a toxoplasmose seja normalmente relacionada a abortamentos e mortalidade neonatal em pequenos ruminantes (DUBEY; JONES, 2008; YILDZ *et al.*, 2009), a soroprevalência de *T. gondii* em bovinos é elevada, podendo alcançar valores de 92% em algumas regiões do mundo (SHARIATZADEH *et al.*, 2021). A prevalência no Brasil pode variar bastante conforme a região, de 0,4 a 89,1 % (GOMES *et al.*, 2020; SHARIATZADEH *et al.*, 2021). No Paraná, os estudos recentes são escassos, mas a soroprevalência pode variar de 25,8 a 48,5%, entre os municípios das regiões: central, oeste e norte do estado (MARANA *et al.*, 1994; GARCIA *et al.*, 1999; OGAWA *et al.*, 2005; DUBEY *et al.*, 2012).

Os bovinos parecem ser naturalmente resistentes à infecção, não havendo evidências de manifestação clínica da doença nesses animais e raros relatos de infecção congênita natural (COSTA *et al.*, 2011). Entretanto, a maioria dos estudos, principalmente no Brasil, tem como objetivo as investigações sorológicas (GOMES *et al.*, 2020) e as informações sobre a epidemiologia do protozoário nessa espécie ainda são limitadas.

2.3 DIAGNÓSTICOS DA NEOSPOROSE E DA TOXOPLASMOSE

O diagnóstico da neosporose e da toxoplasmose pode ser realizado a partir de métodos diretos e indiretos. Pela dificuldade em se detectar os protozoários por métodos diretos *in vivo*, os testes sorológicos como reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), soroaglutinação e *immunoblotting* (IB) (ORTEGA-MORA; FERNÁNDEZ-GARCÍA; GÓMEZ-BAUTISTA, 2006) são os métodos de escolha para a identificação de animais infectados nos rebanhos (OPSTEEGH *et al.*, 2011; GUIDO *et al.*, 2016). A detecção de anticorpos anti-*N. caninum* indica a condição de portador em bovinos por ser caracterizar como uma infecção persistente (CAMILLO *et al.*, 2011). Porém, pouco se sabe sobre a sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos para se detectar anticorpos anti-*T. gondii* nessa espécie (DUBEY *et al.*, 2012).

O ELISA e a RIFI são os métodos sorológicos mais utilizados em estudos epidemiológicos em bovinos (RIBEIRO *et al.* 2019; SHARIATZADEH *et al.*, 2021). A RIFI é considerada o método de referência para o diagnóstico de neosporose em bovinos (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999; SINNOTT *et al.*, 2017). É considerado um ensaio sensível e específico, baseado em antígenos de superfície de membrana dos taquizoítos (ORTEGA-MORA; FERNÁNDEZ-GARCÍA; GÓMEZ-BAUTISTA, 2006; SILVA *et al.*, 2007). Como desvantagens, demanda da manutenção de uma linhagem celular para produção de antígenos e possibilita apenas um número limitado de análises por teste, a interpretação dos resultados é subjetiva e depende de profissional qualificado (GUIDO *et al.*, 2016; ABDELBAKY *et al.*, 2020).

O ELISA é muito utilizado como método para a triagem da neosporose em rebanhos, pois permite a testagem em larga escala e de forma automatizada (ORTEGA-MORA; FERNÁNDEZ-GARCÍA; GÓMEZ-BAUTISTA, 2006; ABDELBAKY *et al.*, 2020). Existe uma série de testes por ELISA produzidos e vendidos comercialmente, utilizando diferentes antígenos de origem intracelular (DUBEY; SCHARES, 2006; GUIDO *et al.*, 2016), mas que tem limitações quanto a especificidade (SINNOTT *et al.*, 2017). Nos últimos anos, ensaios de ELISA com antígenos recombinantes e de superfície específicos para *N. caninum* têm sido desenvolvidos (SINNOTT *et al.*, 2017; ABDELBAKY *et al.*, 2020), reduzindo as

reações cruzadas com outros protozoários da família Sarcocystidae, como o *T. gondi* (SINNOTT *et al.*, 2017; NOVOA *et al.*, 2020).

O diagnóstico definitivo geralmente é realizado post-mortem em tecidos, material de aborto e fetos. Pode se utilizar o exame histopatológico e a imunohistoquímica para detectar taquizoítos e bradizoítos (DUBEY; SCHARES, 2006) ou a reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificar a presença do DNA dos protozoários nos tecidos (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004). Tecidos fetais e placentas nem sempre estão disponíveis ou em condições adequadas para análise, muitas vezes já em estado avançado de autólise, o que pode comprometer a acurácia do diagnóstico (DUBEY; SCHARES, 2006; MCALLISTER, 2016). Amostras de fluidos corporais como sangue (OKEOMA *et al.*, 2004), sêmen (FERRE *et al.*, 2005), fluido amniótico (CABRAL *et al.*, 2022) soro (MCINNES *et al.*, 2006), incluindo o leite (ALIPOUR *et al.*, 2018) têm sido avaliadas como alternativas para a detecção direta dos protozoários *in vivo*.

Análises de amostras de leite individuais ou de tanque podem ser uma opção prática, pouco invasiva e de menor custo para o diagnóstico em rebanhos leiteiros (CHANLUN *et al.*, 2006). Vários métodos diferentes foram adaptados para a testagem de anticorpos contra *N. caninum* e *T. gondii* no leite (SCHARES *et al.*, 2005; CAMILLO *et al.*, 2011; GAZZONIS *et al.*, 2018), mas ainda são poucas as ferramentas para o diagnóstico por PCR nesse tipo de amostra. Algumas técnicas para a extração e detecção de DNA de protozoários Apicomplexas em amostras de leite estão sendo utilizadas (VERONESI *et al.*, 2018; GHAREKHANI *et al.*, 2021) e padronizadas nos últimos anos (VISMARRA *et al.*, 2017), surgindo como uma possível ferramenta diagnóstica.

A PCR é uma técnica sensível e específica (SINNOTT *et al.*, 2017) largamente utilizada na detecção de parasitos patógenos (BELL; RANFORD-CARTWRIGHT, 2002). A amplificação dos segmentos da região do espaçador 1 transcrito interna (ITS1) do rRNA da família Sarcocystidae e Nc5 do genoma do *N. caninum* estão entre os principais alvos das técnicas utilizadas atualmente no diagnóstico de protozoários do filo Apicomplexa (ORTEGA-MORA; FERNÁNDEZ-GARCÍA; GÓMEZ-BAUTISTA, 2006). O gene NC-5 é uma sequência de DNA repetida no genoma de *N. caninum*, não encontrado em outro táxon e apresenta $\geq 95\%$ de identidade entre as 105 sequências publicamente disponíveis de *N. caninum* (BARRY *et al.*, 2019). Essa

alta especificidade a torna um alvo interessante para novos ensaios de diagnóstico molecular (DUBEY; SCHARES, 2006; AL-QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010).

Os estudos sobre neosporose nos últimos 30 anos tem se dedicado especialmente a desenvolver e validar novos testes diagnósticos confiáveis para detectar com precisão a disseminação do parasito nos rebanhos (REICHEL; WAHL; ELLIS, 2020). Vários testes moleculares, como a *nested* PCR e o PCR em tempo real (qPCR), vem sendo otimizados na tentativa de ampliar as possibilidades de detecção do *N. caninum* em relação às técnicas convencionais (COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2002; SINNOTT *et al.*, 2017). O qPCR baseado em SBYR green, que monitora a reação em tempo real empregando o corante de ligação de DNA de fita dupla SYBR Green, permite uma quantificação rápida e precisa do número inicial de cópias de DNA e com menor risco de contaminação (COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2002).

As técnicas para o diagnóstico e a triagem dos animais positivos vem sendo aprimoradas ao longo do tempo (REICHEL; WAHL; ELLIS, 2020) e são uma ferramenta valiosa para as estratégias de controle da neosporose nos rebanhos (MCALLISTER, 2016) que representam um grande desafio para Médicos Veterinários e produtores.

2.4 RISCO DE TRANSMISSÃO LACTOGÊNICA

Nos últimos anos, o papel do leite e do colostro na transmissão de *N. caninum* e *T. gondii* tem sido bastante discutido, contudo as informações a respeito de possível transmissão lactogênica ainda são limitadas e os estudos pouco conclusivos (MOSKWA; CABAJ, 2007; BOUGHATTAS, 2017)

O DNA de *N. caninum* foi detectado no leite de vacas em lactação com níveis altos de IgG (MOSKWA *et al.*, 2003) e no colostro (MOSKWA *et al.* 2007), sugerindo a possibilidade de infecção pelo protozoário. Estudos recentes no Irã e no Egito detectaram *N. caninum* em diferentes tipos de leite cru (ALIPOUR *et al.*, 2018) e em tanques de leite (GHAREKHANI *et al.*, 2021; FEREIG *et al.*, 2022). Poucos estudos investigaram a presença do DNA de *T. gondii* no leite de vaca (DEHKORDI *et al.*, 2013; CISAK *et al.*, 2017; GHAREKHANI *et al.*, 2021; FEREIG *et al.*, 2022). Resultados mais consistentes foram encontrados em leite de cabras infectadas

naturalmente (BEZERRA *et al.*, 2015) e experimentalmente (DUBEY *et al.*, 2014) e em ovelhas (OSSANI *et al.*, 2017).

Existe a hipótese de que o período periparto pode levar a reativação de bradizoítos de cistos teciduais de *N. caninum* em taquizoítos circulantes, que podem ser excretados no leite, fazendo do mesmo uma possível fonte de infecção (DEHKORDI *et al.*, 2013). Um estudo experimental demonstrou que bezerros podem ser infectados pela ingestão de leite contaminado com taquizoítos de *N. caninum*, mas não foram infectados quando foram amamentados por vacas soropositivas naturalmente infectadas (DAVISON *et al.*, 2001). Embora não existam evidências da transmissão lactogênica de forma natural, deve-se considerar a possibilidade dessa via de infecção em bezerros alimentados com colostro e leite cru, visto que essa é uma prática comum em fazendas de leite (MOSKWA; CABAJ, 2007).

Na toxoplasmose, o leite pode veicular o protozoário durante a fase aguda (LUPTAKOVA *et al.*, 2015) e crônica (OSSANI *et al.*, 2014) da infecção em ovelhas. Por conta do seu potencial zoonótico, uma possível transmissão de *T. gondii* pelo consumo de leite cru torna-se uma questão de saúde pública (BOUGHATTAS, 2017). Em seres humanos foi relatada a transmissão da toxoplasmose pelo consumo de leite de cabra não pasteurizado (SACKS; ROBERTO; BROOKS, 1982; CHIARI, NEVES, 1984)

Acredita-se que a infecção a partir do leite de vaca seja menos provável (BOUGHATTAS, 2017), contudo, alguns estudos epidemiológicos indicam associação significativa entre a ingestão de leite cru de vaca e a infecção por *T. gondii* em gestantes e mulheres imunossuprimidas (HEUKELBACH *et al.*, 2007; ALVARADO-ESQUIVEL *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014), não sendo possível excluir qualquer outro tipo de leite como fonte potencial de infecção (TENTER; HECKROTH; WEISS, 2000). No Brasil, principalmente em regiões rurais e mercados informais, o leite é frequentemente consumido cru e utilizado para a produção de queijos artesanais sem pasteurização prévia (VIDAL-MARTINS *et al.*, 2013) e podem ser uma possível fonte de transmissão em surtos de toxoplasmose (DA COSTA *et al.*, 2020).

De acordo com pesquisas experimentais, as formas infectantes de *T. gondii* podem permanecer viáveis por três a vinte dias em leite refrigerado e dez dias em queijo artesanal fresco nas mesmas condições (HIRAMOTO *et al.*, 2001; WALSH *et al.*, 1999) e os taquizoítos de *T. gondii* podem sobreviver ao processo de fabricação do

queijo de cabra produzido com leite cru, produzidos por enzima fria (DUBEY *et al.*, 2014), tornando o leite não pasteurizado uma possível fonte de infecção.

Porém estudos prévios indicam que os taquizoítos são sensíveis ao pH ácido do suco gástrico, podendo não resistir a passagem pelo estômago após a ingestão (DIJKSTRA *et al.*, 2001; MOSKWA e CABAJ, 2007). No entanto, uma investigação demonstrou que os taquizoítos de *T. gondii* mantêm a sua infectividade em fluido gástrico simulado de pH 5,0 e 6,0 por pelo menos 90 min. Esse tempo de sobrevivência se prolongou ao ser misturado ao leite, provavelmente devido ao aumento do pH que acompanha a adição do leite. Logo, os taquizoítos eventualmente ingeridos no leite podem não ser diretamente expostos ao suco gástrico, podendo sobreviver à passagem no estômago e infectar as células do intestino (KOETHE *et al.*, 2017).

Até o presente momento não se tem conhecimento sobre a viabilidade e o potencial infectante do *N. caninum* no leite de nenhuma espécie. Taquizoítos de *T. gondii* foram isolados em leite de cabras, ovelhas e vacas em um trabalho questionado por pesquisadores renomados da área (DEHKORDI *et al.*, 2013).

Ainda não existem resultados concretos a respeito da via lactogênica como um fator de risco para a infecção por *N. caninum* e *T. gondii*, mas acredita-se que os taquizoítos podem ser excretados de forma intermitente no leite (DUBEY *et al.*, 2014) e em quantidade muito variável, e que pode depender de uma série de fatores como: estágio da infecção, estado imunológico do animal e fase da lactação (DAVISON *et al.*, 2001, MOSKWA e CABAJ, 2007; LUPTAKOVA *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS

ABDELBAKY, H.H. *et al.* Evaluation of *Neospora caninum* serodiagnostic antigens for bovine neosporosis. **Parasitology International**, v. 75, 102045, 2020.

ALIPOUR, M.; RAHIMI, E.; SHAKERIAN, A. Retracted: Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in different types of raw milk and traditional dairy product samples. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 6, e12575, 2018.

AL-QASSAB, S.E.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum*. **Diversity**, v. 2, n. 3, p. 411-438, 2010.

ALVARADO-ESQUIVEL, C. *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in patients with vision and hearing impairments, cancer, HIV, or undergoing hemodialysis in Durango, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 505-508, 2010.

BARRY, R. *et al.* A probe-based real-time PCR assay for the detection of *Neospora caninum* in clinical samples from cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 269, p. 2-6, 2019.

BELL, A.S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.C. Real-time quantitative PCR in parasitology. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 338-342, 2002.

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, n. 4, p. 421-424, 2015.

BJERKÅS, I. *et al.* Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.

BOUGHATTAS, S. Toxoplasma infection and milk consumption: Meta-analysis of assumptions and evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2924-2933, 2017.

CABRAL, L.D.R. *et al.* Detection of *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* in amniotic fluid and placentas from mares. **Veterinary Parasitology**, v. 303, 109678, 2022.

CAMILLO, G. *et al.* Antibodies to *Neospora caninum* in dairy cattle in Southwest of Paraná State. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1511-1513, 2010.

CAMILLO, G. *et al.* Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 482-486, 2011.

CHANLUN, A. *et al.* Variations of *Neospora caninum* antibody levels in milk during lactation in dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 349-355, 2006.

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

CISAK, E. *et al.* Presence of pathogenic Rickettsiae and protozoan in samples of raw milk from cows, goats, and sheep. **Foodborne pathogens and disease**, v. 14, n. 4, p. 189-194, 2017.

COSTA, G.H.N. *et al.* Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 57-62, 2001.

COSTA, G.H.N. *et al.* *Toxoplasma gondii*: Infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 277-281, 2011.

COSTA, da M.A. *et al.* Artisan fresh cheese from raw cow's milk as a possible route of transmission in a toxoplasmosis outbreak, in Brazil. **Zoonoses and public health**, v. 67, n. 2, p. 122-129, 2020.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. *et al.* Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, 2002.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, 1999.

DEHKORDI, F.S. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 120-125, 2013.

DIJKSTRA, T. *et al.* Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 747-752, 2001.

DONAHOE, S.L. *et al.* A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216-238, 2015.

DUBEY, J.P. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

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.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006.

DUBEY, J.P. The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877-882, 2009.

DUBEY, J.P. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2021.

DUBEY, J.P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, 2011

DUBEY, J.P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J.P. *et al.* Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 10, p. 1747-1753, 2014.

FEREIG, Ragab M. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies and DNA in raw milk of various ruminants in Egypt. **Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1305, 2022.

FERRE, I. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1504-1518, 2005.

GARCIA, J.L. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine, bovine, ovine and equine, and their correlation with human, felines and canines, from farms in North Region of Paraná State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 29, p. 91-97, 1999.

GAZZONIS, A. L. *et al.* *Toxoplasma gondii* antibodies in bulk tank milk samples of caprine dairy herds. **Journal of Parasitology**, v. 104, n. 5, p. 560-565, 2018.

GHAREKHANI, J. *et al.* Herd-level contamination of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* in milk of Iranian dairy farms. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103873, 2021.

GOMES, D.F.C. *et al.* *Toxoplasma gondii* in cattle in Brazil: A review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v29, e015719, 2020.

GONDIM, L.F.P *et al.* *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 35-35, 1999.

GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, P.J.; ELLIS, J.T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133-150, 2013.

GUIDO, Stefano *et al.* Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

GUIMARÃES JR, J.S. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, 2004.

HEUKELBACH, Jorg *et al.* Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 287, 2007.

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

KOETHE, M. *et al.* Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simulated gastric fluid and cow's milk. **Veterinary Parasitology**, v. 233, p. 111-114, 2017.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants: an update. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 205-222, 2020.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **Veterinaria Record** v. 44, p. 804-807, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 191-195, 2008.

MARANA, E.R.M. *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos de corte, abatidos em matadouros do norte do Paraná-Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 38-40, 1994.

MCALLISTER, M.M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

MCINNES, L.M. *et al.* Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 207-213, 2006.

MORÉ, G. *et al.* Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 51-54, 2009.

MOSKWA, B. *et al.* The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. **Acta Parasitologica**, v. 48, n. 2, p. 138-141, 2003.

MOSKWA, B. *et al.* The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v. 100, n. 3, p. 633-636, 2007.

MOSKWA, B.; CABAJ, W. The role of the colostrum and milk in *Neospora caninum* transmission. **Helminthologia**, v. 44, n. 3, p. 126-129, 2007.

NOVOA, M.B. *et al.* Evaluation of a competitive inhibition ELISA based on the recombinant protein tSAG1 to detect anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 3, p. 401-408, 2020.

OGAWA, L. *et al.* Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 312-316, 2005.

OKEOMA, C.M. *et al.* The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 307-315, 2004.

OPSTEEGH, M. *et al.* Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3-4, p. 343-354, 2011.

ORTEGA-MORA, L.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.. Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. **Acta Parasitologica**, v. 51, n. 1, p. 1-14, 2006.

OSSANI, R.A. *et al.* *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on west mesoregion of Santa Catarina state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1294-1300, 2017.

RAGOZO, A.M.A *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

RAGOZO, A.M.A. *et al.* Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 323-326, 2009.

REICHEL, M.P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

REICHEL, Michael P.; WAHL, L.C.; ELLIS, John T. Research into *Neospora caninum*—what have we learnt in the last thirty years? **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 505, 2020.

RIBEIRO, C.M. *et al.* Meta-analysis of the prevalence and risk factors associated with bovine neosporosis. **Tropical animal health and production**, v. 51, n. 7, p. 1783-1800, 2019.

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

SANTOS, T.R. *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3-4, p. 324-326, 2009.

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J. Adaptation of a Surface Antigen-based ELISA for the Detection of Antibodies Against *Neospora caninum* in Bovine Milk. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 52, n. 1, p. 45-48, 2005

SCHLÜTER, Dirk *et al.* Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 917-929, 2014.

SHARIATZADEH, S.A. *et al.* The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in bovines: A systematic review and meta-analysis. **Parasitology**, v.148, 1417-1433, 2021.

SILVA, D.A.O *et al.* Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, 2007.

SILVA, da M.G. *et al.* Epidemiological factors associated with seropositivity for toxoplasmosis in pregnant women from Gurupi, State of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 469-475, 2014.

SINNOTT, F.A. *et al.* Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011–2016). **Veterinary Parasitology**, v. 239, p. 19-25, 2017.

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

UGGLA, A. *et al.* Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1467-1472, 1998.

VERONESI, F. *et al.* Screening of *Toxoplasma gondii* positive sheep flocks in Perugia Province (Umbria Region, Central Italy) using bulk milk analyses. **Large Animal Review**. v. 24, n.5, p. 185-187. 2018.

VIDAL-MARTINS, A. M. C. *et al.* Avaliação do consumo de leite e produtos lácteos informais e do conhecimento da população sobre os seus agravos à saúde pública, em um município do Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim de Indústria Animal**, v. 70, n. 3, p. 221-227, 2013.

VISMARRA, A. *et al.* *Toxoplasma gondii* and pre-treatment protocols for polymerase chain reaction analysis of milk samples: a field trial in sheep from Southern Italy. **Italian Journal of Food Safety**, v. 6, n. 1, 6501, 2017.

WALSH, C. P. *et al.* Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. **Journal of eukaryotic microbiology**, v.46, n.5, p.73S-74S, 1999.

YILDIZ, K. *et al.* Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: Special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 306-310, 2009.

3. CAPÍTULO I. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-NEOSPORA CANINUM EM VACAS LEITEIRAS NO SUDESTE DO PARANÁ

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário de distribuição mundial e causa importante de abortos e perdas econômicas nos rebanhos leiteiros. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (ELISA) são os principais métodos utilizados para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* e o diagnóstico sorológico é importante à triagem e controle da neosporose nos rebanhos. O objetivo desse estudo foi comparar os métodos sorológicos RIFI e ELISA na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas leiteiras de propriedades do Sudeste do Paraná. As amostras de sangue foram coletadas de 106 vacas de seis propriedades com taxas de aborto de <5%. A detecção de anticorpos foi realizada pela RIFI na diluição de ponto de corte de 1:50 e pelo método de ELISA com razão entre absorbância das amostras/controlado positivo (S/P) > 0,5 como ponto de corte. A soroprevalência nos rebanhos foi de 24,5% (26/106) na RIFI e 27,3% (29/106) no ELISA e de 15% (16/106) em ambos os testes. A concordância entre a RIFI e o ELISA foi moderada ($\kappa=0,43$). O ensaio ELISA foi ligeiramente mais sensível na detecção de anticorpos na comparação a nível das propriedades. Considerando a RIFI como referência e uma prevalência de 20%, a sensibilidade do ensaio ELISA foi de 61,53% e a especificidade de 83,75%. Considerando um ponto de corte de 1:100 na RIFI, a concordância entre os testes foi maior ($\kappa=0,55$) e a sensibilidade do ELISA aumentou para 80%. Os rebanhos leiteiros da região sudeste do Paraná estão expostos ao protozoário *N. caninum*, mesmo em propriedades que relatam baixa ocorrência de abortos. Divergências nos resultados da RIFI e do ELISA podem ocorrer principalmente em níveis mais baixos de anticorpos e conforme o ponto de corte utilizado.

Palavras-chave: neosporose; sorologia; rebanhos leiteiros; concordância; ponto de corte

ABSTRACT

Neospora caninum is a worldwide distributed protozoan and an important cause of abortions and economic losses in dairy herds. The Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) are the main methods used for the detection of anti-*N. caninum* antibodies and the serological diagnosis is important for the screening and control of neosporosis in dairy herds. The objective of this study was to compare the serological methods IFAT and ELISA in the detection of anti-*N. caninum* antibodies in dairy cows from properties in the Southeastern Paraná. Blood samples were collected from 106 cows from six farms with abortion rates of <5%. Antibody detection was performed by IFAT at 1:50 cutoff dilution and by ELISA method with absorbance ratio of samples/positive control (S/P) > 0.5 as cutoff point. The seroprevalence in the herds was 24.5% (26/106) in the IFAT and 27.3% (29/106) in the ELISA and 15% (16/106) in both tests. Agreement between the IFAT and ELISA was moderate ($\kappa=0.43$). The ELISA was slightly more sensitive in detecting antibodies in the comparison at the farm level. Considering the IFAT as a reference and a prevalence of 20%, the sensitivity of the ELISA was 61.53% and the specificity 83.75%. Considering a cutoff point of 1:100 in the RIFI, the agreement between the tests was higher ($\kappa=0.55$) and the sensitivity of the ELISA increased to 80%. Dairy herds in the southeastern region of Paraná are exposed to the *N. caninum* protozoan, even in properties that report low occurrence of abortions. Divergences in the results of IFAT and ELISA may occur mainly at lower levels of antibodies and according to the cutoff point used.

Keywords: neosporosis; serology; dairy herds; concordance; cut-off point

3.1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório que pertence à família Sarcocystidae e ao filo Apicomplexa (GOODSWEN *et al.*, 2013). Esse protozoário infecta ampla variedade de hospedeiros intermediários, como ruminantes e outros ungulados (LINDSAY; DUBEY, 2020) e os hospedeiros definitivos são os cães, coiotes, lobos e dingos (DUBEY; SCHARES, 2011).

Este protozoário cosmopolita foi relatado em várias regiões do Brasil (CERQUEIRA-CEZAR *et al.*, 2017) incluindo todas as mesorregiões do estado do Paraná, com soroprevalência variando de 15,4 a 33,0% (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008, SNAK *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020). É o parasito causador da neosporose (LINDSAY; DUBEY, 2020) uma das mais importantes doenças que causam abortamento em bovinos e está associada a impactos econômicos significativos nos rebanhos (REICHEL *et al.*, 2013; LINDSAY; DUBEY, 2020).

A infecção pode ocorrer pelo consumo de alimentos e água contaminados com oocistos excretados pelos hospedeiros definitivos (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007) que em condições favoráveis esporulam em até 24h no ambiente (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007) e pela ingestão de bradizoítos de cistos de tecidos infectados dos hospedeiros intermediários (KHAN *et al.*, 2020). A principal via de transmissão em bovinos é a transplacentária via taquizoítos (DAVISON *et al.*, 1999; MORÉ *et al.*, 2009). Em torno de 80-90% dos bezerros de mães soropositivas nascem infectados e a infecção pode persistir no rebanho por várias gerações (DUBEY, 2003; GOODSWEN *et al.*, 2013).

A detecção de anticorpos anti-*N. caninum* indica a condição de portador em bovinos (CAMILLO *et al.*, 2011) e representa uma estratégia importante na triagem e controle da neosporose nos rebanhos (MCALLISTER, 2016). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA) são os métodos sorológicos mais utilizados para o diagnóstico em bovinos (RIBEIRO *et al.* 2019; SHARIATZADEH *et al.*, 2021).

A RIFI é um método sensível e bastante específico baseado na detecção de antígenos de superfície celular (ORTEGA-MORA; FERNÁNDEZ-GARCÍA; GÓMEZ-BAUTISTA, 2006; SILVA *et al.*, 2007), porém é uma técnica laboriosa e que apresenta algumas desvantagens como: número limitado de análises por teste, necessidade da

manutenção de uma estrutura para a produção de antígenos e de profissionais experientes para a interpretação dos resultados, que são subjetivos (GUIDO *et al.*, 2016; MANSILLA *et al.*, 2019; ABDELBAKY *et al.*, 2020).

O ELISA é um ensaio automatizado que é utilizado para triagem de rebanhos em larga escala (ORTEGA-MORA; FERNÁNDEZ-GARCÍA; GÓMEZ-BAUTISTA, 2006; ABDELBAKY *et al.*, 2020). É um método muito sensível, produzido com diferentes preparos de antígenos de origem intracelular, mas que pode possuir limitações quanto a especificidade e reações cruzadas com outros protozoários relacionados (SINNOTT *et al.*, 2017).

Embora a RIFI já tenha sido considerada a técnica de referência para o diagnóstico da neosporose (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999; SINNOTT *et al.*, 2017) e uma variedade de ensaios ELISA tenham sido desenvolvidos nos últimos anos e estejam disponíveis comercialmente (GUIDO *et al.*, 2016), não existe um teste padrão ouro definido (GUIDO *et al.*, 2016; MANSILLA *et al.*, 2019). A sensibilidade e especificidade desse testes podem variar conforme o ponto de corte estabelecido (LASRI *et al.*, 2004) e variações podem ser observadas considerando as condições epidemiológicas locais e as populações testadas (FRÖSSLING *et al.*, 2003; NOVOA *et al.*, 2020).

Poucos estudos na América do Sul (MANSILLA *et al.*, 2019; NOVOA *et al.*, 2020) e no Brasil (LOCATELLI-DITRICH *et al.*, 2001; SARTOR *et al.*, 2003) avaliaram comparativamente os dois testes para verificar a soroprevalência de *N. caninum* em bovinos. O objetivo desse estudo foi comparar os métodos sorológicos RIFI e ELISA na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas leiteiras de propriedades do Sudeste do Paraná.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o número de protocolo 011/19.

3.2.1 Animais e área de estudo

Foram incluídas no estudo seis propriedades com histórico de aborto selecionadas de forma aleatória pela conveniência (P1, P2, P3, P4, P5 e P6) localizadas nos municípios de União da Vitória (26° 13' 48" S e 51° 05' 11" O), Piraquara (25° 26' 30" S e 49° 03' 48" O), Pinhais (25° 26' 41" S e 49° 11' 33" O) e São José dos Pinhais (25° 32' 05" S e 49° 12' 23" O), na região sudeste do Paraná. O estudo foi realizado em pequenas propriedades familiares, com sistema de criação semiextensivo ou extensivo. As vacas tinham de um a dez anos de idade e o número de partos variava de um a oito. Esses rebanhos tinham taxas de aborto <5%, cerca de um a quatro abortos ao ano e eram de característica esporádica e sem diagnóstico. Todas as propriedades contavam com a presença de cães domiciliados ou errantes, e na maioria delas eles circulavam livremente.

3.2.2. Coleta e processamento das amostras

Entre outubro e dezembro de 2020 foram coletadas amostras de sangue de 106 vacas leiteiras adultas (média de 4,2 anos) das raças Holandesa, Jersey e Parda Suíça. As amostras de sangue foram coletadas por punção do vaso coccígeo ou veia mamária e acondicionadas em tubos sem anticoagulante, devidamente identificados e mantidos sob refrigeração e processadas em até 24h. As amostras foram centrifugadas a 2.295 g, durante cinco minutos, para a obtenção do soro, os quais foram armazenados a -20°C até a realização do exame sorológico.

3.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A técnica de Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) foi realizada com o kit comercial de imunodiagnóstico Imunoteste® RIFI *Neospora caninum* (Imunodot diagnósticos, Brasil) seguindo a metodologia previamente descrita pelo fabricante, com algumas modificações. Foram utilizadas lâminas fixadas com taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1) em formol 2%. Os soros foram diluídos inicialmente a 1:50 (CAMILLO *et al.*, 2011) em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2). O conjugado anti-IgG bovino marcado com isotiocianato de fluoresceína incluído no kit imunodiagnóstico foi utilizado como anticorpo secundário. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato e lamínulas 24x60mm. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência com fonte de luz ultravioleta (Olympus). Amostras de soro de vacas soropositivas e soronegativas para *N. caninum* foram utilizadas como controles. A presença de fluorescência em toda a extensão da superfície dos taquizoítos foi considerada como resultado positivo. Amostras positivas no ponto de corte 1:50 foram tituladas até a determinação do título máximo da reação.

3.2.4. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (ELISA)

O ensaio de imunoabsorção enzimática Indireto (ELISA) foi realizado com o kit de teste IDEXX NEOSPORA X2 Ab (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram diluídas em 1:100. O valor de corte $\geq 0,50$ para a razão entre absorbância das amostras/ controle positivo (S/P) foi considerado para amostras positivas. Esse ensaio já foi previamente validado para diagnóstico de neosporose em bovinos com valores de sensibilidade e especificidade relativa $>95\%$ (ALVAREZ-GARCÍA *et al.*, 2013).

3..2.5 Estatística

Para avaliar o nível de concordância entre os testes (RIFI e ELISA) foi calculado o valor de Kappa (k) com intervalo de 95% de confiança. A sensibilidade (se) e especificidade (sp) do ensaio ELISA foram calculadas considerando a RIFI como referência e uma prevalência de 20%. Para comparar os resultados obtidos nos dois testes e verificar diferenças nas proporções foi realizado o teste de McNemar. O Teste de qui-quadrado foi realizado para verificar a associação entre vacas leiteiras soropositivas na RIFI e no ELISA e as variáveis idade e paridade. Para a avaliação da variável idade, foram estabelecidas 3 categorias: A- ≤ 3 anos, B - 4-5 anos e C ≥ 6 anos. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software MedCalc versão 20.1.4.

3.3. RESULTADOS

Das 106 amostras de soro analisadas para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, 24,5% (26/106) foram positivas na RIFI e 27,3% (29/106) no ELISA e a soroprevalência foi de 15% (16/106) considerando apenas as amostras positivas em ambos os testes. Os títulos de anticorpos nas amostras positivas variaram de 50 a 3200 na RIFI e no ELISA a absorbância (S/P) variou de 0,605 - 4,021. A maioria das amostras positivas na RIFI (22/26) apresentaram titulação entre 50 e 200, e em apenas quatro verificou-se titulação superior a 200. As amostras positivas nos dois testes apresentaram títulos na RIFI de 100 a 3200.

Avaliando as proporções de resultados positivos e negativos não foram observadas diferenças significativas entre a RIFI e o ELISA ($P=0,6776$). Comparando os dois testes, o índice kappa foi de 0,43, indicando uma concordância moderada. Considerando a RIFI como referência, a sensibilidade do ensaio ELISA foi de 61,53% e a especificidade de 83,75%.

As amostras que foram positivas em ambos os testes apresentaram título superior a 50 na RIFI (Tabela 1). O ensaio ELISA detectou anticorpos em 80% das amostras positivas na RIFI com título maior que 50. Considerando um ponto de corte de 1:100 na RIFI, a concordância entre os testes pelo índice Kappa é maior (kappa=0,55) e a sensibilidade do ELISA aumenta para 80%.

Tabela 1. Relação de amostras positivas e negativas na RIFI e no ELISA de vacas leiteiras para *Neospora caninum*

	RIFI +	RIFI -	Total
ELISA +	16	13	29
ELISA -	10	67	77
TOTAL	26	80	106

Vacas leiteiras soropositivas para *N. caninum* foram encontradas em cinco (P1, P2, P3, P4 e P6) dos seis rebanhos testados na RIFI. Na testagem pelo método ELISA, em todos os rebanhos foram detectadas vacas soropositivas (Tabela 2).

Tabela 2. Localização das propriedades e relação de vacas leiteiras soropositivas para *Neospora caninum* (n/%) pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e no Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (ELISA).

Propriedades	RIFI Positivas/Total (%)	ELISA Positivas/Total (%)	Concordância Kappa (%)
P1- Piraquara	7/20 (35%)	2/20 (10%)	0,07
P2- Piraquara	3/14 (21,4%)	3/14 (21,4%)	0,57
P3 -São José dos Pinhais	2/15 (13,3%)	3/15 (20%)	0,76
P4 - União da Vitória	7/20 (35%)	9/20 (45%)	0,58
P5 - Pinhais	0/18 (0%)	3/18 (16,6%)	0,00
P6 - São José dos Pinhais	7/19 (36,8%)	9/19 (47,3%)	0,35
Total	26/106 (24,5%)	29/106 (27,3%)	0,43

Uma propriedade (P6) apresentou a maior soropositividade em ambos os testes, apesar ter uma concordância apenas razoável nos resultados. Apenas na propriedade P2 a prevalência encontrada foi igual nos dois testes. Os resultados tiveram concordância moderada a boa nas propriedades P2, P3 e P4. Mas, não houve concordância na propriedade P5 e a concordância foi ruim na propriedade P1,

enquanto a RIFI encontrou 25% a mais de soropositividade na propriedade P1, o ELISA detectou três amostras positivas na propriedade P5 que se apresentou 100% negativa na RIFI.

As vacas dos rebanhos estudados tinham em média 4,2 anos e eram em sua maioria multíparas. Informações sobre a idade não estavam disponíveis para cinco vacas. Não foi encontrada associação entre as variáveis idade e paridade e a ocorrência de anticorpos na RIFI e no ELISA ($P > 0,05$). (Tabela 3).

Tabela 3. Análise estatística e associação entre vacas leiteiras soropositivas na RIFI e no ELISA para *Neospora caninum* considerando cada variável individual (idade e paridade).

Variáveis	RIFI <i>N. caninum</i>			ELISA <i>N. caninum</i>		
	Negativo	Positivo	Valor de P	Negativo	Positivo	Valor de P
^a Idade	≤ 3 anos	28/35	7/35	25/35	10/35	0,4090
	4-5 anos	33/46	13/46	32/46	14/46	
	≥ 6 anos	15/20	5/20	17/20	3/20	
^b Nº de partos	Primíparas (1)	34/42	8/42	33/42	9/42	0,3188
	Multíparas (≥2)	43/61	18/61	42/61	19/61	
	Multíparas (≥2)	18/61	43/61	42/61	19/61	

^a Informações sobre a idade não estavam disponíveis para cinco vacas

^b Informações sobre a paridade não estavam disponíveis para três vacas

3.4 DISCUSSÃO

A ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* nesse estudo foi de 24,5% (26/106) pela RIFI e 27,3% (29/106) pelo ELISA, e considerando apenas os animais soropositivos em ambos os testes foi de 15% (16/106), indicando que as vacas leiteiras da região sudeste do Paraná estão expostas ao protozoário. Locatelli-Dittrich *et al.* (2008) verificaram uma soroprevalência de 20% em vacas leiteiras nessa mesma região utilizando ensaio ELISA. A neosporose é uma doença amplamente detectada nos rebanhos leiteiros em vários países (GOODSWEN, KENNEDY; ELLIS, 2013; LINDSAY; DUBEY, 2020). Apresenta uma alta prevalência em vacas leiteiras no Brasil que pode variar de 11,2 a 91%, conforme a região (RAGOZO *et al.*, 2003; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; DUBEY; SCHARES, 2011) e com uma média de ocorrência superior a 20% em rebanhos leiteiros nas mesorregiões do Paraná (SNAK

et al., 2018; CAMILLO *et al.*, 2010) o que é reforçado pelos resultados destacados nesse estudo.

A infecção por *N. caninum* geralmente está relacionada a taxas de aborto significativas nos rebanhos leiteiros (KLAUCK *et al.*, 2016), vários estudos nesses rebanhos na região do Paraná associaram a soropositividade ao abortamento em vacas (SNACK *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020; PEROTTA *et al.*, 2021). Nas propriedades avaliadas nesse estudo mesmo com uma baixa frequência de abortos relatados e de caráter esporádico, verificamos que o protozoário está circulando nos rebanhos e apresenta uma prevalência significativa. Embora algumas pesquisas relacionem a ocorrência do *N. caninum* ao aumento na idade do animal (GUIMARÃES JR *et al.*, 2004; NAZIR *et al.*, 2013; FÁVERO *et al.*, 2017) e ao maior número de partos (JENSEN *et al.*, 1999; DYER *et al.*, 2000), essas variáveis não estiveram associadas a soropositividade neste estudo. Existe um maior risco de infecção em vacas mais velhas e multíparas pelo maior tempo de exposição ao protozoário e uma possível reativação dos bradizoítos no periparto (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Comparando os dois métodos utilizados, o ensaio ELISA detectou uma soroprevalência ligeiramente maior nas amostragens testadas que a RIFI. Embora essa diferença não tenha sido estatisticamente diferente ($P > 0,05$), ela foi mais evidente ao se observar as prevalências a nível das propriedades. Deve-se considerar que a RIFI está sujeita a variações na interpretação nos resultados por conta da sua avaliação subjetiva (PINHEIRO *et al.*, 2015). Alguns estudos também relataram uma maior porcentagem de amostras positivas detectadas pelo ELISA em relação a RIFI em amostras de bovinos e de outros ruminantes (SARTOR *et al.*, 2003; ANDREOTTI *et al.*, 2009; LEONEL *et al.*, 2016; NOVOA *et al.*, 2020). Essa diferença é atribuída a uma maior sensibilidade do ELISA, mas também pode estar relacionada a uma menor especificidade desse teste pela ocorrência de reações cruzadas ou a altos valores de fundo na leitura da absorbância (PINHEIRO *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2019).

Contudo, no presente estudo, usando como referência a RIFI e considerando uma soroprevalência na região de estudo de 20%, o ensaio ELISA apresentou apenas uma sensibilidade moderada (61,53%) e uma alta especificidade (83,75%). Isso provavelmente se deve a concordância dos testes que foi apenas moderada ($K=0,43$). Apesar de ambos os testes detectarem anticorpos IgG, essa variabilidade nos resultados pode estar relacionada às diferenças nas preparações

dos antígenos utilizados nos testes, os diferentes conjugados e assim como os diferentes determinantes antigênicos de *N. caninum* direcionados à detecção dos anticorpos (VON BLUMRÖDER *et al.*, 2004).

Detectamos nesse estudo amostras soropositivas com titulações baixas, a grande maioria não apresentou títulos superiores a 200 na RIFI. As amostras que foram positivas em ambos os testes eram as de maiores titulações e valores de S/P, título maior que 200 na RIFI e valor de S/P > 1,600 no ELISA. Outros estudos também observaram discrepâncias nos resultados de RIFI e ELISA principalmente em baixos títulos de anticorpos (WOUDA *et al.*, 1998; WAPENAAR *et al.*, 2007).

Essa divergência entre os testes também pode ser justificada pelo ponto de corte, pois a concordância foi maior entre as amostras positivas com título superior a 50 na RIFI. Ao considerar um ponto de corte de 1:100 para RIFI, a sensibilidade do ensaio ELISA aumentou para 80% e a concordância já foi maior ($k=0,55$). A diluição das amostras recomendada pelos fabricantes do kit ELISA foi de 1:100. Reichel *et al.* (2002) e Blumröder *et al.* (2004) relataram aumento na concordância entre ELISA e RIFI após ajustes na diluição de corte e verificaram que a sensibilidade e a especificidade dos testes podem ser alteradas conforme a determinação dos pontos de corte (WAPENAAR *et al.*, 2007)

A RIFI utilizada no presente estudo foi padronizada em nosso laboratório e tem um ponto de corte definido de 1:50 (CAMILLO *et al.*, 2011), porém não existe um consenso quanto ao ponto de corte ideal para o diagnóstico de neosporose em bovinos (DUBEY; SCHARES, 2006). Alguns protocolos de RIFI sugerem uma diluição inicial mais baixa de 1:25 e 1:50 (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001, MEIRELLES *et al.*, 2014; MANSILLA *et al.*, 2019), enquanto outros estudos preconizam pontos de cortes mais altos, variando de 1:100 a 1:200 (VON BLUMRÖDER *et al.*, 2004; WAPENAAR *et al.*, 2007; LEONEL *et al.*, 2016; NOVOA *et al.*, 2020; SARTOR *et al.*, 2020).

Definimos um ponto de corte mais baixo para RIFI em nosso estudo visando uma maior sensibilidade do teste e para interpretação dos resultados do ensaio ELISA esse parâmetro foi determinado de acordo com as instruções do fabricante. A escolha do ponto de corte adequado para o teste sorológico no diagnóstico do *N. caninum* depende da finalidade (WAPENAAR *et al.*, 2007). Para fins de triagem um ponto de corte mais baixo pode ser mais indicado para evitar falsos negativos, enquanto que para um diagnóstico mais específico um ponto de corte mais alto vai refletir em menos

falsos positivos (DUBEY; SCHARES, 2006; NOVOA *et al.*, 2020). Além disso, o ponto de corte deve ser adequado para cada laboratório e considerando as condições epidemiológicas do local do estudo (OIE, 2018; NOVOA *et al.*, 2020).

A concordância apenas moderada entre RIFI e o ELISA indireto observada no presente estudo não coincide com o observado em grande parte dos relatos na literatura científica (LEONEL *et al.*, 2016; MANSILLA *et al.*, 2019; NOVOA *et al.*, 2020). Pode ser difícil comparar resultados de diferentes estudos, já que há uma variedade de ensaios comerciais disponíveis de ELISA indireto, ELISA competitivo e ELISA recombinante (WAPENAAR *et al.*, 2007; BLANCO *et al.*, 2014; NOVOA *et al.*, 2020; SARTOR *et al.*, 2020) ou *in house* (MANSILLA *et al.*, 2019) com diferentes tipos e preparos de antígenos são utilizados nesses ensaios. Também é importante destacar que a maioria dos ensaios ELISAs comerciais disponíveis são importados e com ponto de corte validados a partir de estudos europeus e norte-americanos, que podem não corresponder às características da nossa população alvo.

A ausência de um método padrão ouro torna a interpretação do diagnóstico sorológico da neosporose um desafio e associar o uso de mais de um método pode ser uma opção, mas deve-se sempre considerar o ponto de corte e as particularidades de cada teste.

3.5 CONCLUSÃO

Detectou-se no presente estudo a ocorrência de anticorpos anti *N.caninum* superior a 20%, indicando que o protozoário está circulando nos rebanhos leiteiros na região sudeste do Paraná. A concordância entre as técnicas RIFI e ELISA foi moderada e pode apresentar divergências em níveis mais baixos de anticorpos e conforme o ponto de corte.

REFERÊNCIAS

- ABDELBAKY, H.H. *et al.* Evaluation of *Neospora caninum* serodiagnostic antigens for bovine neosporosis. **Parasitology international**, v. 75, p. 102045, 2020.
- ALVAREZ-GARCÍA, G. *et al.* Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 1-2, p. 85-95, 2013.
- ANDREOTTI, R. *et al.* Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 19-22, 2009.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999
- BLANCO, R.D. *et al.* Desenvolvimento e padronização do Dot-ELISA usando peptídeos recombinantes para o diagnóstico sorológico de *Neospora caninum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 723-727, 2014.
- CAMILLO, G. *et al.* Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 482-486, 2011.
- CERQUEIRA-CÉZAR, C. K. *et al.* All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 253-279, 2017.
- DAVISON, H.C. *et al.* Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p. 163-168, 2001.
- 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.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, 2011.
- DYER, R. M. *et al.* Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 171-181, 2000.

FÁVERO, J.F. *et al.* Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 202-207, 2017.

FRÖSSLING, J. *et al.* Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 3, p. 141-153, 2003.

GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, Paul J.; ELLIS, John T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133-150, 2013.

GUIDO, S. *et al.* Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

GUIMARÃES JR, J. S. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, 2004.

JENSEN, A. M. *et al.* Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3-4, p. 151-163, 1999.

KHAN, A. *et al.* Neosporosis: An Overview of Its Molecular Epidemiology and Pathogenesis. **Engineering**, v. 6, n. 1, p. 10-19, 2020.

KLAUCK, V. *et al.* Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 46-49, 2016.

KIM, Pomy CP *et al.* Serological response to *Neospora caninum* infection in goats and agreement between three diagnostic techniques to detect caprine neosporosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 25-31, 2019.

LASRI, S. *et al.* Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 1-2, p. 25-32, 2004.

LEONEL, J.A.F *et al.* *Neospora caninum*: avaliação de anticorpos e problemas reprodutivos em vacas de corte até 60 dias de gestação. **Ars Veterinaria**, v. 32, n. 2, p. 97-104, 2017.

LINDSAY, D. S. ; DUBEY, J.P Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 205-222, 2020.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 191-195, 2008.

MANSILLA, F. C. *et al.* Development and validation of a novel ELISA for the detection of *Neospora caninum* antibodies in bovine sera. **Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v.7, n.2, não p, 2019.

MCALLISTER, M.M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

MEIRELLES, A. C. F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2204-2209, 2014.

MORÉ, G. *et al.* Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 51-54, 2009

NAZIR, M. M. *et al.* Effects of age and breed on the prevalence of *Neospora caninum* in commercial dairy cattle from Pakistan. **The Journal of parasitology**, v. 99, n. 2, p. 368-370, 2013.

NOVOA, M.B. *et al.* Evaluation of a competitive inhibition ELISA based on the recombinant protein tSAG1 to detect anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 3, p. 401-408, 2020.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases**. Chapter 1.1.6. In: OIE Terrestrial Manual. Paris, France: OIE, 2018

PEROTTA, J.H. *et al.* An abortion storm in dairy cattle associated with neosporosis in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n.2, e001821, 2021.

PINHEIRO, A.F. *et al.* Use of ELISA based on NcSRS2 of *Neospora caninum* expressed in *Pichia pastoris* for diagnosing neosporosis in sheep and dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 148-154, 2015.

REICHEL, M.P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

RIBEIRO, C.M. *et al.* Meta-analysis of the prevalence and risk factors associated with bovine neosporosis. **Tropical animal health and production**, v. 51, n. 7, p. 1783-1800, 2019

SANTOS, do J.R. *et al.* *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: seroprevalence and associated factors in cows from milk farms of Toledo, Parana, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5, p. 1581-1590, 2020.

SARTOR, I. F. *et al.* Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 1-150, 2003.

SHARIATZADEH, S.A. *et al.* The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in bovines: A systematic review and meta-analysis. **Parasitology**, v.148, n.12, 1417-1433, 2021.

SILVA, D.A.O *et al.* Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, 2007.

SINNOTT, F. A. *et al.* Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011–2016). **Veterinary Parasitology**, v. 239, p. 19-25, 2017.

SNAK, A. *et al.* *Neospora caninum* in properties in the west region of Paraná, Brazil: prevalence and risk factors. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 1, p. 52-60, 2018.

VON BLUMRÖDER, D. *et al.* Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 1-2, p. 11-22, 2004.

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.

WOUDA, W. *et al.* Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 5, p. 711-716, 1998.

4. CAPÍTULO II. DETECTION OF TOXOPLASMA GONDII DNA IN MILK FROM DAIRY COWS

ABSTRACT

Consumption of unpasteurized cow's milk may be a transmission route for some pathogenic microorganisms, but there is little information about the risk of *Toxoplasma gondii* infection. Blood and milk samples were collected in a paired and random fashion from 106 dairy cows and bulk-tank milk samples were also collected from each of the six farms, in southern Brazil. Serum anti-*T.gondii* antibodies (IgG) were detected by an indirect fluorescent antibody test (IFAT) with a cutoff point of 1:64. Nested PCR targeting ITS1 was performed on milk samples to detect the Toxoplasmatinae subfamily, confirmed to be *T.gondii* by Sanger sequencing. The occurrence of anti-*T.gondii* antibodies in the herds was 14.1%, (15/106) with seropositive cows in all herds. Antibody titers in positive samples ranged from 64 to 128. *T.gondii* DNA was detected in 2.8% (03/106) of the milk samples. Sequencing of the ITS fragment amplicons revealed 100% identity with *T. gondii* DNA sequences deposited in GenBank (ON809793, ON809794 and ON809795). All cows PCR positive for *T.gondii* in milk were negative for IgG antibodies in serum, suggesting that naturally infected cows may shed *T. gondii* in milk in the acute phase of infection. The results of this study demonstrate that *T. gondii* DNA may be detected in raw cow's milk, so the potential risks of lactogenic infection should be considered. The presence of *T. gondii* DNA in milk does not confirm that the protozoa are viable and infective, and further investigations into the role of cow's milk in the epidemiology of toxoplasmosis are needed.

Keywords: toxoplasmosis; raw milk; dairy cattle; nested PCR; IFAT

4.1 INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan of the phylum Apicomplexa that infects a wide variety of endothermic animals, including man (HILL *et al.*, 2005). *T. gondii* is widely distributed, and has been detected in one-third of the world's human population (MOLAN; WANG; HUNTER, 2019; SHARIATZADEH *et al.*, 2021).

This Sarcocystidae parasite is often related to abortions and reproductive disorders in small ruminants (NAYERI *et al.*, 2021) and is the causative agent of a zoonosis with major public health implications (DUBEY *et al.*, 2020). Toxoplasmosis is an important cause of congenital infections when it affects pregnant women and can result in severe conditions in immunosuppressed individuals (SCHLÜTER *et al.*, 2014).

Some aspects of the epidemiology of toxoplasmosis in cattle are still poorly understood (GOMES *et al.*, 2020). Cattle seem to have acquired a natural resistance to the protozoan (NAYERI *et al.*, 2021), there is no evidence of clinical disease and reports of natural congenital infection are rare in cows (COSTA *et al.*, 2011). However, the seroprevalence of *T. gondii* in this species is relatively high, up to 89.1% in Brazil (GOMES *et al.*, 2020; SHARIATZADEH *et al.*, 2021), and cattle play a role as intermediate hosts and reservoirs of the protozoan (DUBEY; JONES, 2008; SHARIATZADEH *et al.*, 2021).

The definitive hosts of *T. gondii* are the felids that shed oocysts in feces (DUBEY, 2009; SCHLÜTER *et al.*, 2014). Horizontal transmission can occur by ingestion of sporulated oocysts from the environment or by ingestion of raw or undercooked meat with tissue cysts containing bradyzoites (DUBEY *et al.*, 2012). Vertical transmission occurs during pregnancy with the passage of tachyzoites through the placenta (HILL *et al.*, 2005).

There is a paucity of information on the transmission of *T. gondii* through milk and studies are inconclusive (BOUGHATTAS, 2017). Although outbreaks of toxoplasmosis in humans are usually associated with goat milk (ALMERIA; DUBEY, 2021), seroepidemiological studies indicate that raw cow's milk consumption is a risk factor for *T. gondii* infection in pregnant and immunosuppressed women (ALVARADO-ESQUIVEL *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014; HEUKELBACH *et al.*, 2007), and indicate

that any type of milk should be considered a potential source of infection (TENTER *et al.*, 2000).

Lactogenic transmission is mainly attributed to intermittent shedding of tachyzoites into the milk. Experimental studies have shown that infective forms of *T. gondii* remain viable for 3 to 20 days in refrigerated milk and for up to 10 days in fresh artisanal cheese under the same conditions (HIRAMOTO *et al.*, 2001; WALSH *et al.*, 1999). The protozoan has been shown to be present in milk during the acute (LUPTAKOVA *et al.*, 2015) and chronic (OSSANI *et al.*, 2017) phases of infection in sheep. *T. gondii* DNA has been detected in raw milk from some species (ALIPOUR *et al.*, 2018; IACOBUCCI *et al.*, 2019; PERRUCCI *et al.*, 2021; PETERSEN, 1984; POWELL; BREWER; LAPPIN, 2001; SAAD *et al.*, 2018).

Cow's milk is affordable and is the most widely consumed milk worldwide (BORAWSKI *et al.*, 2021; BOUGHATTAS, 2017), but there are few studies investigating the presence of *T. gondii* in raw bovine milk (ALIPOUR *et al.*, 2018; CISAK *et al.*, 2017). In rural regions and on family farms, cow's milk is often consumed raw and may be used in the production of artisanal fresh cheese without pasteurization (COSTA *et al.*, 2020), which makes it a potential risk factor for infection (BOUGHATTAS, 2017).

The aim of the present study was to evaluate the occurrence of anti-*T. gondii* antibodies in dairy cow serum and to detect *T. gondii* DNA in samples of raw cow's milk from small family herds in the southern region of Brazil.

4.2.MATERIALS AND METHODS

This research was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Agricultural Sciences Department of the Federal University of Paraná (CEUA-UFPR n°. 011/19).

4.2.1 Animals and study area

The study was carried out in six herds (H1-H6) with a history of abortion randomly selected from small properties in the municipalities of União da Vitória (26° 13' 48" S 51° 05' 11" W), Piraquara (25° 26' 30" S 49° 03' 48" W), Pinhais (25° 26' 41" S 49° 11' 33" W) and São José dos Pinhais (25° 32' 05" S 49° 12' 23" W) in Parana State, Southern Brazil (Figure 1.) All herds had a history of sporadic abortions of unknown cause and the animals were bred in semi-extensive and extensive systems.

Figure 1. Geographic locations of sampled dairy farms in Parana State, Brazil



Fonte: Banco de imagens Canvas, 2022.

Between October and December 2020, paired blood and milk samples were collected from 106 adult dairy cows (age ≥ 2 years). The cows were Holstein, Jersey, and Brown Swiss breeds. Samples were taken from 15 to 20 lactating dairy cows per herd. In herds with less than 15 lactating cows, all cows were included in the sampling. A milk sample from the bulk milk tank (BT1-BT6) from each farm was collected, on the same day as the individual sample collections.

4.2.2 Sample collection

Blood samples were collected by coccygeal venipuncture or from the mammary vein and stored in tubes without anticoagulants. Once clotted, the samples were centrifuged at 2,295 g for five minutes. Serum samples were stored at -20 °C for subsequent serological testing. After previous disinfection with 70% alcohol, a pooled 50mL sample of milk was also collected manually from the four quarters of each dairy cow. Milk samples from the bulk tank milk were collected from aseptically the external outlet tap. The milk samples were placed in sterilized centrifuge tubes, kept under refrigeration, and processed within 48 hours.

4.2.3 Serological test - Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)

An indirect fluorescent antibody test (IFAT) was used to detect IgG in serum samples, as previously described by Locatelli-Dittrich *et al.* (2006) and Meirelles *et al.* (2014), with some modifications. Antigen slides were produced using *T. gondii* (RH strain) tachyzoites obtained in vitro VERO cell cultures. Serum samples were diluted in phosphate-buffered saline solution (PBS – 0.1M phosphate, 0.33M NaCl, pH 7.2) using a cut-off of 1:64 titer for positivity. The anti-bovine IgG antibody conjugated with FITC (Sigma, USA) was diluted at 1:100. Slides were mounted using buffered glycerin and 24x60 mm coverslips and were then read using an immunofluorescence microscope (Olympus). Serum samples from *T. gondii* seropositive and seronegative cows were used as positive and negative controls. Only the presence of fluorescence along the entire surface of the tachyzoites was considered as a positive result. Positive samples were titrated to the maximum titer of the reaction.

4.2.4 Sample pre-treatment and DNA extraction

Milk samples were centrifuged at 2400 g at 4 °C for 10 minutes to separate the fat layer and supernatant. Milk samples were pretreated to remove PCR inhibitory substances as described by Vismarra *et al.* (2017). The pellet at the bottom of the tube was treated with 200 µL of TE (1mM EDTA, 10mM Tris HCL pH 7.6 and 300 µL 0.5 M EDTA pH 8) to dissolve the casein (Murphy *et al.*, 2002). The solution was resuspended and centrifuged at 4500g for 10 minutes. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 200 µL of PBS (pH 7.2) (MANCIANTI *et al.*, 2013).

DNA extraction from milk was performed using a commercial kit (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen™, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions with some adaptations by Murphy *et al.* (2002) and Usman *et al.* (2014). In the first step of extraction, the samples were incubated at 55 °C with proteinase K and lysis solution for one to three hours, until the pellet was completely lysed. DNA was resuspended in 75 µL of the elution solution and stored at -20 °C prior to nPCR.

4.2.5. Nested PCR

A nested PCR (nPCR) targeting the partial internal transcribed spacer 1 (ITS1) region of Sarcocystidae family (ŠLAPETA *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2011). The primers were selected to amplify specific DNA of sub-families Toxoplasmatinae and Sarcocystinae, resulting respectively, in fragments of approximately 420 bp and 900 bp. The external primers JS4/CT2c (CGAAATGGGAAGTTTTGTGAAC-CTGCAATTCACATTGCGTTTCGC) and the internal primers JS4b/CT2b (AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-TTGCGCGAGCCAAGACATC) were used for amplification.

Each amplification was performed in 25 µL reaction mixtures containing 1x PCR buffer (Invitrogen®, Waltham, MA, USA), 1.5 mM-MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleotide, 0.03 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®, Waltham, MA, USA), 0.6 µM primers, 2.0 µL template DNA and ultrapure water. For the second amplification reaction, 1µL of the product from the first reaction was used. Amplifications were run in a PCR Thermal Cycler (Applied Biosystems™ 2720, Foster

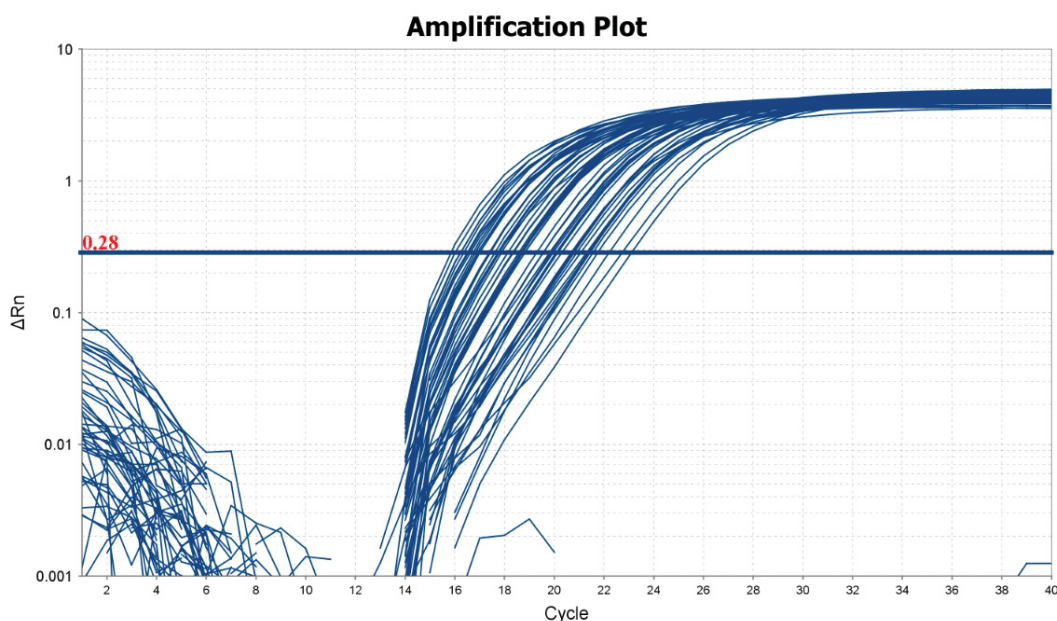
City, CA, USA). The Cycling conditions began with one cycle of 94°C for 3 minutes; followed by 35 cycles of 94°C for 40s; 56°C for 30s; 72°C for 30s; and a final extension step of 72°C for 5 minutes. Negative controls (ultrapure DNase–RNase-free distilled water) and positive DNA control samples isolated from *T. gondii* (RH strain) were included in each reaction.

Amplification products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel prepared in TAE 1X buffer and stained with SYBR® Safe DNA gel staining (Invitrogen®, Waltham, MA, USA). The PCR products were visualized in the ultraviolet transilluminator and DNA fragment size was compared with a standard molecular weight, 100 bp DNA ladder - Ludwig Biotec® (Ludwig Biotechnology, Porto Alegre, RS, BRAZIL).

4.2.6 Real time PCR

Negative samples were tested for the presence of the endogenous control 18S (Figure 2). All samples amplified 18S segment. The efficiency of the DNA extraction protocol was evaluated by real-time PCR amplification of the 18S rRNA gene as previously described by others (MORRIS, KHAN.; PICHICHERO *et al.*, 2017; WIGINGTON *et al.*, 2016) with some adaptations. The 10 µL reaction volume used for each sample contained 1 µL of extracted DNA, 5 µL of Fast SYBR® Green Master Mix and ROX added as a passive reference dye (Applied Biosystems™, San Diego, CA, USA), 0.4 µM of upstream and downstream primers: 5'GAG ACT CTG GCA TGC TAA CTA.G3' and 5'GGA CAT CTA AGG GCA TCA CAG3' and 4.1 µL of ultrapure DNase–RNase-free distilled water. A QuantStudio™5 Real Time PCR System (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA) was used with 0.2 mL thin-wall strips or 96 well plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Figure 2. Negative samples endogenous control 18S, real-time PCR.



Fonte: O autor, 2022.

4.2.7 Sequence analysis

Toxoplasmatinae PCR positive products were enzymatically purified with ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and subjected to direct sequencing in an ABI 3500XI Genetic Analyser automated sequencer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) using forward and reverse primers. Nucleotide (nt) sequences were assembled using the Chromas and Bioedit. The sequences obtained were compared initially using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) with similar sequences found in the GenBank.

4.2.8 Statistical analysis

Chi-square tests and Fisher's tests were performed to verify the association between IFAT positive dairy cows and molecular detection of *T. gondii* in milk and the variables: age and parity, respectively. For the evaluation of the age variable, 3 categories were established: A- ≤ 3 years, B - 4-5 years and C ≥ 6 years. Values of $P \leq$

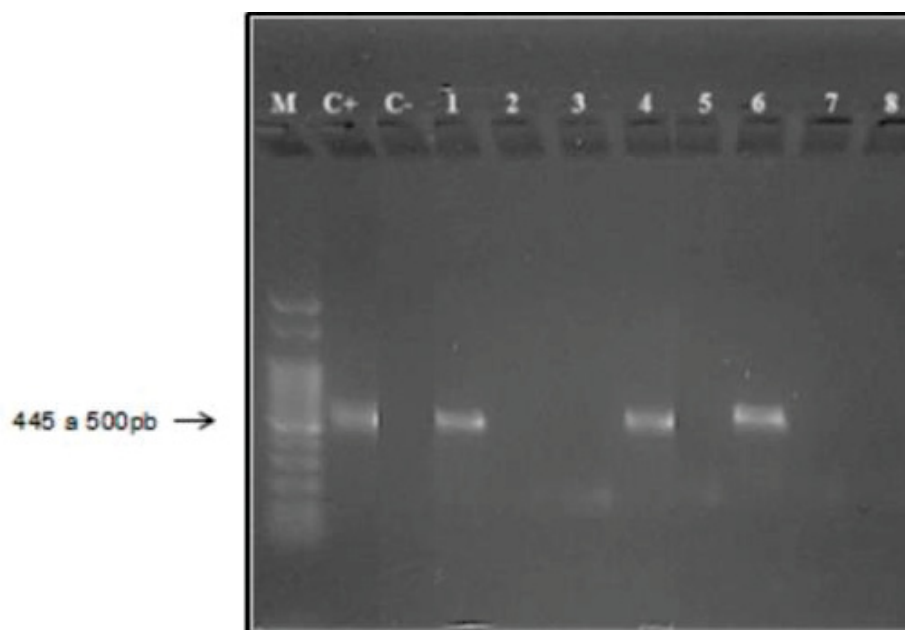
0.05 were considered statistically significant. Statistical analyzes were performed using MedCalc, version 12.4.

4.3 RESULTS

The overall seroprevalence of anti-*T. gondii* antibodies was 14.1% (15/106). Seropositive cows were detected in all herds. Antibody titers in positive samples ranged from 64 to 128.

Toxoplasma gondii DNA was detected in 2.8% of the individual milk samples (3/106). The milk samples in which *T. gondii* DNA was detected were from three seronegative cows. Positive samples were found in two of the six herds evaluated (Figure 3).

Figure 3 *Toxoplasma gondii*-specific amplification products obtained by nPCR of the ITS segment, M = Molecular mass marker Ludwig 100pb, C+ (positive control), C- (negative control), lanes 1,4 and 6 (positive milk samples), 2, 3,7 and 8 (negative milk samples).



Fonte: O autor, 2022.

Sanger sequencing from ITS fragments revealed sequences with 100% identity with *T. gondii* sequences deposited in GenBank. The ITS1 sequences generated in the present study are available in GenBank™ database under the accession numbers: ON809793, ON809794 and ON809795.

Toxoplasma gondii DNA was not detected in any of the bulk tank milk samples. The results of nPCR in milk samples and serology according to each herd are described in Table 1.

Table 1. Herd location, percentages of positive *Toxoplasma gondii* DNA in milk by nested PCR (nPCR) and anti-*T. gondii* antibodies detection in blood by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)

Herds	Nested PCR Positive	IFAT Positive/Total (%)
	Milk samples/Total (%)	
H1- Piraquara	0/20 (-)	1/20 (5%)
H2- Piraquara	0/14 (-)	1/14 (7.1%)
H3 -São José dos Pinhais	0/15 (-)	9/15 (60%)
H4 - União da Vitória	0/20 (-)	1/20 (5%)
H5 -Pinhais	1/18 (5.5%)	2/18 (11.1%)
H6 - São José dos Pinhais	2/19 (10.5 %)	1/19 (5.2%)
Total	3/106 (2.8%)	15/106 (14.1%)

Table 2. Statistical analysis and association between dairy cows seropositive for IgG anti-*Toxoplasma gondii* and the molecular detection of *T. gondii* in milk considering each individual variable (Age, parity).

Variables		IFAT <i>T. gondii</i>			Nested PCR		
		Negative	Positive	P value	Negative	Positive	P value
^a Age	≤ 3 Years	29/35	6/35	0.770	34/35	1/35	0.8509
	4-5 Years	40/45	5/45		44/45	1/45	
	≥ 6 Years	18/21	3/21		20/21	1/21	
^b Parity	Primiparous (1)	40/42	2/42	0.0398	41/42	1/42	0.7415
	Múltiparous (≥2)	49/61	12/61		59/61	2/61	

^a Five dairy cows were not reported as old

^b The number of calvings was not reported for three cows

There was no association between the occurrence of *T. gondii* DNA in milk and the detection of anti-*T. gondii* antibodies in serology (IFAT), because *T. gondii* DNA was not detected in the milk of any seropositive cow. Evaluating the variables age and parity, an association was observed between seropositivity and parity (Table 2).

4.4 DISCUSSION

In the present study, *T. gondii* DNA was detected in 2.8% of raw milk samples from naturally infected cows, indicating that the protozoan can be eliminated in cow's milk. The consumption of raw milk represents a potential zoonotic risk because pathogenic microorganisms, including *T. gondii*, may be present when unpasteurized (VAN DEN BROM *et al.*, 2020).

In this study, nPCR was used to detect ITS1 gene sequences, a technique with high sensitivity and capable of detecting the protozoan at levels as low as 1 to 5 genome equivalents per reaction (SU *et al.*, 2010). The molecular identification of the amplicons found in the present study indicated a 100% homology with the *T. gondii* DNA sequences deposited in the GenBank and revealed similarity with the sequence (Accession number JQ235842.1) found in goat's milk in Northeastern Brazil (SILVA *et al.*, 2015).

This is the first report of the detection of *T. gondii* DNA in cow's milk in Brazil. *Toxoplasma gondii* DNA has been reported in cow's milk in Iran and Poland with a prevalence of 3.5% (DEHKORDI *et al.*, 2013), 5.0% (ALIPOUR *et al.*, 2018) and 15.9% (CISAK *et al.*, 2017), all higher than in the present study.

Brazil has one of the highest seroprevalences of *T. gondii* infection in humans and animals (DUBEY *et al.*, 2012; SHARIATZADEH *et al.*, 2021). Around 50-80% of women of childbearing age have anti-*T. gondii* antibodies (DUBEY *et al.*, 2012) and 14.1% of seropositive pregnant women report consuming raw cow's milk (MOURA *et al.*, 2013). This context makes the presence of *T. gondii* DNA in cow milk in herds in southern Brazil more relevant.

In the present study, *T. gondii* was found in 14.1% of dairy cows and seropositive cows were detected in all herds. Studies in Brazil report a wide variation in the occurrence of anti-*T. gondii* antibodies in cows, with frequencies ranging from 0.4% to 71.0% in studies that also used the IFAT method (GOMES *et al.*, 2020; SHARIATZADEH *et al.*, 2021). In studies using other serological methods, seroprevalence in cows can reach up to 89.1% (GOMES *et al.*, 2020). Besides the difference in serological techniques used, this wide variation in *T. gondii* seroprevalence may be explained by the climatic diversity of each geographic region

that can influence the dissemination of the protozoan in the environment (YAN *et al.*, 2016).

The considerable number of seropositive cows in this study may be related to the predominantly semi-extensive and extensive breeding system of the herds studied. Grazing animals may be more susceptible to ingestion of sporulated *T. gondii* oocysts in the environment (SILVA *et al.*, 2015). The presence of the definitive host can also explain this seroprevalence. Cats were resident in five of the six herds evaluated, and in the two herds in which positive milk samples were detected by nPCR, the residual milk from milking was offered to the cats. This practice can be a potential source of infection for the definitive host and contribute to the permanence of the protozoan in the herd.

The seropositive cows had low antibody titers in the IFAT, ranging from 64 to 128. About 70% of the diagnoses of *T. gondii* infection in ruminants in Brazil are performed using the IFAT technique (GOMES *et al.*, 2020) and it is the second most used method in research worldwide (SHARIATZADEH *et al.*, 2021). These studies indicate that low antibody titers are often found in cattle. The low titers found in this study suggests that seropositive cows are likely to be in a chronic phase of infection and this may be related to the parasite resistance mechanisms developed in this species (GOMES *et al.*, 2020; OPSTEEGH *et al.*, 2011).

In the present study there was no relationship between the excretion of *T. gondii* in milk and serum antibodies, since *T. gondii* DNA was detected in the milk of three seronegative cows. The IFAT technique used in this study does not detect acute phase antibodies, IgM, (LUPTAKOVA *et al.*, 2015) but only IgG, chronic phase antibodies (SAAD *et al.*, 2018). The cows that were shedding *T. gondii* in their milk may be in the early stages of the disease, with IgG levels too low to be detected by IFAT (ROCHA *et al.*, 2015).

The IgG antibodies against *T. gondii* can be detected from 2 weeks to 2 months after infection, when they reach their peak (SILVA *et al.*, 2015). While the DNA of *T. gondii* tachyzoites can be identified for a period of up to 12 to 15 days after infection, after which they convert to bradyzoites in tissue cysts and are no longer detectable in body fluids (PEREIRA *et al.*, 2010). The results of the present study suggest that the nPCR positive cows were possibly in the acute phase of the disease (PEREIRA *et al.*, 2010).

A similar result was observed in other studies that identified *T. gondii* DNA in the milk of seronegative goats and sheep (BEZERRA *et al.*, 2015; SANTANA ROCHA *et al.*, 2015; SROKA *et al.*, 2017). Silva *et al.* (2015) detected protozoa DNA in the milk of five goats, none of which was seropositive in IFAT. As in the present study, *T. gondii* DNA was not detected in the milk of any seropositive goat. Experimental studies indicate that the excretion of *T. gondii* in milk can occur intermittently (DUBEY *et al.*, 2014), but not all seropositive animals shed the protozoan in milk (BEZERRA *et al.*, 2015; CAMOSSO *et al.*, 2011; MANCIANTI *et al.*, 2013). The excretion of *T. gondii* in milk can be influenced by the stage of infection, the immunological status of the animal and the stage of lactation (LUPTAKOVA *et al.*, 2015).

Other authors have identified a relationship between *T. gondii* infection and the age and parity of cows (ABDALLAH *et al.*, 2019; GHAREKHANI *et al.*, 2021; SPIŠÁK *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2012). In the present study, an association was observed between seropositive cows and parity, but the number of calvings did not seem to influence the shedding of *T. gondii* in milk. The seropositive cows were mostly multiparous, potentially having had a longer exposure to the risk of infection. Although there was no association between seropositivity or positive PCR with age, cows with the highest number of calvings are also the oldest, with longer exposure to the protozoan and, therefore, may be more susceptible to postnatal infection (STELZER *et al.*, 2019). Although some studies in ewes suggest that reactivation of bradyzoites may result in circulating tachyzoites that can be eliminated in milk, there is no evidence on the recrudescence of *T. gondii* in the peripartum period in cows (CAMOSSO *et al.*, 2011; OSSANI *et al.*, 2017).

Toxoplasma gondii DNA was not detected in any of the milk samples from the bulk-tank in the evaluated herds, probably due to the low prevalence of nPCR positivity in individual milk samples. These positive samples may be diluted in the total mass of milk in the bulk tank, making it impossible to identify the protozoan DNA by nPCR (VERONESI *et al.*, 2018). Gharekhani *et al.* (2021) detected *T. gondii* DNA in 5.4% (16/149) of bulk-tank milk samples from dairy herds in Iran. In a study in Egypt, a bulk-tank milk sample from a cattle herd was PCR positive for *T. gondii* (FEREIG *et al.*, 2022).

Brazil is home to the largest number of toxoplasmosis outbreaks reported in the world (PINTO-FERREIRA *et al.*, 2019; DUBEY, 2021). Results such as those of this study emphasize the importance of preventive measures to ensure the health of

herds and milk, especially in countries like Brazil. According to records from the Ministry of Health, more than 14,000 outbreaks of foodborne diseases were reported in the country from 2007 to 2021, nine of which were caused by *T. gondii* infection and 452 by pathogens transmitted by milk and dairy products (BRASIL, 2021).

In addition, cultural and dietary habits may pose a potential risk and may be related to the transmission patterns of toxoplasmosis in certain regions (PINTO-FERREIRA et al., 2019). Furthermore, despite the legal prohibition of commercial sales of raw milk in the country, raw milk consumption is still common, especially in rural regions and informal markets. Raw milk is also often used to produce artisanal cheeses (VIDAL-MARTINS et al., 2013; COSTA et al., 2020).

Thus, the risk of lactogenic infection should not be overlooked. However, the presence of *T. gondii* DNA in milk is not sufficient to determine whether tachyzoites remain viable or infective. Therefore, further investigation into the role of cow's milk in the epidemiology of toxoplasmosis is therefore required.

4.5 CONCLUSION

The results of this study suggest that naturally infected cows may excrete *T. gondii* in milk in the acute phase of infection. *Toxoplasma gondii* DNA can be detected in milk from cows by nPCR, but the shedding of the protozoan in milk is not associated with the presence of IgG anti-*T. gondii* antibodies in serum.

REFERENCES

ABDALLAH et al. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, and goats in Algeria: seroprevalence and risk factors. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 3, p. 63, 2019.

ALIPOUR, M.; RAHIMI, E.; SHAKERIAN, A. Retracted: Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in different types of raw milk and traditional dairy product samples. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 6, e12575, 2018.

ALMERIA, S.; DUBEY, J. P. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 371-385, 2021.

ALVARADO-ESQUIVEL, C. *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in patients with vision and hearing impairments, cancer, HIV, or undergoing hemodialysis in Durango, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 505-508, 2010.

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, n. 4, p. 421-424, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. Banco de dados de surtos de DTHA 2000 a 2021. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 21 Out. 2022. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes>. Acesso em: 23 de mai. de 2022.

BÓRAWSKI, *et al.* Changes in the Milk Market in the United States on the Background of the European Union and the World. **Eur. Res. Stud. J**, n.1, v. 24, p. 1010-1033, 2021. Special Issue.

BOUGHATTAS, S. *Toxoplasma* infection and milk consumption: Meta-analysis of assumptions and evidences. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2924-2933, 2017.

CAMOSSI, L. G. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3-4, p. 256-261, 2011.

CISAK, E. *et al.* Presence of pathogenic Rickettsiae and protozoan in samples of raw milk from cows, goats, and sheep. **Foodborne pathogens and disease**, v. 14, n. 4, p. 189-194, 2017.

COSTA, G.H.N. *et al.* *Toxoplasma gondii*: infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 277-281, 2011.

COSTA, da M.A. *et al.* Artisan fresh cheese from raw cow's milk as a possible route of transmission in a toxoplasmosis outbreak, in Brazil. **Zoonoses and public health**, v. 67, n. 2, p. 122-129, 2020.

DEHKORDI, F.S. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 120-125, 2013.

DUBEY, J.P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.

DUBEY, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877-882, 2009.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P. *et al.* Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. **Journal of food protection**, v. 77, n. 10, p. 1747-1753, 2014.

DUBEY, J.P. *et al.* Public Health Significance of *Toxoplasma gondii* Infections in Cattle: 2009–2020. **The Journal of Parasitology**, v. 106, n. 6, p. 772-788, 2020.

DUBEY, J.P. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2021.

FEREIG, Ragab M. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies and DNA in raw milk of various ruminants in Egypt. **Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1305, 2022.

GHAREKHANI, J. *et al.* Herd-level contamination of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* in milk of Iranian dairy farms. **Food Microbiology**, v. 100, 103873, 2021.

GOMES, D. F.C. *et al.* *Toxoplasma gondii* in cattle in Brazil: a review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n.1, e015719, 2020.

HEUKELBACH, J. *et al.* Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. **Emerging infectious diseases**, v.13, n. 2, p. 287, 2007.

HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal health research reviews**, v. 6, n. 1, p. 41-61, 2005.

HIRAMOTO, R. M. *et al.* Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n.2, p. 113-118, 2001.

IACOBUCCI, E. *et al.* Detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* DNA within the milk of Mongolian livestock. **Parasitology research**, v. 118, n. 6, p. 2005-2008, 2019.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3-4, p. 215-221, 2006.

LUPTAKOVA, L. *et al.* DNA detection of *Toxoplasma gondii* in sheep milk and blood samples in relation to phase of infection. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 3-4, p. 250-253, 2015.

MANCIANTI, F. *et al.* Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. **BioMed research international**, v. 2013, 905326, 2013

MEIRELLES, A.C.F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 44, n.12, p. 2204-2209, 2014.

MOLAN, A. *et al.* Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots. **Trop Biomed**, v. 36, n. 4, p. 898-925, 2019.

MORRIS, M.C.; KHAN, M. N.; PICHICHERO, M.E. A PCR-based method for quantifying neutrophils in human nasal secretions. **Journal of immunological methods**, v. 447, p. 65-70, 2017.

MOURA, de F.L. *et al.* Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant and postpartum women attended at public healthcare facilities in the City of Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n.2, p. 200-207, 2013.

MURPHY, M.A.; SHARIFLOU, M.R.; MORAN, Chris. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 4, p. 645-649, 2002.

NAYERI, T. *et al.* Global prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the aborted fetuses and ruminants that had an abortion: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary Parasitology**, v.290, 109370, 2021.

OPSTEEGH, M. *et al.* Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. **International journal for parasitology**, v.41, n.3-4, p.343-354, 2011.

OSSANI, R. A. *et al.* *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on west mesoregion of Santa Catarina state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n.5, p. 1294-1300, 2017.

PEREIRA, K. S.; FRANCO, R.M.B; LEAL, D. A.G. Transmission of toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by foods. **Advances in food and nutrition research**, v. 60, Chapter 1, p. 1-19, 2010.

PERRUCCI, S. *et al.* Apicomplexan Protozoa Responsible for Reproductive Disorders: Occurrence of DNA in Blood and Milk of Donkeys (*Equus asinus*) and Minireview of the Related Literature. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 111, 2021

PETTERSEN, E.K. Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology**, v. 92, n. 1-6, p. 175-176, 1984.

PINTO-FERREIRA, F. *et al.* Patterns of transmission and sources of infection in outbreaks of human toxoplasmosis. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 12, p. 2177-2182, 2019.

POWELL, C.C.; BREWER, M.; LAPPIN, M.R. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 29-33, 2001.

SAAD, N.M.; HUSSEIN, A.A.A; EWIDA, R.M. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in raw goat, sheep, and camel milk in Upper Egypt. **Veterinary World**, v. 11, n. 9, p. 1262, 2018.

SANTANA ROCHA, de D. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected sheep's milk. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8658-8662, 2015.

SCHLÜTER, D. *et al.* Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 917-929, 2014.

SHARIATZADEH, S.A. *et al.* The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in bovines: A systematic review and meta-analysis. **Parasitology**, v.148, n. 12, p. 1417-1433, 2021.

SILVA, da M.G. *et al.* Epidemiological factors associated with seropositivity for toxoplasmosis in pregnant women from Gurupi, State of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n.4, p. 469-475, 2014.

SILVA, da J.G. *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.

SLAPETA, J.R. *et al.* Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, v. 163, n. 2, p. 147-154, 2002.

SOARES, R.M. *et al.* Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 168-172, 2011.

SPIŠÁK, F. *et al.* Prevalence estimation and genotypization of *Toxoplasma gondii* in goats. **Biologia**, v. 65, n. 4, p. 670-674, 2010.4.

SROKA, J. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. **Folia Parasitologica**, v. 64, 2017.023, 2017.

STELZER, S. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 15, e00037, 2019.

SU, C. *et al.* Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 2010.

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

USMAN, T. *et al.* Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3319-3328, 2014.

VAN DEN BROM, R. *et al.* Zoonotic risks of pathogens from sheep and their milk borne transmission. **Small Ruminant Research**, v. 189, 106123, 2020.

VERONESI, F. *et al.* Screening of *Toxoplasma gondii* positive sheep flocks in Perugia Province (Umbria Region, Central Italy) using bulk milk analyses. **Large Animal Review**, v.24, p.185-187, 2018.

VIDAL-MARTINS, A.M.C. *et al.* Avaliação do consumo de leite e produtos lácteos informais e do conhecimento da população sobre os seus agravos à saúde pública, em um município do Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim de Indústria Animal**, v.70, n. 3, p. 221-227, 2013.

VISMARRA, A. *et al.* *Toxoplasma gondii* and pre-treatment protocols for polymerase chain reaction analysis of milk samples: a field trial in sheep from Southern Italy. **Italian Journal of Food Safety**, v. 6, n. 1, p. 6501, 2017.

WALSH, C. P. *et al.* Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, n.5, 73S-74S, 1999.

WIGINGTON, C.P. *et al.* The polyadenosine RNA-binding protein, zinc finger Cys3His protein 14 (ZC3H14), regulates the pre-mRNA processing of a key ATP synthase subunit mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 43, p. 22442-22459, 2016.

XU, M. J. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in dairy cows in subtropical southern China. **Parasitology**, v.139, n.11, p.1425-1428, 2012.

YAN, C. *et al.* Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2016.

5. CAPÍTULO III. STANDARDIZATION OF A SYBR GREEN REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF THE Nc5 SEGMENT FROM NEOSPORA CANINUM

Abstract

There is a practical need for a fast and efficient method to detect *Neospora caninum* in infected tissues and fluids. The aim of the present study was to establish a SYBR Green-based real-time PCR assay for detection of the Nc5 segment from the parasite genome. Four primer sets were evaluated, one previously used for conventional PCR (NP7/NP10), and three sets designed in this study. Primers NP7/NP10 were selected and reaction conditions optimized. Tachyzoites of Nc-1 reference strain were manually quantified and used to calculate the limit of detection (LOD) for conventional and real-time PCR. The assay was evaluated in triplicate, in three independent PCR runs performed by two technicians to generate robust results. Efficiency, analytical sensitivity, precision (repeatability and reproducibility) and specificity were assessed. The standard curve determined by 10-fold serial dilutions (1 to 1×10^{-7}) established a reaction efficiency of 102.34%, a correlation coefficient (R^2) of 0.999 and a slope of -3.267. LOD of the real-time PCR assay was 0.456 tachyzoites DNA per reaction, as compared to 45.62 for the conventional method. SYBR green real-time PCR was 100 times more sensitive than the conventional method. Precision analysis within triplicates and between three runs showed 100% intra- and inter-assay repeatability at the minimum detection limit. The PCR assay cycle intervals between each dilution ranged from 2.98 to 3.43 cycles. The highest coefficient of variation (CV%) between replicates for the trials performed on three different days and by two technicians ranged from 2.89 to 5.79%. The intra-assay variation showed no significant differences between the means of C_q in the replicates ($P > 0.05$). The inter-assay variation showed no difference in the means of C_q between the technicians ($P > 0.05$), indicating that the assay is robust and accurate. The protocol had high specificity, confirmed by melting curve analysis and no cross-reactions with other tested microorganisms. The applicability of the assay was tested and *N. caninum* DNA was detected in milk, blood, amniotic fluid, placenta, fetal tissue, liver, heart, muscle, lung and central nervous system (CNS) samples from different species. The SYBR Green-based PCR protocol standardized in this study is a highly sensitive and specific method, reproducible and applicable for the detection of *N. caninum* in different biological samples.

Keywords: Neosporosis; Diagnosis; Nc5; Optimization; real time PCR; SYBR green

5.1 INTRODUCTION

The absence of a gold standard method for diagnosis of *Neospora caninum* (MCALLISTER *et al.*, 2016; MANSILLA *et al.*, 2019) and the limitations for the detection of the protozoan *in vivo* are a challenge to control of this infection in livestock herds (OPSTEEGH *et al.*, 2011). Definitive diagnosis usually depends on *post-mortem* detection of the protozoan in the central nervous system (CNS) or fetal tissues using histopathological and molecular techniques (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004; DUBEY; SCHARES, 2006). *Ante-mortem* diagnosis in body fluids such as milk, semen, blood, serum and amniotic fluid is also possible (OKEOMA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005; MCINNES *et al.*, 2006; ALIPOUR *et al.*, 2018; CABRAL *et al.*, 2022). Tissue samples are not always available or may be in advanced stages of autolysis, which makes accurate diagnosis difficult and requires more sensitive detection techniques (DUBEY; SCHARES, 2006; MCALLISTER, 2016).

Most of the routinely used detection methods for *Neospora caninum* have low sensitivity and tests require several days for completion. Serological tests can cross-react with other similar parasites (GONDIM *et al.*, 2017), or false negatives may occur due to the particular dynamics of the host-parasite interaction (GUIDO *et al.*, 2016). Serological techniques are laborious, and interpretation of results can be subjective (NOVOA *et al.*, 2020). In addition, specificity and sensitivity of tests can vary greatly when evaluating samples from the field or experimentally infected animals (CHATZIPRODROMIDOU; APOSTOLOU; 2017).

Conventional and nested PCR have become popular for diagnostic purposes due to their higher specificity compared to serological detection (MUELLER *et al.*, 2001; HUGHES *et al.*, 2006; JENKINS *et al.* 2007, BARRATT *et al.*, 2008; YAMAGE *et al.*, 1996). However, these methods have limitations with regard to sensitivity, cross-contamination, and time. The development from conventional to real-time PCR has improved the efficiency of pathogen detection, including for protozoa. Real-time semiautomated PCR is superior to nested PCR with respect to cross-contamination and time, yielding results in a few hours in the laboratory (BELL; RANFORD-CARTWRIGH, 2002).

SYBR Green systems (SCHNEEBERGER *et al.*, 1995) and TaqMan hydrolysis probes (HOLLAND *et al.*, 1991) were first developed in the late nineties. SYBR Green is an intercalating dsDNA binding dye, convenient for simple assay design and has relatively lower running costs than hydrolysis probe-based assays (DEPREZ *et al.*, 2002; CAO *et al.*, 2013). This intercalating dye assay offers a good alternative to probe-based techniques and melting curve analysis of the amplification products allows the evaluation of nonspecific amplifications (DASH *et al.*, 2012). Thus, the development of more accurate diagnostic tests that are as reliable as real-time PCR for the detection of the protozoan parasite has been the focus of studies in recent decades (REICHEL; WAHL; ELLIS, 2020).

The Nc5 gene is a highly specific DNA segment (MULLER *et al.*, 2001) and occurs as a repeated sequence in the *N. caninum* genome (AL-QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010). This sequence is not found in any other taxon (MULLER *et al.*, 2001) and shows $\geq 95\%$ identity with most of the publicly available *N. caninum* sequences, making this region an attractive target for new molecular diagnostic assays (BARRY *et al.*, 2019). Some real-time PCR assays have been developed for *N. caninum* detection (MUELLER *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2014; MAHITTIKORN *et al.*, 2017), but there are few SYBR Green-based protocols described in the literature for the Nc5 gene (COLLANTES-FERNANDEZ *et al.*, 2002; OKEOMA *et al.*, 2005, BARTLEY *et al.*, 2008; GHALMI *et al.*, 2008; GONZÁLEZ-WARLETA *et al.*, 2018) and there are few studies published in Brazil (BROM *et al.*, 2014).

Under heterogeneous environmental conditions microorganisms can diversify into specific subpopulations that are genotypically and phenotypically distinct (PALKOVÁ, 2004). Studies indicate that *N. caninum*, due to its worldwide distribution and wide range of intermediate hosts, has heterogeneous populations with large genetic and biological variation (AL QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010; CALARCO; ELLIS, 2020). Sequencing data show intraspecific variation among specimens (ARBABI *et al.*, 2016), including differences detected in amplified sequences of the Nc5 segment (CORREA-CASTRO *et al.*, 2021).

Given the need for additional protocols for the epidemiological surveillance of *N. caninum* and considering the genetic and biological diversity of the species (CALARCO; ELLIS, 2020), new protocols must be tested in local samples before they can be used for diagnostic purposes in any given region. Thus, the aim of the present study was to standardize and validate a sensitive, specific, precise and robust real-

time SYBR Green-based assay for the detection of Nc5 segment of *N. caninum* in a variety of animal specimens.

5.2 MATERIAL AND METHODS

5.2.1 Validation of primer sequences

Previously reported primers targeting the Nc5 gene, NP7 and NP10 (YAMAGE *et al.*, 1996; JENKINS *et al.*, 2007), and primers designed in-house in this study were used (NP7+ and NP10+). Primers were tested in four different combinations: NP7 and NP10; NP7+ and NP10; NP7 and NP10+; NP7+ and NP10+ (Table 1).

The oligo-analyzer tool showed no secondary structures, hairpins, homodimers, or cross dimers in the primer set sequences designed in this study. Analysis of selected primer sequences indicated adequate GC content and melting temperature. Primer-BLAST analysis showed that all the primer sets only matched with the expected target size of *N. caninum* genome (reference strain *Neospora caninum* Nc-1), indicating that the SYBR Green performance would be sufficiently sensitive for *N. caninum* detection.

Table 1. Name, sequences, amplicon sizes and bibliographic references of Nc5 primers used for the conventional and SYBR green-based real-time PCR for *Neospora caninum*.

Primer Name	DNA Sequence (5'-3')	Amplicon Size (bp)	References	PCR
NP7	GGG TGA ACC GAG GGA GTT G	198	YAMAGE <i>et al.</i> , 1996.	Conventional and real-time PCR
NP10	TCG TCC GCT TGC TCC CTA TGA AT		JENKINS <i>et al.</i> , 2007.	
NP7+	GTG TTC TGT GTT GAG GCA ACA CC	71	This study	Real-time PCR
NP10	TCG TCC GCT TGC TCC CTA TGA AT		JENKINS <i>et al.</i> , 2007.	
NP7	GGG TGA ACC GAG GGA GTT G	107	YAMAGE <i>et al.</i> , 1996.	Real-time PCR
NP10+	TTG ACA CAC TGT CCA CAG CCT G		This study	
NP7+	GTG TTC TGT GTT GAG GCA ACA CC	65	This study	Real-time PCR
NP10+	TTG ACA CAC TGT CCA CAG CCT G		This study	

PCR: Polymerase Chain Reaction, bp: Base pair.

5.2.2 Optimization

Four key points of real-time PCR reactions were considered for method adaptation and optimization: annealing temperature, primer sequences, primers and DNA concentrations (BRASIL, 2015). Optimization of each parameter was performed by varying it while keeping the rest fixed at a given value, OFAT (one-factor-at-a-time) methodology. At each step, the optimum value of each parameter was selected using the highest annealing temperature and the lowest quantification cycle (C_q); to minimize dimerization. Assays were performed in triplicate in all cases (BUSTIN *et al.*, 2009). The methods were repeated with optimum primer proportion and optimum annealing temperature to confirm the consistency of the melting curve and melting peak. To evaluate the selected primers, the following real-time PCR conditions were determined: annealing temperatures of 55, 60 and 64 °C; primer concentrations of 0.1, 0.2 and 0.4 μM and DNA concentrations of 10, 20 and 40 ng/uL.

5.2.3 Tachyzoites quantification

Nc-1 tachyzoites (DUBEY *et al.*, 1988) were used to infect Vero cells. The growing tachyzoites lysed the Vero cell and the parasites were released. The content of the culture flask was centrifuged (1500 g for 10 minutes) and the pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and flushed through a 25-gauge needle to lyse any intact Vero cells remaining. The tachyzoites were harvested by centrifugation (1500× g for 10 minutes) and the pellets were resuspended in PBS (pH 7.4). The number of tachyzoites was counted in a Neubauer chamber. The total number of tachyzoites/mL was determined by the formula: mean N⁰ of tachyzoites x 10⁴ x dilution factor. A total of 228.125 tachyzoites of *N. caninum* were pelleted and stored in ultrafreezer until DNA extraction.

5.2.4. DNA Extraction

The pellet with 228.125 tachyzoites was resuspended in 200 μL of PBS (pH 7.4). Genomic DNA was extracted using PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The DNA of 228.125 parasites was resuspended in 100 μL of elution buffer, which resulted in a final concentration of 2281 tachyzoites DNA equivalent/ μL .

5.2.5 Conventional PCR

Conventional PCR for the Nc5 region of *N. caninum* was carried out in triplicate with primers NP7 and NP10 (Table 1). The PCR 25 μL reaction contained 1x PCR buffer (Invitrogen®, Waltham, MA, USA), 1.5 mM-MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleotide, 0.03 U/ μL of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®, Waltham, MA, USA) and 0.6 μM primers with 3.0 μL of DNA sample. Amplifications were carried out in a Mastercycler gradient Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) with an initial denaturing step at 94 °C for 2 minutes, with 30 cycles of 94 °C for 30 seconds, 63 °C for 1 minute, 72 °C for 1 minute and finally 1 cycle of 72 °C for 5 minutes. The amplification was a modification of Yamage et al. (1996) and Jenkins et al. (2007). Negative and positive controls (ultrapure DNase-RNase-free distilled water and DNA from Nc-1 isolate) were included in all reactions.

Amplification products were analyzed by electrophoresis at a constant voltage of 95 V for 1 hour through a 1.5% agarose gel prepared in TBE 1 X buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid and 2 mM EDTA pH 8). The amplicons were visualized with ultraviolet light after Gel Red® staining (Biotium, Fremont, CA, USA). The DNA fragment size was compared with a standard molecular mass marker, 100pb DNA Ladder - Ludwig Biotec® (Ludwig Biotechnology, Porto Alegre, RS, BR).

5.2.6 Real-time PCR assay

5.2.6.1 *N. caninum*

Real-time PCR was conducted in final volume of 10 μ L with the amplification mixture for each reaction comprising of 2.2 μ L of ultrapure DNase–RNase-free distilled water, 5 μ L PowerTrack Fast SYBR® Green Master Mix 2x kit (Applied Biosystems™, San Diego, CA, USA) and ROX added as passive reference dye, 0.4 μ M Forward Primer NP10, 0.4 μ M Reverse primer NP7, and 2 μ L DNA template. The temperature cycling process was carried out at 95 °C for 2 minutes, with 40 cycles of denaturation process at 95 °C for 15 seconds and annealing at 64 °C for 30 seconds. Furthermore, the melt curve and peak analyses were carried out immediately at 95 °C for 15 seconds, 60 °C for 1 minute and 95 °C for 15 seconds.

5.2.6.2 18S

The primer set for the internal control (IC) gene (18S) which amplifies a 128 bp was used to validate the extraction of negative samples (WIGINGTON *et al.*, 2016; MORRIS; KHAN; PICHICHERO 2017). The real-time PCR reaction was prepared in a 10 μ L reaction volume for each sample with 5 μ L of PowerTrack Fast SYBR® Green Master Mix 2x Kit (Applied Biosystems™, San Diego, CA, USA) and ROX added as passive reference dye, 0.5 μ L of extracted DNA, , 0.4 μ M of upstream and downstream primers (5'GAG ACT CTG GCA TGC TAA CTA.G3' and 5'GGA CAT CTA AGG GCA TCA CAG3') and 4.1 μ L of ultrapure DNase–RNase-free distilled water. The amplification was performed by 1 cycle at 95 °C for 2 minutes, 40 cycles including denaturation at 95 °C for 15 seconds, and annealing for 30 seconds at 60 °C. The dissociation curve was 95 °C for 15 seconds, 60 °C for 1 minute and 95 °C for 15 seconds. The fluorescence was obtained, during the second incubation of 95 °C for 15 seconds.

The real-time PCR reactions were performed in a 7500Fast Real-time PCR System (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA) in 0.2 mL thin-wall strips or 96 well plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.2.7 Efficiency - Standard Curve

A standard curve was calculated using the 10-fold dilutions of tachyzoite DNA templates with SYBR Green real-time PCR. A linear regression analysis was performed by plotting the quantification cycle (C_q) values against the logarithm of the copy number of the gene targeted.

5.2.8 Precision, Analytical Sensitivity and Specificity

The Minimum Information for publication of quantitative Real-Time PCR Experiment (MIQE) guidelines (BUSTIN *et al.*, 2009) recommends that even qualitative PCR for pathogen diagnostics should provide information about assay performance, including precision and limit of detection (LOD). To determine the LOD for *N. caninum*, tenfold serially diluted samples from 1 to 1 x 10⁻⁷ (4,562.5 to 0.000456 tachyzoites/reaction) in TE Buffer (Tris-EDTA) were used as template in triplicates. A total number of eighteen replicates were tested for each dilution point. MIQE guidelines define LOD as the lowest concentration at which 95% of the positive samples are detected (BUSTIN *et al.*, 2009). Precision was evaluated by testing each Nc-1 standard dilution in triplicates, on three different days, by two different technicians. The values of standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were calculated to determine the repeatability and reproducibility of the assay.

To validate the SYBR Green protocol field samples were tested in addition to the reference strain (Nc-1). These included positive *ante-* and *post-mortem* field samples from the following tissues: liver, heart, lung, central nervous system (CNS), placenta, fetus heart, amniotic fluid, blood and milk.

Negative samples from a variety of tissues: CNS, spleen, heart, lung, kidney, liver, bladder, uterus, lymph node, placenta, Cerebrospinal Fluid (CSF), Fetal Bovine Serum (FBS), amniotic fluid, blood and milk, previously tested through nested and conventional PCR, were included. To assess the specificity of the SYBR Green real-time PCR assay, strains and isolates of 26 microorganisms: thirteen protozoan (orders coccidia, piroplasmida and kinetoplastida) six viruses (*Bovine leukosis virus*,

Bluetongue virus, *Bovine viral diarrhoea virus 1*, *Pseudorabies virus*, *Bovine herpesvirus 1* and *Bovine herpesvirus 5*), seven bacteria (genus *Listeria*, *Pasteurella*, *Salmonella* and *Leptospira*) were included. These uninfected controls were assayed in parallel to assure test specificity.

The positive and negative field samples, strains and isolates of microorganisms used for the applicability and specificity analysis belonged to the laboratory or were made available by researchers and partner laboratories.

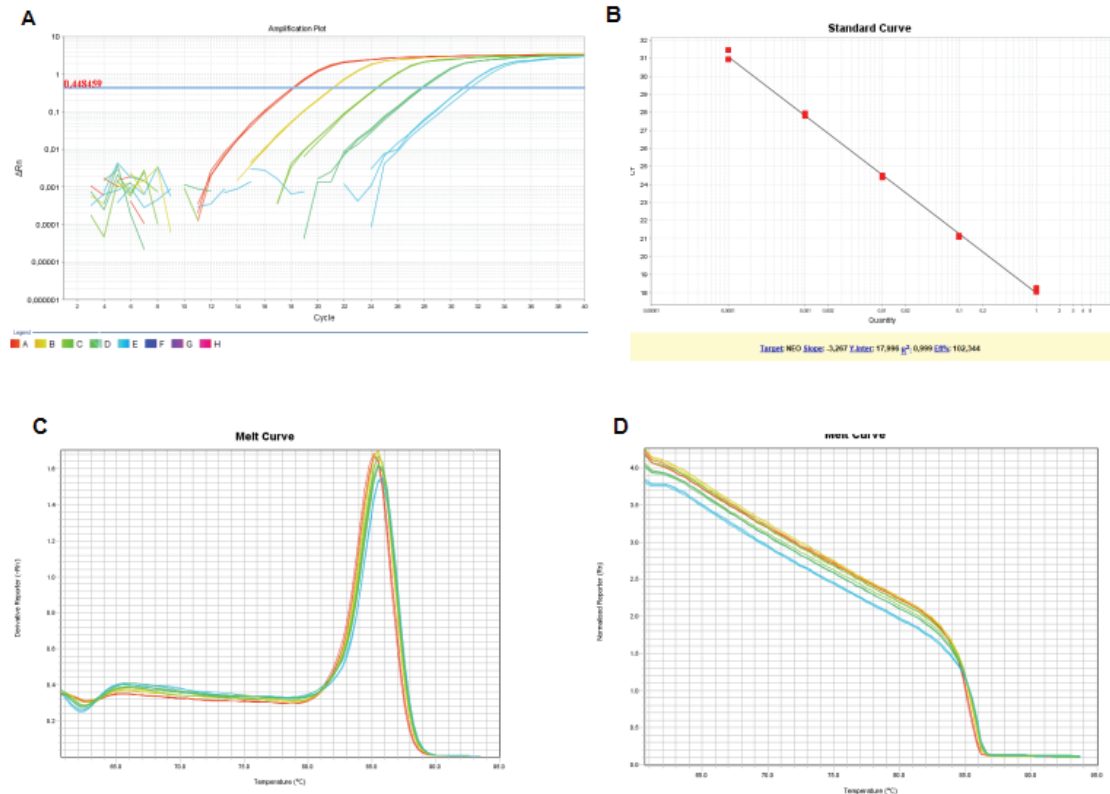
5.2.9 Statistical analysis

To evaluate inter-assay and intra-assay variations, the following measures of dispersion were determined: mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (%CV) of the C_q value for the triplicate real-time PCR reactions, repeated on three different days and by two different technicians. The one way ANOVA was performed for analysis of the variance of the intra-assay (repeatability) and inter-assay (reproducibility). P values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyzes were performed using Minitab® Statistical Software.

5.3 RESULTS

In our study, the optimal condition of annealing temperature was set at 64 °C, DNA concentration 40 ng/μL, and the best primer set NP7 and NP10 at a primer concentration of 400 nM generating an amplicon size of 198 bp. The expected amplicon T_m was 85 °C with a sharper melt curve and peak value as shown in Fig.1C

Figure 1 - SYBR Green real-time PCR efficiency and standard curve with total DNA from *N. caninum*, Nc-1 reference strain. A). *N. caninum* amplification with SYBR green real-time PCR of 10-fold serial dilutions of Nc-1: 1 to 1 x 10⁻⁴. B). Standard Curve: amplification efficiency: 102,34, R2 (correlation coefficient): 0,999 and Slope: -3,267. C) Melt Curve derivative reporter, T_m: 85^o C and D) Melt Curve Normalized reporter.



Fonte: O autor, 2022

5.3.2 Efficiency/ Standard curve

The standard curve linearity for the dilutions in triplicate resulted in a correlation coefficient (R²) of 0.999, slope of -3.267, and amplification efficiency of 102.34%. The cycle intervals between dilutions were 2.98 to 3.43 cycles (Figure 1B). The average coefficient of variation ranged from 3.88% to 4.82%, depending on the concentration of the DNA sample (Table 2).

5.3.3 Precision and Limit of Detection (LOD)

Measurement of 10-fold serial dilutions of Nc-1 indicated that the SYBR green assay could detect 0.456 of *N. caninum* DNA equivalent (Table 2, Figure 2C), while the conventional PCR detected 45.62 tachyzoites, 1.5% agarose gel (Figure 2A).

Table 2 . Number of tachyzoites per microliter and reaction, quantification cycle, standard deviation, number replicates, percentage of positive replicates and average coefficient of variation per each 10-fold serial dilution.

Dilution	Tachyzoites DNA/uL	Tachyzoites DNA/ reaction (2 uL)	Mean Cq /SD	Positive/ Replicates**	% Positive samples***	CV%
Pure	2,281,5	4,562.5	15.74±0.75	18/18	100	4.82
10 ⁻¹	228.15	456.25	18.59±0.81	18/18	100	4.38
10 ⁻²	22.81	45.62	21.97±0.86	18/18	100	3.92
10 ⁻³	2.28	4.56	25.74±0.99	18/18	100	3.88
10 ^{-4*}	0.228*	0.456*	28.92±1.14	18/18	100	3.95
10 ⁻⁵	0.0228	0.0456	--	8/18	44	--
10 ⁻⁶	0.00228	0.00456	Undetermined	0/18	0	0
10 ⁻⁷	0.000228	0.000456	Undetermined	0/18	0	0

*Limit of detection: lowest concentration at which 95% of the positive samples were detected with the real-time PCR, 10⁻⁵ was excluded from the coefficient of variation analysis of the assay.

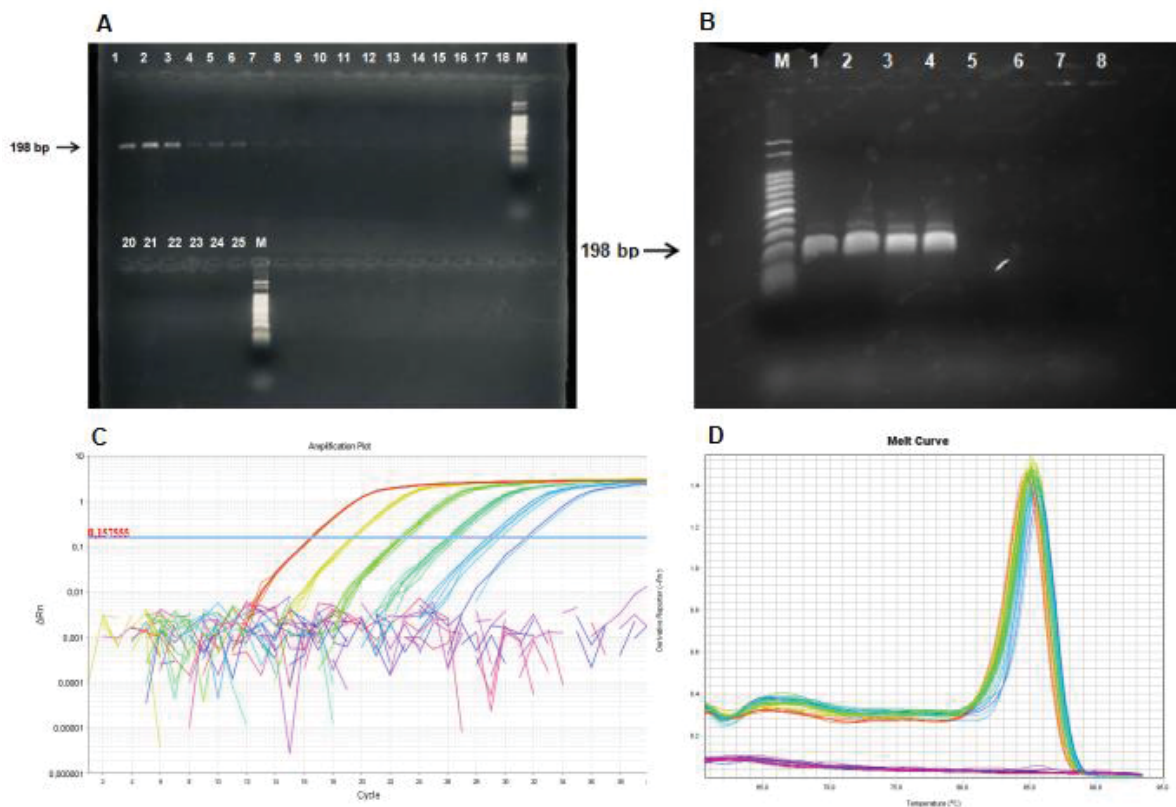
** Number of positive replicates over total replicates.

***Percentage of positive samples were detected with the real-time PCR.

Cq: Quantification cycle, SD: Standard deviation, CV: Coefficient of variation.

To demonstrate that the addition of the SYBR Green I dye did not alter the specificity of the PCR reaction, we analyzed the products of the real-time PCR reaction containing the SYBR Green I dye by using gel electrophoresis (Figure 2B). The specificity was not altered since nonspecific bands or primer-dimers were not observed.

Figure 2. Limit of Detection (LOD) for conventional and Real-time PCR with total DNA from Nc-1 reference strain *N. caninum* tachyzoites quantified manually in a Neubauer Chamber. A) *N. caninum* specific amplification products obtained in conventional PCR with Np7 and Np10 primers in 1,5% agarose gel. Lanes 1-3 Nc-1 pure; Lines 4-6 Nc-1 10^{-1} ; Lines 7-9 Nc-1 10^{-2} ; Lanes 10-12 Nc-1 10^{-3} , Lanes 13-15 Nc-1 10^{-4} ; Lanes 16-18 Nc-1 10^{-5} ; Lane 19 - M: Molecular mass marker (Ludwig, RS, Brazil). Lanes 20-22 Nc-1 10^{-6} , Lanes 23-25 Nc-1 10^{-7} and Lane 26 - M: Molecular mass marker (Ludwig, RS, Brazil), Limit of detection was 10^{-1} . B) *N. caninum* specific amplification products obtained in real-time PCR with Np7 and Np10 primers of 10-fold serial dilutions of Nc-1: 1 to 1×10^{-7} in 1,5% agarose gel to verify the absence of primer dimers. Lanes 1 Nc-1 pure, Line 2 Nc-1 10^{-1} , Line 3 10^{-2} , Line 4 Nc-1 10^{-3} , Line 5 Nc-1 10^{-4} , Line 6 Nc-1 10^{-5} , Line 7 Nc-1 10^{-6} , Line 8 Nc-1 10^{-7} . C) *N. caninum* amplification with SYBR green real-time PCR of 10-fold serial dilutions of Nc-1: 1 to 1×10^{-7} . Limit of detection was 10^{-4} , lowest concentration at which 95% of the positive samples were detected with the real-time PCR, 10^{-5} was excluded because it resulted 44% positive. D) Melt Curve showing assay specificity, T_m : 85°C .



Fonte: O autor, 2022

The analysis of precision within triplicates and among three runs showed 100% intra- and inter-assay repeatability at 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} dilutions, for real-time PCR. Reproducibility between runs performed by two different technicians was maintained until 10^{-4} . Below the limit of detection of 10^{-4} - 10^{-5} results showed a random agreement pattern across the different triplicates and runs (Table 2). No detection was possible at dilutions of 10^{-5} (Figure 2C).

The highest coefficient of variation (CV%) found between replicates for the trials performed on three different days and by two technicians ranged from 2.89 to 5.79%. The mean interassay and intra-assay CV was 4.19 % and standard deviation (SD) was 1.67. There was no significant difference in intra-assay variation between the means of Cq in the replicates of each technician (P=0.851 and P=0.921), and no difference in the means of Cq (P=0.901) for inter-assay variation, indicating that the assay is robust and accurate.

5.3.4 Sensitivity

Sensitivity of the PCR assay was measured using tachyzoite DNA, which was serially diluted tenfold from different initial concentrations. To evaluate the matrix effect clinical samples with positive results were also tested and resulted positive. (Table 3). Sample amplifications with a Cq value < 38 were considered positive and samples without amplification or with a Cq value \geq 38 were considered negative. Melting curve analysis showed no primer-dimer formation and a unique melting peak at 85 °C for positive reference control and field samples (Figure 2).

Table 3 . Detection of *Neospora caninum* in different specimens by real-time PCR assay

Target	Matrix*/Origin	Results of <i>N. caninum</i> real-time PCR
Animal		
Cattle	CNS, liver, lung, blood, and milk	Positive
Horse	CNS, placenta, fetus heart, blood, amniotic fluid	Positive
Sheep	CNS, blood	Positive
Goat	CNS	Positive
Dog	Liver	Positive
Avian	CNS, heart, muscle	Positive
Protozoan		Positive
<i>N. caninum</i>	<i>N. caninum</i> strain Nc-1	Positive

* All tissues were frozen. CNS: Central nervous system, *N. caninum*: *Neospora caninum*.

5.3.5 Specificity

No other protozoa, viruses or bacteria were amplified in this assay, demonstrating high specificity (Table 4).

Table 4 . Specificity of the real-time PCR assay by analyzing the results of different negative targets.

Target	Matrix/Origin	Results of <i>Neospora caninum</i> real-time PCR
Animal species		
Cattle	CNS, heart, spleen, kidney, liver, lung, uterus, bladder, lymph node, blood, fetal serum, stomach fluid and milk	No Cq
Horse	CNS, blood, placenta, CSF, amniotic fluid	No Cq
Sheep	Blood	No Cq
Goat	Blood	No Cq
Protozoa		
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	OK638969	No Cq
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Strain provided by the Trypanosomosis Reference Laboratory, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Paraná	No Cq
<i>Toxoplasma gondii</i>	Strain RH	No Cq
<i>Sarcocystis cruzi</i>	Cs	No Cq
<i>Sarcocystis neurona</i>	Cs	No Cq
<i>Babesia caballi</i>	Cs	No Cq
<i>Babesia canis</i>	Cs	No Cq
<i>Babesia bovis</i>	Cs	No Cq
<i>Theileria equi</i>	Cs	No Cq
<i>Leishmania braziliensis</i>	Strain provided by the Leishmaniasis Reference Laboratory, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Paraná	No Cq
<i>Leishmania amazonensis</i>	Strain provided by the Leishmaniasis Reference Laboratory, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Paraná	No Cq
<i>Leishmania infantum</i>	Strain provided by the Leishmaniasis Reference Laboratory, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Paraná	No Cq
<i>Leishmania guyanensis</i>	Strain provided by the Leishmaniasis Reference Laboratory, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Paraná	No Cq
Viral species		
BLV	Cs	No Cq
BTV	Antigen LT (05/1992) provided by Reference Laboratory, Panaftosa. Rio de Janeiro	No Cq
BVDV-1	Singer strain RFB (21/11/1983) provided by Reference Laboratory, Panaftosa, Rio de Janeiro	No Cq
PRV	Cs	No Cq
BHV-1	Cs	No Cq
BHV-5	Field isolate (2017), bovine, CNS	No Cq
Bacteria		
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	No Cq
<i>Pasteurella multocida</i>	Cs	No Cq
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	No Cq
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	No Cq
<i>Leptospira grippo</i>	Provided by the Leptospirosis Reference Laboratory, Adolfo Lutz, São Paulo	No Cq
<i>Leptospira castellani</i>	Provided by the Leptospirosis Reference Laboratory, Adolfo Lutz, São Paulo	No Cq

CNS: Central nervous system, CSF: Cerebrospinal fluid, BLV= Bovine leukosis virus, BTV= Bluetongue virus, BVDV-1= Bovine viral diarrhoea virus 1, PRV= Pseudorabies virus, BHV-1= Bovine herpesvirus 1, BHV-5= Bovine herpesvirus 5, Cs= Clinical sample, Cq= Quantification cycle.

5.4 DISCUSSION

This study evaluated a real-time SYBR green PCR for the detection of *N. caninum* in different biological samples and compared it with the conventional PCR method. The primer set used was complementary to the Nc5 sequence and had a high specificity index with a 198 bp amplicon. These primers have no homology with the genomic sequences of other protozoa from the Sarcocystidae family or other organisms. Oligonucleotides were specific for their target by melting curve analysis, which showed a unique symmetrical peak in all samples analyzed. Conventional PCR products by agarose gel electrophoresis proved to be specific with no primer-dimers.

PCR efficiency was established by generation of standard curves with *N. caninum* Nc-1 genomic DNA. The calibration curves indicated a high efficiency of the real-time PCR assay and an excellent standard curve linearity for the triplicate dilutions ($R^2 = 0.999$, slope = -3.267 and E = 102.34%). According to guidelines for validation, PCR efficiency (E) for qualitative real-time PCR methods (BROEDERS *et al.*, 2014) should be between 90% and 110%, the correlation coefficient (R^2) ≥ 0.98 and the slope between -3.9 and -2.9. The present assay met these criteria and showed a high amplification efficiency similar to that seen in other studies. Real-time PCR protocols based on SYBR green for the Nc5 target showed E values ranging from 92.48% to 107% and R^2 from 0.998 to 0.999 (COLLANTES-FERNANDEZ *et al.*, 2002., GHALMI *et al.*, 2008; MAHITTIKORN *et al.*, 2017; BARRY *et al.*, 2019).

The MIQE guidelines define the limit of detection (LOD) as the lowest concentration at which 95% of positive samples are detected (BUSTIN *et al.*, 2009). A total of eighteen replicates were tested - increasing the number of replicates increases the confidence level of the LOD (KRALIK; RICCHI, 2017). In our study the LOD of the real-time PCR assay based on SYBR green was estimated to be 0.456 tachyzoites DNA per PCR reaction. Other highly sensitive and reliable protocols with lower or the

same detection limit for Nc5 gene detection validated with SYBR green obtained LOD of 0.10 to 10 genome equivalents (COLLANTES-FERNANDEZ *et al.*, 2002; GHALMI *et al.*, 2008; MAHITTIKORN *et al.*, 2017). The protocol used in this study had a higher sensitivity than a probe-based PCR protocol with an LOD equivalent to the genome of 3 tachyzoites (BARRY *et al.*, 2019). However, it should be noted that similarly to the method of the present study, Collantes-Fernandez *et al.* (2002) and Ghalmi *et al.* (2008) manually counted parasites in a Neubauer chamber, while BARRY *et al.* (2019) relied on the estimated molecular weight to establish the LOD.

Comparisons between studies are difficult because the sensitivity of the assays may be slightly different since different primers for Nc5, a 1205bp sequence (KAUFMANN *et al.*, 1996) that exists in multiple copies (GONDIM *et al.*, 2004; SLAPETA *et al.*, 2002), were designed and used in those studies. In addition, to determine the detection limit in this study we did not evaluate all possibilities of equivalent DNA, we tested the approximate range from 0.0456 (10^{-5}) to 0.456 (10^{-4}). The performance score between the ranges was a detection of 44% (8/18) and 100% (18/18), respectively. It would be necessary to test different concentrations of tachyzoites to evaluate other smaller intermediate amounts of DNA equivalent.

We validated the conversion of a standard PCR assay (JENKINS *et al.*, 2007) to a real-time assay with the fluorescent intercalating dye SYBR Green I. The standardized real-time PCR assay in this study was 100 times more sensitive than conventional PCR, which detected 45.62 tachyzoites. Conventional PCR had higher sensitivity than a nested PCR assay that had a LOD of 64 tachyzoites in peripheral blood (CORREA-CASTRO *et al.*, 2021). However, a well-established conventional PCR assay (YAMAGE *et al.*, 1996) showed considerably higher sensitivity, being able to reliably detect 1 tachyzoite DNA. Our study did not use nested or semi-nested PCR, and whilst these techniques could improve the sensitivity of conventional PCR, they increase the risks of contamination.

The SYBR green-based PCR assay is robust; it showed agreement in results for all replicates performed by two technicians, between runs at all dilutions above the lower limit of detection (pure to dilution 10^{-4}). According to Nolan *et al.* (2013) a robust method is one in which performance is unaffected by changes in the experimental parameters. Brasil (2015) stated that the repeatability variation should be less than 5%, the higher intra- and inter-assay average coefficient of variation (CV) in this study was

4.82% and standard deviation (SD) was less than 1.67 for all replicates, 6 runs, eight DNA concentrations, three days and two technicians.

Collantes-Fernandez et al. (2002) reported a CV of 0.98 % for the Cq of 10 tachyzoites equivalents (26.5 ± 0.3) and Barry et al. (2019) a relative SD of less than or equal to 1.03 %. Although there was a relatively greater variation in our assay than observed in other studies for some specific dilutions, the average CV was less than 5 % which is satisfactory for an accurate real-time PCR protocol and superior as a diagnostic tool than conventional PCR. No significant variation ($p > 0.05$) was observed between the mean Cq values in the analysis performed or replicates, days and technicians, revealing adequate repeatability and reproducibility of the assay.

The applicability of the assay was tested on field samples from naturally infected animals. Our real-time PCR method was sensitive and able to detect *N. caninum* in a variety of biological samples i.e. tissues, blood, milk and amniotic fluid from different species. These detections were specific for the target gene, as no amplification was observed for known negative tissue and body fluid samples nor for the genome of 26 other microorganisms (protozoa, viruses and bacteria) tested, including closely related protozoa such as *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis cruzi* and *Sarcocystis neurona*, indicating that this SYBR green-based real-time PCR protocol is highly specific.

The Nc5 sequence was chosen as the target for our assay because of its high specificity for *N. caninum* detection and because it is a segment that repeats multiple times in the protozoan genome (CORREA-CASTRO *et al.*; 2021), since the ITS1 sequence is potentially more variable (GONDIM *et al.*, 2004). *Neospora caninum* appears as heterogeneous populations with great genetic and biological variation around the world (Al QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010; CALARCO; ELLIS, 2020; CORREA-CASTRO *et al.*, 2021 and different assays may show discordance in results because of small differences in sensitivity due to the presence of genotypic variability.

In summary, it was possible to optimize and validate the conversion of a conventional PCR into a SYBR green-based real-time PCR assay for *N. caninum* detection with high analytical efficiency and specificity. The protocol had a low LOD, was 100 times more sensitive than conventional PCR, robust and with satisfactory reproducibility and ability to detect the protozoan in different animal specimens. Thus, the standardization of this method may be a useful tool for diagnosis and advances in

the investigation of the epidemiology of *N. caninum* and benefit prevention and control strategies for the parasite.

5.5 CONCLUSION

A SYBR Green-based real-time PCR assay to detect part of the Nc5 gene sequence of *N. caninum* was established. The protocol has been validated to show satisfactory performance, high efficiency and specificity, and with an analytical sensitivity superior to conventional PCR. It reliably detected the limit of 0.456 tachyzoites. This is a robust and reproducible real-time PCR method applicable in many types of *ante-* and *post-mortem* specimens.

REFERENCES

- ALIPOUR, M.; RAHIMI, E.; SHAKERIAN, A.. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in different types of raw milk and traditional dairy product samples. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 6, e12575, 2018.
- AL-QASSAB, S.E.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum*. **Diversity**, v. 2, n. 3, p. 411-438, 2010.
- ARBABI, M. *et al.* Identification of latent neosporosis in sheep in Tehran, Iran by polymerase chain reaction using primers specific for the Nc-5 gene. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 83, n. 1, p. 1-7, 2016.
- BARRATT, J. *et al.* The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 4, p. 228-233, 2008.
- BARRY, R. *et al.* A probe-based real-time PCR assay for the detection of *Neospora caninum* in clinical samples from cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 269, p. 2-6, 2019.
- BARTLEY, P. M. *et al.* Inoculation of Balb/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 13-21, 2008.
- BELL, A.S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.C. Real-time quantitative PCR in parasitology. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 338-342, 2002.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 57p, 2015.

BROEDERS, S. *et al.* Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 115-126, 2014.

BROM, P. R. F. *et al.* Genetic characterization of *Neospora caninum* strains from clinical samples of zebuine fetuses obtained in abattoirs in Goiás, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 381-387, 2014.

BUSTIN, S.A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n.4, p. 611-622, 2009.

CABRAL, L. D. R. *et al.* Detection of *Neospora spp.* and *Sarcocystis neurona* in amniotic fluid and placentas from mares. **Veterinary Parasitology**, v. 303, 109678, 2022.

CALARCO, L.; ELLIS, J. Species diversity and genome evolution of the pathogenic protozoan parasite, *Neospora caninum*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 84, 104444, 2020.

CAO, Heping *et al.* Quantitative PCR for glucose transporter and tristetraproline family gene expression in cultured mouse adipocytes and macrophages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 49, n. 10, p. 759-770, 2013.

CHATZIPRODROMIDOU, I. P.; APOSTOLOU, T. Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblot (IB) for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in milk from dairy cows. **Epidemiology & Infection**, v. 146, n. 5, p. 577-583, 2017.

CORREA-CASTRO, T.A; GÓMEZ-PALACIO, A.M.; PULIDO-MEDELLÍN, Martin-Orlando. Genetic Detection of *Neospora caninum* in the Blood of Dairy Cattle from Boyacá, Colombia. **Revista Científica**, v. 41, n. 2, p. 252, 2021.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. *et al.* Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, 2002.

DASH, P. K. *et al.* Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of YFV infection in *Aedes aegypti*. **Virology Journal**, v. 9, n. 27, 2012.

DEPREZ, R.H.L. *et al.* Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v. 307, n. 1, p. 63-69, 2002.

DUBEY, J. P. *et al.* Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006.

FERRE, I. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1504-1518, 2005.

GHALMI, F. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 161-167, 2008.

GONDIM, L.F. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 34, n. 2, p. 159–161, 2004.

GONDIM, L.F.P; MINEO, J.R.; SCHARES, G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia spp.*, *Neospora spp.*, *Sarcocystis spp.* and *Besnoitia besnoiti*. **Parasitology**, v. 144, n. 7, p. 851-868, 2017.

GONZÁLEZ-WARLETA, M. *et al.* Endogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* during successive pregnancies across three generations of naturally infected sheep. **Veterinary research**, v. 49, n. 106, 2018.

GUIDO *et al.* Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

HOLLAND, P.M. *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, 1991.

HUGHES, J. M. *et al.* The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 29-36, 2006.

JENKINS, M.C. *et al.* *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 161-165, 2007.

KAUFMANN, H. *et al.* Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 4, p. 289-298, 1996.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 108, 2017.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

MAHITTIKORN, A. *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification technique and comparison with quantitative real-time PCR for the rapid visual detection of canine neosporosis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 394, 2017.

MANSILLA, F.C. *et al.* Development and validation of a novel ELISA for the detection of *Neospora caninum* antibodies in bovine sera. **Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v.7, n.2, 204, 2019.

MCALLISTER, M.M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

MCINNES, L.M. *et al.* Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. **Veterinary parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 207-213, 2006.

MORRIS, M.C.; KHAN, M.N.; PICHICHERO, M.E. A PCR-based method for quantifying neutrophils in human nasal secretions. **Journal of Immunological Methods**, v. 447, p. 65-70, 2017.

MÜLLER, N. *et al.* Comparative molecular investigation of Nc5-PCR amplicons from *Neospora caninum* Nc-1 and *Hammondia heydorni*-Berlin-1996. **Parasitology Research**, v. 87, n. 10, p. 883-885, 2001.

MÜLLER, N. *et al.* Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 252-255, 2002.

NOLAN, *et al.* **Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR) First Edition**. National Measurement System, Middlesex, UK: LGC, 99p, 2013.

NOVOA, M.B. *et al.* Evaluation of a competitive inhibition ELISA based on the recombinant protein tSAG1 to detect anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 3, p. 401-408, 2020.

OKEOMA, C.M. *et al.* The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 307-315, 2004.

OKEOMA, C. M. *et al.* *Neospora caninum*: quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 48-55, 2005.

OPSTEEGH, M. *et al.* Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3-4, p. 343-354, 2011.

PALKOVÁ, Z. Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. **EMBO Reports**, v. 5, n. 5, p. 470-476, 2004.

PEREIRA, G. R. *et al.* *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in experimentally infected pregnant heifers. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3-4, p. 129-135, 2014.

REICHEL, M.P.; WAHL, L.C.; ELLIS, J.T. Research into *Neospora caninum*—what have we learnt in the last thirty years? **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 505, 2020.

SCHNEEBERGER, C. *et al.* Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. **Genome Research**, v. 4, n. 4, p. 234-238, 1995.

SLAPETA J.R. *et al.* Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v.109 n.3-4, p. 157-167, 2002.

WIGINGTON, C.P. *et al.* The polyadenosine RNA-binding protein, zinc finger Cys3His protein 14 (ZC3H14), regulates the pre-mRNA processing of a key ATP synthase subunit mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 43, p. 22442-22459, 2016.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O. GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain" cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 272-279, 1996.

6. CAPÍTULO IV. MONITORAMENTO DA CINÉTICA DE ANTICORPOS ANTI-NEOSPORA CANINUM NO SORO E DETECÇÃO MOLECULAR DO PROTOZOÁRIO NO LEITE DE VACAS NATURALMENTE INFECTADAS

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário Apicomplexa que causa desordens reprodutivas e impactos econômicos em rebanhos leiteiros. Informações a respeito da ocorrência do *N. caninum* e a dinâmica da eliminação do protozoário no leite ainda são limitadas. Os objetivos deste estudo foram detectar o DNA do *N. caninum* em amostras de leite cru, monitorar a cinética de anticorpos séricos e a excreção do protozoário no leite de vacas naturalmente infectadas. Amostras pareadas de sangue e leite de 12 vacas em lactação foram coletadas quinzenalmente por três meses, totalizando seis coletas (período de 0-75 dias) e 72 amostras. Anticorpos IgG foram detectados pela reação da imunofluorescência indireta (RIFI) e pelo ensaio de imunoabsorção enzimática Indireto (ELISA) com pontos de corte de 1:100 e (razão entre absorbância das amostras/controlado positivo) $SP > 0,5$, respectivamente. A PCR em tempo-real e a PCR convencional foram realizadas nas amostras de leite para a detecção de *N. caninum* com a amplificação de segmentos da região Nc5. *Neospora caninum* foi detectado pela PCR em tempo-real em 31,9% (23/72) das amostras de leite testadas. Nenhuma amostra de leite foi positiva na PCR convencional. Todas as vacas positivas na PCR eliminaram o protozoário no leite pelo menos uma vez durante as seis coletas, a exceção foram dois animais que foram negativos no leite em todas as amostragens. Foi observada uma flutuação dos níveis de anticorpos entre as coletas e em algumas amostragens as vacas foram soronegativas. Foi verificada associação entre a soropositividade na RIFI e a detecção do *N. caninum* no leite ($P < 0,05$), mas não entre a sorologia positiva no ELISA e a eliminação do protozoário no leite ($P > 0,05$). Os títulos de anticorpos e o valor de S/P nas amostras positivas no soro variaram entre 100 a 400 e 0,540 a 3,542, respectivamente. Os níveis de anticorpos IgG no soro flutuaram ao longo do tempo, mas não estão necessariamente relacionados a eliminação do protozoário no leite. O DNA do *N. caninum* pode ser detectado no leite de vaca cru e a eliminação do protozoário no leite ocorre de forma intermitente.

Palavras-chave: excreção no leite; rebanhos leiteiros; PCR em tempo real; cinética de anticorpos

ABSTRACT

Neospora caninum is an Apicomplexa protozoan parasite that causes reproductive disorders and economic impacts in dairy herds. Information regarding the occurrence of *N. caninum* and the dynamics of the excretion of the protozoan parasite in milk is still limited. The objectives of this study were to detect *N. caninum* DNA in raw milk samples, monitor serum antibody kinetics, and protozoan excretion in milk from naturally infected cows. Paired blood and milk samples from 12 lactating cows were collected every other week for three months, totaling six collections (0-75 days period) and 72 samples. IgG antibodies were detected by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with cutoff points of 1:100 and (absorbance ratio of samples/positive control) SP > 0.5, respectively. Real-time PCR and conventional PCR were performed on the milk samples for the detection of *N. caninum* with the amplification of segments of the Nc5 region. *Neospora caninum* was detected by real-time PCR in 31.9% (23/72) of the milk samples tested. No milk samples were positive by conventional PCR. All PCR positive cows shed protozoa in milk at least once during the six samplings, with the exception of two animals that were negative in milk in all samplings. Fluctuation in antibody levels was observed between samplings, and in some samples cows were seronegative. There was an association between seropositivity on IFAT and detection of *N. caninum* in milk ($P < 0.05$), but not between positive serology on ELISA and excretion of the protozoan in milk ($P > 0.05$). The antibody titers and S/P value in the positive serum samples ranged from 100 to 400 and 0.540 to 3.542, respectively. Serum IgG antibody levels fluctuated over time, but are not necessarily related to clearance of the protozoan in milk. *N. caninum* DNA can be detected in raw cow's milk and elimination of the protozoan in milk occurs intermittently.

6.1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário de distribuição mundial e de alta prevalência nos rebanhos leiteiros (LINDSAY; DUBEY, 2020), sendo reportado nessa espécie em vários estados do Brasil (CERQUEIRA-CEZAR *et al.*, 2017) e em todas as mesorregiões do Paraná, com soroprevalências que variam de 15,4 até 33,0% (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008, SNACK *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020). A nesporose é uma causa importante de abortamento em bovinos e está relacionada a perdas globais de mais de um bilhão de dólares por ano nos rebanhos (REICHEL *et al.*, 2013; LINDSAY; DUBEY, 2020).

A principal via de infecção em bovinos é a transplacentária que ocorre pela transmissão de taquizoítos da mãe para o feto (DAVISON *et al.*, 1999; MORÉ *et al.*, 2009). Neste tipo de transmissão, 80-90% dos bezerros de matrizes soropositivas nascem infectados e a infecção pode persistir no rebanho por muitas gerações (DUBEY, 2003; GOODSWEN *et al.*, 2013). Mas, a transmissão horizontal também pode ocorrer em bovinos por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos eliminados pelos hospedeiros definitivos (DUBEY *et al.*, 2007), os cães e alguns canídeos selvagens (DUBEY; SCHARES, 2011).

O papel da transmissão lactogênica de *N. caninum* ainda é incerto (MOSKWA; CABAJ, 2007). Existe a hipótese de que o período do parto pode levar a reativação de bradizoítos em taquizoítos circulantes que podem ser eliminados no leite (CAMOSSO *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2015). Embora não existam relatos de infecção natural, estudos experimentais demonstraram que bezerros foram infectados com leite e colostro inoculados com taquizoítos de *N. caninum* (UGGLA *et al.*, 1998; DAVISON *et al.*, 2001).

Estudos indicam que os taquizoítos são sensíveis ao pH gástrico, não resistindo a passagem pelo estômago (MOSKWA; CABAJ, 2007). No entanto, uma investigação experimental com *Toxoplasma gondii* verificou que o leite pode ser um meio com pH favorável para prolongar a sobrevivência do protozoário (KOETHE *et al.*, 2017), sugerindo a possibilidade da via de transmissão lactogênica.

O consumo de leite cru é considerado um fator de risco para infecção por toxoplasmose em humanos (BOUGHATTAS, 2017). Até o momento, não há evidências do potencial zoonótico de *N. caninum* como causa de infecção em

humanos (DUARTE et al., 2020). Entretanto, a transmissão lactogênica em bezerros alimentados com colostro ou “pool” de leite combinados de várias vacas deve ser considerada uma possibilidade, visto que essa é uma prática comum em fazendas leiteiras (MOSKWA; CABAJ, 2007).

Existem poucos relatos da ocorrência de DNA de *N. caninum* no leite. Moskwa et al. (2003) e Moskwa et al. (2007) detectaram o DNA do protozoário no leite de vaca e no colostro, respectivamente. O DNA do protozoário foi detectado no leite de algumas espécies de ungulados domésticos (ALIPOUR; RAHIMI; SHAKERIAN, 2019). Em estudos mais recentes foi identificado em amostras de leite de jumentas (PERRUCCI et al., 2021) e nos tanques a granel de rebanhos de vacas leiteiras (GHAREKHANI et al, 2021; FERREIG et al., 2022).

Informações a respeito da eliminação de *N. caninum* no leite ainda são limitadas e nos estudos existentes foram realizadas apenas coletas pontuais. Estudos de monitoramento em cabras (GAZZONIS et al., 2019) e ovelhas (CAMOSSO et al., 2019) naturalmente infectadas indicam que o *T. gondii* é excretado de forma intermitente no leite, mas nenhum estudo até o presente momento investigou a dinâmica da excreção do *N. caninum* no leite de vaca.

Em relação a cinética de anticorpos em vacas em lactação poucos estudos estão disponíveis (NOGAREDA et al., 2007; CARDOSO et al., 2009; ŠPILOVSKÁ, MOSKWA; REITEROVÁ, 2013) e não se tem conhecimento se essa dinâmica pode influenciar a eliminação do protozoário no leite.

Considerando o impacto que a neosporose tem nos rebanhos leiteiros (REICHEL et al., 2013; LIU et al., 2020), bem como os poucos estudos sobre a ocorrência do *N. caninum* no leite. Os objetivos do presente foram detectar o DNA do *N. caninum* em amostras de leite cru e monitorar a cinética de anticorpos séricos e a eliminação do protozoário no leite de vacas naturalmente infectadas.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o número de protocolo 011/19.

6.2.1 Seleção dos animais e desenho do estudo

Um rebanho de uma pequena propriedade familiar do município de Piraquara (Região Sudeste do Paraná, Sul do Brasil, 25° 26' 30" S e 49° 03' 48" O) com 36 vacas leiteiras e uma soroprevalência de *Neospora caninum* de 21,4% foi selecionado para o estudo. As 12 vacas em lactação do rebanho foram incluídas no estudo. Os animais tinham entre três e dez anos de idade (média de 6,7 anos) e com exceção de duas vacas (uma Pardo Suíça e outra Gersolanda) eram da raça Holandesa. Apenas uma das vacas tinha histórico de aborto. Cães domiciliados e errantes estavam presentes na propriedade e circulavam livremente no rebanho.

No período de maio a julho de 2021, amostras de sangue e leite pareadas de 12 vacas em lactação foram coletadas quinzenalmente por três meses, totalizando seis coletas (C1-C6) e 72 amostras. Idade, número de partos, status reprodutivo, último parto foram informados pelo proprietário. Os dias de lactação foram calculados considerando a data do último parto. As vacas apresentavam períodos de lactação distintos. Oito vacas estavam prenhas e quatro estavam vazias. O rebanho não apresentava cio sincronizado e as vacas foram inseminadas em datas distintas, antes e algumas durante o período de monitoramento.

6.2.2 Coleta e processamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas por punção do vaso coccígeo e acondicionadas em tubos sem anticoagulante, devidamente identificados e mantidos sob refrigeração e foram processadas em até 24h. As amostras foram centrifugadas

a 2.295 g, durante cinco minutos, para a obtenção do soro, os quais foram armazenados a -20°C para a realização do exame sorológico.

Amostras de 50 mL de leite foram coletadas manualmente durante a primeira ordenha do dia. A coleta foi realizada dos quatro tetos, após desinfecção prévia com álcool 70% das tetas e o descarte dos três primeiros jatos de leite, obtendo-se um pool de leite. As amostras de leite foram armazenadas em tubos tipo falcon esterilizados, mantidos sob refrigeração e processados em 48 horas.

6.2.3 Sorologia

A imunofluorescência indireta foi realizada utilizando o kit comercial de imunodiagnóstico Imunoteste® RIFI *Neospora caninum* (Imunodot diagnósticos, Brasil) seguindo a metodologia previamente descrita pelo fabricante, com algumas modificações (ALVAREZ-GARCÍA *et al.*, 2003). Foram utilizadas lâminas fixadas com taquizoítas de *N. caninum* (cepa NC-1) em formol 2%. As amostras de soros foram diluídas inicialmente a 1:100 em solução salina tamponada com fosfato (PBS – 0,1 M de fosfato, 0,33 M de NaCl, pH 7,2). O conjugado anti-IgG bovina marcado com isotiocianato de fluoresceína incluído no kit imunodiagnóstico foi utilizado como anticorpo secundário. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato e lamínulas 24x60mm e foram lidas em um microscópio de epifluorescência (Olympus BX41, Tóquio, JP). Amostras de soro de vacas soropositivas e soronegativas para *N. caninum* foram incluídas como controles. A presença de fluorescência em toda a extensão da superfície dos taquizoítos foi considerada como resultado positivo. Amostras positivas no ponto de corte 1:100 foram tituladas até a determinação do título máximo da reação.

O ensaio de imunoabsorção enzimática Indireto (ELISA) foi realizado com o kit de teste IDEXX NEOSPORA X2 Ab (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram diluídas em 1:100. O valor de corte $\geq 0,50$ para absorbância (S/P) foi considerado para amostras positivas. Esse ensaio já foi previamente validado para diagnóstico de neosporose em bovinos com valores de sensibilidade e especificidade relativa $> 95\%$ (ALVAREZ-GARCÍA *et al.*, 2013).

6.2.4 Pré-tratamento das amostras de leite e extração do DNA

As amostras de leite foram centrifugadas a 2.400 g por 10 minutos a 4 °C para remover a camada de gordura e o sobrenadante foi descartado. Foi realizado um pré-tratamento nas amostras para eliminar inibidores do PCR conforme descrito por Vismarra *et al.* (2017). Para dissolver a caseína, o *pellet* no fundo do tubo foi tratado com 200 µL de TE (1mM EDTA, 10mM Tris HCL - pH 7,6) e 300 µL 0,5 M EDTA (pH 8) (MURPHY *et al.*, 2002). A solução foi ressuspensa e centrifugada a 4500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuspensado em 200 µL de PBS (pH 7,2) (MANCIANTI *et al.*, 2013).

A extração do DNA do leite foi realizada com um kit comercial (5X MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit, Applied Biosystems™, Vilnius, Lituânia), seguindo as instruções do fabricante. Foram incluídos controles bloqueados (água destilada sem DNase-RNase ultrapura) a cada 12 amostras extraídas para garantir que não houve nenhuma contaminação nessa etapa. O DNA foi ressuspensado em 100 µl da solução de eluição e armazenado a -20 °C antes da PCR.

6.2.5 PCR convencional

A PCR convencional para a região Nc5 de *N. caninum* foi realizada com os primers NP6 Plus e NP21 Plus que amplificam um fragmento de 444bp (LIDDEL; JENKINS; DUBEY, 1999; HUGHES *et al.*, 2005). Cada reação de amplificação com volume de 25µL foi realizada contendo 1x buffer de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,02 mM de DNTP, 1U/µL de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®, Waltham, MA, EUA), 0,2µM de cada primer e 2,0 µL de template de DNA. As amplificações foram realizadas no termociclador Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler (Foster City, USA) com uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, de anelamento a 63°C por 1 minuto, de extensão a 72° C por 1 minuto e 10 segundos e finalmente 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Controles negativos (água destilada sem DNase-RNase ultrapura) e positivos (DNA do isolado Nc-1) foram incluídos em todas as reações.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese a uma voltagem constante de 95V durante 1 hora através de um gel de agarose 1,5% preparado em tampão TAE 1X. Os amplicons foram visualizados com luz ultravioleta após coloração com SYBR® Safe DNA gel stain. O tamanho do fragmento de DNA foi comparado com um marcador de massa molecular padrão, 100pb DNA Ladder - Ludwig Biotec® (Ludwig Biotechnology, Porto Alegre, RS, BR).

Amostras diluída em série dez vezes de 1 a 1×10^{-7} (4.562,5 a 0,000456 taquizoítos/reação) de uma amostra de referência foram testadas em triplicatas e foi verificado um limite de detecção de 4,56 taquizoítos por reação.

6.2.6 PCR em tempo real

Foi utilizado o protocolo de PCR em tempo-real baseado em SYBR green padronizado e validado no capítulo III da tese com limite de detecção de 0,456 taquizoítos por reação. A PCR em tempo-real utilizou os primers NP7 e NP10 que amplificam um segmento de 198bp da região Nc5 de *N.caninum*. Cada reação de amplificação com um volume de 10 µl foi realizada com 2,2 µl de água destilada sem DNase-RNase ultrapura, 5 µL PowerTrack Fast SYBR® Green Master Mix 2x kit (Applied Biosystems™, San Diego, CA, EUA) e ROX adicionado como corante de referência passivo, 0,4 µM do Primer Forward NP10, 0,4 µM primer reverso NP7 e 2 µl do template de DNA. A amplificação foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, com 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e hibridização a 64 °C por 30 segundos. Além disso, a curva de dissociação e as análises de pico foram realizadas imediatamente a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e a coleta de fluorescência a 95°C por 15 segundos.

O conjunto de primers para o gene de controle interno (IC) (18S) que amplifica um fragmento de 128 pb foi usado para validar a extração de amostras negativas (WIGINGTON *et al.*, 2016; MORRIS; KHAN; PICHICHERO *et al.*, 2017). A reação de PCR em tempo real preparada com o Kit PowerTrack Fast SYBR® Green Master Mix 2x (Applied Biosystems™, San Diego, CA, EUA) e ROX adicionado como corante de referência passivo, em um volume de reação de 10 µL para cada amostra continha 0,5 µL de DNA extraído, 5 µL de Kit PowerTrack Fast SYBR® Green Master Mix 2X, 0,4 µM de primers upstream e downstream (5'GAG ACT CTG GCA TGC TAA CTA.G3'

e 5'GGA CAT CTA AGG GCA TCA CAG3') e 4.1 µL de água destilada sem DNase–RNase ultrapura. A amplificação foi realizada por 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos incluindo desnaturação a 95°C por 15 segundos e hibridização por 30 segundos a 60°C. A curva de dissociação foi de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos, a fluorescência foi coletada na segunda incubação de 95°C por 15 segundos.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um sistema 7500Fast Real-time PCR (Applied Biosystem, Waltham, MA, EUA) em tiras de parede fina de 0,2 mL ou placas de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

6.2.7 Análise estatística

Para avaliar a associação entre a detecção do *N. caninum* no leite a soropositividade na RIFI e no ELISA e entre os títulos de anticorpos ($\geq 1:400$ e $< 1:400$) e os valores de S/P% (abaixo e acima da média, $< 1,5$ e $> 1,5$, respectivamente) e a positividade na qPCR foi realizado o teste de McNemar. Para verificar a variação dos títulos da RIFI e do valor S/P% entre as coletas foi utilizado o teste de Friedman para amostras pareadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software MedCalc versão 20.1.4.

6.3 RESULTADOS

O DNA de *N. caninum* foi detectado em 31,9% (23/72) amostras de leite analisadas durante o período de monitoramento pela PCR em tempo real (qPCR), porém nenhuma amostra de leite foi positiva na PCR convencional. Do total de 12 vacas, dez eliminaram o protozoário no leite pelo menos uma vez durante as seis coletas e dois animais foram negativos em todas as coletas. Três vacas eliminaram o *N. caninum* no leite apenas uma vez e em sete vacas o DNA do protozoário foi detectado no leite em duas ou mais coletas.

Os níveis de anticorpos variaram amplamente entre as coletas. Em algumas coletas as vacas foram soronegativas. Todas as 12 vacas foram soropositivas na RIFI em pelo menos uma das coletas. Apenas uma vaca soropositiva para RIFI, também

soropositiva no ELISA, permaneceu positiva em todas as coletas. No ELISA oito vacas foram soropositivas pelo menos uma vez, duas foram positivas em todas as coletas e quatro permaneceram soronegativas em todo o período de monitoramento.

Os resultados do monitoramento da detecção do *N. caninum* no leite e da cinética de anticorpos pela RIFI em cada coleta estão descritos na tabela 10.

Tabela 10. Detecção de anticorpos séricos de anti-*Neospora caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) no soro e do DNA de *Neospora caninum* nas amostras de leite pela PCR em tempo real (qPCR) em cada uma das seis coletas de monitoramento (C1-C6).

Dias	C1-0		C2-15		C3-30		C4-45		C5-60		C6-75	
	RIFI	qPCR	RIFI	qPCR	RIFI	qPCR	RIFI	qPCR	RIFI	qPCR	RIFI	qPCR
Vacas												
V1*	100	-	N	+	400	-	200	+	100	-	N	-
V2	N	-	N	+	200	+	200	-	800	-	N	-
V3	100	+	N	-	200	-	200	-	N	+	N	-
V4	N	-	200	-	400	-	200	-	N	-	N	+
V5	200	+	N	+	200	+	N	-	N	-	N	+
V6	N	-	N	-	200	-	100	-	N	-	N	-
V7	100	-	200	-	400	-	N	-	100	-	N	-
V8	400	+	400	-	200	-	200	+	100	-	200	+
V9	100	+	N	+	N	-	-	-	-	-	N	+
V10	100	+	200	-	400	+	400	-	-	-	100	+
V11	100	-	200	-	N	-	200	+	400	-	N	-
V12	100	+	400	+	N	-	N	-	100	-	N	-

N: soronegativo, - : Negativo. +: Positivo. C1: coleta 1, C2: coleta 2, C3: coleta 3, C4: coleta 4, C5: coleta 5, C6: coleta 6. V1, V2, V4 e V6 eram vacas vazias. *V1= vaca com histórico de aborto. RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta. qPCR: PCR em tempo real

Foi observada associação entre a soropositividade na RIFI e a detecção do *N. caninum* no leite ($P=0,0046$), mas não entre a sorologia positiva no ELISA e a eliminação do protozoário no leite ($P=0,42$). A maioria das amostras de leite positivas na PCR em tempo-real eram de vacas com sorologia positiva na RIFI (15/23), mas oito amostras eram de vacas que eliminaram o protozoário no leite mesmo com amostras negativas na sorologia em determinado momento das coletas.

Tabela 11. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* pelo ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA) no soro e do DNA de *Neospora caninum* nas amostras de leite pela PCR em tempo real (qPCR) em cada uma das seis coletas de monitoramento (C1-C6).

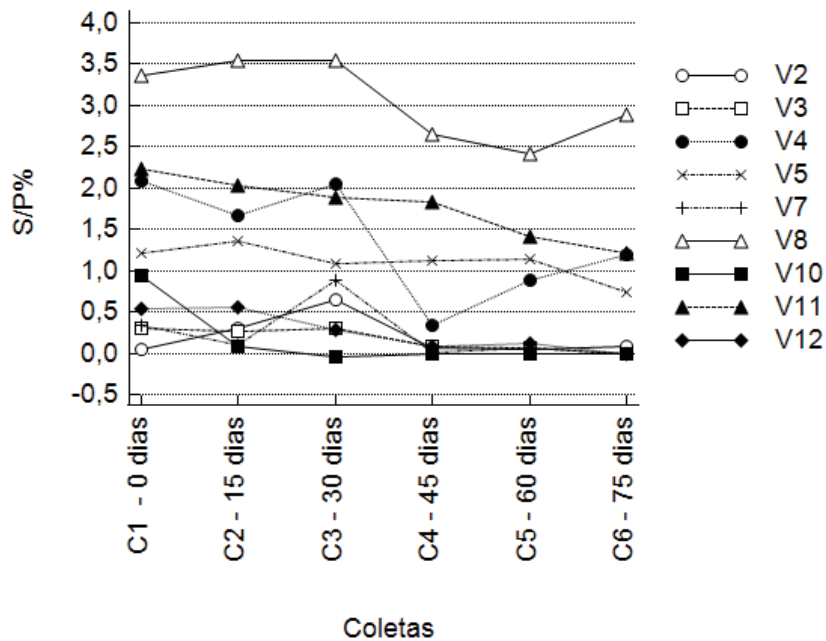
Dias	0-C1		15-C2		30-C3		45-C4		60-C5		75-C6	
Vacas	ELISA	qPCR	ELISA	qPCR	ELISA	qPCR	ELISA	qPCR	ELISA	qPCR	ELISA	qPCR
V1	N	-	N	+	N	-	N	+	N	-	N	-
V2	N	-	N	+	P	+	N	-	N	-	N	-
V3	N	+	N	-	N	-	N	-	N	+	N	-
V4	P	-	P	-	P	-	N	-	P	-	P	+
V5	P	+	P	+	P	+	P	-	P	-	P	+
V6	N	-	N	-	N	-	N	-	N	-	N	-
V7	N	-	N	-	P	-	N	-	N	-	N	-
V8	P	+	P	-	P	-	P	+	P	-	P	+
V9	N	+	N	+	N	-	N	-	N	-	N	+
V10	P	+	N	-	N	+	N	-	N	-	N	+
V11	P	-	P	-	P	-	P	+	P	-	P	-
V12	P	+	P	+	N	-	N	-	N	-	N	-

N: soronegativo, P: soropositivo - : Negativo. +: Positivo . C1: coleta 1, C2: coleta 2, C3: coleta 3, C4: coleta 4, C5: coleta 5, C6: coleta 6. V1, V2, V4 e V6 eram vacas vazias. "V1= vaca com histórico de aborto. ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática Indireto, qPCR: PCR em tempo real.

Enquanto no ELISA, 13 amostras de leite positivas na qPCR eram de vacas soropositivas (13/23) e 10 amostras eram de vacas com sorologia negativa no momento das coletas (Tabela 11).

Os títulos de anticorpos e o valor de S/P nas amostras positivas no soro variaram entre 100 a 400 e 0,540 a 3,542, respectivamente, durante o período de observação. A variação nos títulos de anticorpos na RIFI não foi significativa durante o monitoramento ($P=0,058$), mas os valores de S/P no ELISA variaram significativamente entre as coletas ($P < 0,00001$). A variação nos S/P% no ELISA está evidenciada na figura 8.

Figura 8. Cinética de anticorpos no ELISA (S/P%) nas vacas soropositivas durante o período de monitoração (0-75 dias).



Fonte: O autor, 2022

Das 23 amostras positivas para qPCR no leite, três eram de vacas com títulos 1:400 no soro, 12 eram de vacas com títulos <400 e oito eram soronegativas (ou com títulos inferiores ao ponto de corte) no momento da coleta, mas não foi observada uma associação significativa entre os títulos de anticorpos nas amostras de soro positivas e a detecção do *N. caninum* no leite ($P=1,000$). A vaca que alcançou título de anticorpos séricos de 800 em uma das coletas no soro não eliminou o protozoário no leite nessa coleta.

As vacas do rebanho que eliminaram o protozoário no leite estavam em status reprodutivos distintos. Sete estavam prenhas ou tiveram a gestação confirmada no período do monitoramento e três estavam vazias. A vaca (V1) era a única com histórico de aborto no rebanho, estava vazia, e eliminou o *N. caninum* em duas coletas (C2 e C4) em que foi soronegativa e com título de anticorpos 1:200, respectivamente, mas foi soronegativa para o ELISA em todas as coletas. A vaca V4 estava vazia, pois apresentou repetição do cio, excretou o parasito no leite apenas na coleta C6, soroconverteu na RIFI a partir da segunda coleta (C2), mas foi soronegativa na C5 e C6; e no ELISA foi positiva em todas as coletas, com exceção da C4.

6.4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que *Neospora caninum* pode ser detectado no leite de vacas naturalmente infectadas. Uma elevada ocorrência de *N. caninum* foi encontrada no total de amostras de leite avaliadas nesse estudo (31,9%) e foi possível detectar amostras positivas em todas as coletas (C1-C6). O alvo para a amplificação a região Nc5, altamente específica para *N. caninum* (CORREA-CASTRO *et al.*; 2021) e o PCR em tempo real foi empregado por que é uma técnica altamente sensível para a detecção de pequenas quantidades de DNA (BARRY *et al.*, 2019).

Na PCR convencional não foi possível detectar nenhuma amostra positiva no leite e isso se justifica pela menor sensibilidade da técnica. Em testes prévios o PCR em tempo real utilizado nesse estudo, padronizado e validado em um trabalho anterior (Capítulo III), demonstrou ser 10 vezes mais sensível na detecção do DNA do protozoário em comparação ao PCR convencional, sendo capaz de detectar até 0,456 taquizoítos por reação. Esse resultado sugere que as amostras de leite positivas possuem pequenas quantidades do protozoário e pode ser necessário técnicas moleculares mais sensíveis para a sua detecção.

Moska *et al.* (2003) relataram pela primeira vez a detecção do protozoário no leite de uma vaca e no colostro de oito vacas (MOSKA *et al.*, 2007). Embora estudos sobre a ocorrência do *N. caninum* no leite sejam limitados, Alipour; Shakerian; Rahmi (2018) em um estudo no Irã observaram em uma coleta pontual maior prevalência de *N. caninum* (24%) do que de *Toxoplasma gondii* (5%) em amostras de leite cru de vaca, demonstrando uma prevalência significativa desse protozoário no leite, o que é reforçado pelos resultados do presente estudo.

De acordo com os resultados do monitoramento quinzenal, foi possível observar que a excreção do *N. caninum* ocorre de forma intermitente no leite. A maioria das vacas eliminaram o protozoário no leite pelo menos uma vez durante as seis coletas (0-75 dias), com exceção de dois animais que foram negativos no leite em todas as amostragens. Mas nenhuma vaca eliminou o protozoário no leite de forma constante em todas as coletas. Dubey *et al.* (2014) e Gazzonis *et al.* (2019) verificaram que o *T. gondii* é eliminado no leite de cabras de forma descontínua, e o *N. caninum*

parece se comportar de forma semelhante no leite de vaca. Esse é o primeiro estudo que monitora a eliminação do *N. caninum* no leite.

A maioria das amostras positivas no leite estavam relacionadas a vacas com sorologia positiva na RIFI (15/23) e no ELISA (13/23) no momento das coletas, mas apenas na RIFI foi verificada associação entre a soropositividade e a detecção do *N. caninum* no leite ($P > 0,05$). Ainda assim algumas vacas eliminaram o protozoário no leite mesmo em coletas que apresentaram sorologia negativa. Os testes sorológicos utilizados no presente estudo não detectam IgM, anticorpos presentes na fase aguda da doença (LUPTAKOVA *et al.*, 2014), mas apenas IgG, anticorpos produzidos na fase mais tardia da doença (SAAD *et al.*, 2018). As vacas com status negativo na sorologia com amostras de leite positivas na PCR nesse estudo podem estar na fase inicial da doença ou com níveis de IgG insuficientes para serem identificados na sorologia (SANTANA ROCHA *et al.*, 2015). Resultado semelhante foi observado em outros estudos com coletas pontuais que identificaram DNA de *T. gondii* no leite de cabras e ovelhas soronegativas (SILVA *et al.*, 2015; BEZERRA *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2015; SROKA *et al.*, 2017).

Durante a monitoração foi observada flutuação dos anticorpos na sorologia, essa variação não foi significativa na RIFI, mas apareceu de forma mais evidente em algumas vacas na sorologia por ELISA (Figura 8). Estudos que avaliam a dinâmica de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas indicam que os níveis de anticorpos podem variar ao longo do tempo (NOGAREDA *et al.*, 2007) e descrevem diferentes padrões de flutuação de anticorpos ao longo da vida de um animal, inclusive vacas que alternam entre resultados de sorologia positivos e negativos (WESTON; WILLIAMSON; POMROY, 2005; KYAN *et al.*, 2005).

Os títulos de anticorpos e o valor de S/P nas amostras de soro positivas para *N. caninum* variaram entre 100 a 400 e 0,540 a 3,542, respectivamente, durante o período de estudo. A variação da titulação de anticorpos entre as coletas foi discreta na RIFI e mais evidente nos valores de S/P no ELISA (Figura 8), mas não foi relacionada com a eliminação do protozoário no leite. Gazzonis *et al.* (2019) em um estudo de monitoramento de *T. gondii* no leite também verificaram ampla variação do valor de S/P% no soro e não observaram influência dos níveis de anticorpos na excreção do protozoário no leite.

Os fatores que podem influenciar a eliminação do *N. caninum* no leite ainda não foram bem elucidados. Estudos do *T. gondii* no leite citam a fase de lactação, o

estado imunológico e fase da infecção como possíveis fatores que podem afetar a eliminação dos taquizoítos no leite (LUPTAKOVA *et al.*, 2014). Não foi possível avaliar se a fase de lactação e de gestação das vacas podem estar relacionadas a detecção do protozoário no leite, já que as vacas se encontravam em períodos de lactação e fases de gestação distintas, o que foi uma limitação no presente estudo.

As amostras positivas para o *N. caninum* no leite eram na maioria de vacas com títulos de anticorpos mais baixos no soro no momento da coleta, 1:100 (5/23) e 1:200 (7/23), apenas três eram de vacas que apresentaram títulos de 1:400. A vaca com o título sérico de 1:800 em uma das coletas não foi positiva no leite. Moskwa *et al.* (2003) relataram a presença do DNA do protozoário em uma coleta pontual de amostras de leite de uma vaca com altos níveis de IgG, mas nenhuma investigação avaliou essa relação em um estudo de monitoramento do *N. caninum* com coletas periódicas de sangue e leite.

O aumento dos títulos dos anticorpos anti-*N. caninum* no soro em vacas prenhas com infecção crônica é relacionada a reativação dos bradizoítos em taquizoítos na circulação (CARDOSO *et al.* 2009), que podem ser eliminados no leite. No presente estudo as vacas estavam em status reprodutivos distintos, sete vacas prenhas e três vacas vazias eliminaram o protozoário no leite. O rebanho apresentava uma vaca vazia com histórico de aborto e outra vazia com repetição do cio, e em ambas foi possível detectar o protozoário no leite.

Apesar desses resultados, não é possível afirmar que o *N. caninum* seja o responsável pelos problemas reprodutivos nesse rebanho, mas é importante ressaltar que fatores de riscos estavam presentes na propriedade. Cães domiciliados e errantes circulavam livremente por toda a propriedade, nas baias e nos locais de armazenamento de alimento e água. Os cães inclusive recebiam o excedente de leite após a ordenha o que também pode representar um risco de infecção para esse hospedeiro.

Este estudo destaca a importância de se considerar o leite como fonte potencial de transmissão de *N. caninum*, mas a detecção do DNA do parasito não é suficiente para determinar se os taquizoítos estão viáveis e em quantidade suficiente para causar infecção pelo consumo de leite cru.

A detecção do DNA do *N. caninum* pela PCR no leite pode ser uma alternativa para o diagnóstico da neosporose em rebanhos leiteiros. No entanto, o padrão de eliminação intermitente do protozoário no leite indica que uma testagem única pode

não ser suficiente, sendo necessário adotar protocolos de amostragens repetidas para aumentar a precisão do diagnóstico.

6.5 CONCLUSÃO

O DNA de *N. caninum* pode ser detectado em amostras de leite cru e o protozoário é eliminado de forma intermitente no leite de vacas naturalmente infectadas. Os níveis de anticorpos IgG no soro flutuam ao longo do tempo e não estão relacionados a eliminação do protozoário no leite.

REFERÊNCIAS

- ALIPOUR, M.; RAHIMI, E.; SHAKERIAN, A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in different types of raw milk and traditional dairy product samples. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 6, e12575, 2018.
- ÁLVAREZ-GARCÍA, G. *et al.* Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 3, p. 341-352, 2003.
- ALVAREZ-GARCÍA, G. *et al.* Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 1-2, p. 85-95, 2013.
- BARRY, R. *et al.* A probe-based real-time PCR assay for the detection of *Neospora caninum* in clinical samples from cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 269, p. 2-6, 2019.
- 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, n. 4, p. 421-424, 2015.
- BOUGHATTAS, S. *Toxoplasma infection* and milk consumption: Meta-analysis of assumptions and evidences. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2924-2933, 2017.
- CAMOSSI, L. G. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3-4, p. 256-261, 2011.
- CARDOSO, J. M. S. *et al.* Antibody dynamics during gestation in cows naturally infected with *Neospora caninum* from four dairy herds in Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 46, n. 5, p. 395-399, 2009.

CERQUEIRA-CÉZAR, C. K. *et al.* All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n.3, p. 253-279, 2017.

CORREA-CASTRO, T.A.; GÓMEZ-PALACIO, A.M.; PULIDO-MEDELLÍN, M. O. Genetic Detection of *Neospora caninum* in the Blood of Dairy Cattle from Boyacá, Colombia. **Revista Científica**, n. 41, n. 2, p. 252, 2021.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, 1999.

DUARTE, P.O *et al.* Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

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.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J.P. *et al.* Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 10, p. 1747-1753, 2014.

FEREIG, R.M. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies and DNA in raw milk of various ruminants in Egypt. **Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1305, 2022.

GAZZONIS, A. L. *et al.* *Toxoplasma gondii* antibodies in bulk tank milk samples of caprine dairy herds. **Journal of Parasitology**, v. 104, n. 5, p. 560-565, 2018.

GHAREKHANI, J. *et al.* Herd-level contamination of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* in milk of Iranian dairy farms. **Food Microbiology**, v. 100, 103873, 2021.

GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, P.J.; ELLIS, J.T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133-150, 2013.

HUGHES, J. M. *et al.* The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 29-36, 2006.

KYAW, T *et al.* Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows, with a low rate of transplacental transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 145-150, 2005.

KOETHE, M. *et al.* Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simulated gastric fluid and cow's milk. **Veterinary Parasitology**, v. 233, p. 111-114, 2017.

LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1583-1587, 1999.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, JP Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 205-222, 2020.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 191-195, 2008.

LIU, Y.; R., M.P.; LO, W.C. Combined control evaluation for *Neospora caninum* infection in dairy: Economic point of view coupled with population dynamics. **Veterinary Parasitology**, v. 277, 108967, 2020.

LUPTAKOVA, L. *et al.* DNA detection of *Toxoplasma gondii* in sheep milk and blood samples in relation to phase of infection. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 3-4, p. 250-253, 2015.

MANCIANTI, F. *et al.* Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. **BioMed Research International**, v. 2013, 905326, 2013.

MORÉ, G. *et al.* Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 51-54, 2009.

MORRIS, M.C.; KHAN, M.N.; PICHICHERO, M.E. A PCR-based method for quantifying neutrophils in human nasal secretions. **Journal of Immunological Methods**, v. 447, p. 65-70, 2017.

MOSKWA, B. *et al.* The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. **Acta Parasitologica**, v. 48, n. 2, p.138-141, 2003.

MOSKWA, B. *et al.* The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v. 100, n. 3, p. 633-636, 2007.

MOSKWA, B.; CABAJ, W. The role of the colostrum and milk in *Neospora caninum* transmission. **Helminthologia**, v. 44, n. 3, p. 126-129, 2007.

MURPHY, M.A.; SHARIFLOU, M.R.; MORAN, C. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. **The Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 4, p. 645-649, 2002.

NOGAREDA, C. *et al.* Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 193-199, 2007.

NOLAN, *et al.* **Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR) First Edition**. National Measurement System, Middlesex, UK: LGC, 99p, 2013.

PERRUCCI, S. *et al.* Apicomplexan Protozoa Responsible for Reproductive Disorders: Occurrence of DNA in Blood and Milk of Donkeys (*Equus asinus*) and Minireview of the Related Literature. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 111, 2021.

REICHEL, M.P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

SAAD, N. M.; HUSSEIN, A.A.A; EWIDA, R.M. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in raw goat, sheep, and camel milk in Upper Egypt. **Veterinary World**, v. 11, n. 9, p. 1262, 2018.

SANTANA ROCHA, de D. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected sheep's milk. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8658-8662, 2015.

SANTOS, dos J.R. *et al.* *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: seroprevalence and associated factors in cows from milk farms of Toledo, Parana, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5, p. 1581-1590, 2020.

SILVA, da J. G. *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.

SNAK, A. *et al.* *Neospora caninum* in properties in the west region of Paraná, Brazil: prevalence and risk factors. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 1, p. 52-60, 2018

ŠPILOVSKÁ, S.; MOSKWA, B.; REITEROVÁ, K. Kinetics of anti-*Neospora* antibodies during the period of two consecutive pregnancies in chronically infected dairy cows. **Acta Parasitologica**, v. 58, n. 4, p. 463-467, 2013.

SROKA, J. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. **Folia Parasitologica**, v. 64, 2017.023, 2017.

WESTON, J. F.; WILLIAMSON, N. B.; POMROY, W. E. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, n. 2, p. 142-148, 2005.

WIGINGTON, C.P. *et al.* The polyadenosine RNA-binding protein, zinc finger Cys3His protein 14 (ZC3H14), regulates the pre-mRNA processing of a key ATP synthase subunit mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 43, p. 22442-22459, 2016.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.

O presente estudo indicou que as técnicas da PCR convencional e PCR em tempo-real realizadas em amostras de leite são úteis para o diagnóstico de *T. gondii* e de *N. caninum* e para melhor compreensão sobre a eliminação dos protozoários no leite de vaca. Até o presente, esse é o primeiro estudo que realiza o monitoramento da eliminação de *N. caninum* no leite e avalia uma possível influência da cinética de anticorpos em amostragens repetidas. Assim como relata pela primeira vez no Brasil a detecção de *T. gondii* no leite de vaca.

Neospora caninum circula na região sudeste do Paraná em sistemas de criação extensivos e semi-extensivos. No presente estudo verificou-se soroprevalência significativa mesmo em rebanhos leiteiros com baixas taxas de aborto. Nos testes sorológicos disponíveis como a RIFI e o ELISA, existem limitações e pode ser necessário associar outros métodos diagnósticos com maior acurácia.

O diagnóstico da neosporose é um desafio, a ausência de um método padrão ouro e as limitações dos testes sorológicos existentes denotam a necessidade de métodos mais precisos e confiáveis para a detecção de *N. caninum*. Nesse estudo foi apresentada como alternativa um ensaio de PCR em tempo real baseado em SYBR *green* com alta sensibilidade e especificidade, reprodutível e capaz de detectar o protozoário em diferentes tipos de amostras, incluindo o leite. Esse protocolo é mais sensível que a PCR convencional e permite um diagnóstico rápido, econômico e minimiza os riscos de contaminação.

Os resultados deste estudo sugerem que vacas naturalmente infectadas podem eliminar *T. gondii* no leite na fase aguda da infecção e destaca que não se deve negligenciar outras possíveis fontes de infecção como a via lactogênica. Isso ressalta a necessidade de maior conhecimento a respeito do papel do leite de vaca na epidemiologia da Toxoplasmose, considerando que o Brasil é o principal cenário dos surtos de Toxoplasmose relatados no mundo e que nas regiões rurais e no comércio informal o consumo de leite cru é uma realidade comum.

Os achados desse estudo podem abrir caminho para novas investigações sobre a transmissão lactogênica. A detecção do DNA dos protozoários no leite não é suficiente para indicar que os taquizoítos estão íntegros ou viáveis no leite, e nem estabelecer a sua capacidade de infecção. Para isso são necessários ensaios *in vitro* e *in vivo* para determinar a viabilidade e a infectividade de *T.gondii* e *N.caninum* no leite.

Os fatores que influenciam na eliminação dos protozoários no leite ainda não são bem conhecidos, mas existe a hipótese que fatores individuais como a fase da lactação, estado imunológico e estágio de infecção podem estar relacionados aos períodos de reativação dos bradizoítos em taquizoítos na circulação e eliminação no leite. Dessa forma, são necessários experimentos de monitoramento de vacas no mesmo período de lactação e vacas prenhas durante toda gestação que permitam esclarecer essa hipótese. Os níveis de anticorpos no soro flutuam ao longo do tempo, mas parecem não acompanhar necessariamente a eliminação de *N. caninum* no leite, e estudos com maior tempo de monitoramento podem elucidar essa questão.

Foi observado que a eliminação de *N. caninum* no leite ocorre de forma intermitente, esse padrão indica que uma coleta única pode não ser suficiente para o diagnóstico. Adotar um protocolo de amostragens repetidas de duas ou mais coletas quinzenais pode ser uma melhor estratégia para um diagnóstico mais preciso. Os testes em amostras de leite podem ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico de *N. caninum*, considerando que a coleta desse tipo de amostra é um método menos invasivo, mais prático, que permite redução de custos, não necessita de mão de obra especializada e pode ser facilmente incluída na rotina da ordenha.

O diagnóstico é um instrumento importante para as estratégias de controle e prevenção da neosporose nos rebanhos e os testes moleculares em amostras de leite podem futuramente ser implementados como uma alternativa para a detecção do *N.caninum*.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH *et al.* Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, and goats in Algeria: seroprevalence and risk factors. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 3, p. 63, 2019.
- ABDELBAKY, H.H. *et al.* Evaluation of *Neospora caninum* serodiagnostic antigens for bovine neosporosis. **Parasitology International**, v. 75, 102045, 2020.
- ALIPOUR, M.; RAHIMI, E.; SHAKERIAN, A. Retracted: Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in different types of raw milk and traditional dairy product samples. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 6, e12575, 2018.
- ALMERIA, S.; DUBEY, J. P. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 371-385, 2021.
- AL-QASSAB, S.E.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum*. **Diversity**, v. 2, n. 3, p. 411-438, 2010.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C. *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in patients with vision and hearing impairments, cancer, HIV, or undergoing hemodialysis in Durango, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 505-508, 2010.
- ÁLVAREZ-GARCÍA, G. *et al.* Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 3, p. 341-352, 2003.
- ALVAREZ-GARCÍA, G. *et al.* Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 1-2, p. 85-95, 2013.
- ANDREOTTI, R. *et al.* Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 19-22, 2009.
- ANTONY, A.; WILLIAMSON, N. B. Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, n. 2, p. 42-47, 2001.
- ARBABI, M. *et al.* Identification of latent neosporosis in sheep in Tehran, Iran by polymerase chain reaction using primers specific for the Nc-5 gene. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 83, n. 1, p. 1-7, 2016.
- BARRATT, J. *et al.* The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 4, p. 228-233, 2008.

BARRY, R. *et al.* A probe-based real-time PCR assay for the detection of *Neospora caninum* in clinical samples from cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 269, p. 2-6, 2019.

BARTLEY, P. M. *et al.* Inoculation of Balb/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 13-21, 2008.

BELL, A.S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.C. Real-time quantitative PCR in parasitology. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 338-342, 2002.

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, n. 4, p. 421-424, 2015.

BJERKÅS, I. *et al.* Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.

BLANCO, R.D. *et al.* Desenvolvimento e padronização do Dot-ELISA usando peptídeos recombinantes para o diagnóstico sorológico de *Neospora caninum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 723-727, 2014.

BÓRAWSKI, *et al.* Changes in the Milk Market in the United States on the Background of the European Union and the World. **Eur. Res. Stud. J**, n.1, v. 24, p. 1010-1033, 2021. Special Issue.

BOUGHATTAS, S. Toxoplasma infection and milk consumption: Meta-analysis of assumptions and evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2924-2933, 2017.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infeciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 57p, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. Banco de dados de surtos de DTHA 2000 a 2021. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 21 Out. 2022. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes>. Acesso em: 23 de mai. de 2022.

BROEDERS, S. *et al.* Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 115-126, 2014.

BROM, P. R. F. *et al.* Genetic characterization of *Neospora caninum* strains from clinical samples of zebuine fetuses obtained in abattoirs in Goiás, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 381-387, 2014.

BUSTIN, S.A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n.4, p. 611-622, 2009.

CABRAL, L.D.R. *et al.* Detection of *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* in amniotic fluid and placentas from mares. **Veterinary Parasitology**, v. 303, 109678, 2022.

CALARCO, L.; ELLIS, J. Species diversity and genome evolution of the pathogenic protozoan parasite, *Neospora caninum*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 84, 104444, 2020.

CAMILLO, G. *et al.* Antibodies to *Neospora caninum* in dairy cattle in Southwest of Paraná State. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1511-1513, 2010.

CAMILLO, G. *et al.* Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 482-486, 2011.

CAMOSSI, L. G. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3-4, p. 256-261, 2011.

CAO, Heping *et al.* Quantitative PCR for glucose transporter and tristetraproline family gene expression in cultured mouse adipocytes and macrophages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 49, n. 10, p. 759-770, 2013.

CARDOSO, J. M. S. *et al.* Antibody dynamics during gestation in cows naturally infected with *Neospora caninum* from four dairy herds in Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 46, n. 5, p. 395-399, 2009.

CERQUEIRA-CÉZAR, C. K. *et al.* All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 253-279, 2017.

CHANLUN, A. *et al.* Variations of *Neospora caninum* antibody levels in milk during lactation in dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 349-355, 2006.

CHATZIPRODROMIDOU, I. P.; APOSTOLOU, T. Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblot (IB) for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in milk from dairy cows. **Epidemiology & Infection**, v. 146, n. 5, p. 577-583, 2017.

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

CISAK, E. *et al.* Presence of pathogenic Rickettsiae and protozoan in samples of raw milk from cows, goats, and sheep. **Foodborne pathogens and disease**, v. 14, n. 4, p. 189-194, 2017.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. *et al.* Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, 2002.

CORREA-CASTRO, T.A; GÓMEZ-PALACIO, A.M.; PULIDO-MEDELLÍN, Martin-Orlando. Genetic Detection of *Neospora caninum* in the Blood of Dairy Cattle from Boyacá, Colombia. **Revista Científica**, v. 41, n. 2, p. 252, 2021.

COSTA, G.H.N *et al.* Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 57-62, 2001.

COSTA, G.H.N. *et al.* *Toxoplasma gondii*: Infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 277-281, 2011.

COSTA, da M.A. *et al.* Artisan fresh cheese from raw cow's milk as a possible route of transmission in a toxoplasmosis outbreak, in Brazil. **Zoonoses and public health**, v. 67, n. 2, p. 122-129, 2020.

DASH, P. K. *et al.* Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of YFV infection in *Aedes aegypti*. **Virology Journal**, v. 9, n. 27, 2012.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, 1999.

DAVISON, H.C. *et al.* Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p. 163-168, 2001.

DEHKORDI, F.S. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 120-125, 2013.

DEPREZ, R.H.L. *et al.* Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v. 307, n. 1, p. 63-69, 2002.

DIJKSTRA, T. *et al.* Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 747-752, 2001.

DONAHOE, S.L. *et al.* A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216-238, 2015.

DUARTE, P.O *et al.* Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

DUBEY, J.P. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P. *et al.* Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988.

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.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J.P. The History of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J.P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.

DUBEY, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877-882, 2009.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J.P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J.P. *et al.* Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 10, p. 1747-1753, 2014.

DUBEY, J.P. *et al.* Public Health Significance of *Toxoplasma gondii* Infections in Cattle: 2009–2020. **The Journal of Parasitology**, v. 106, n. 6, p. 772-788, 2020.

DUBEY, J.P. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2021.

DYER, R. M. *et al.* Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 171-181, 2000.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. **FAO STAT** - Livestock Primary. Roma, Italy, 2022. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 10 Jul. 2022.

FÁVERO, J.F. *et al.* Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 202-207, 2017.

FEREIG, Ragab M. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies and DNA in raw milk of various ruminants in Egypt. **Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1305, 2022.

FERRE, I. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1504-1518, 2005.

FRÖSSLING, J. *et al.* Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 3, p. 141-153, 2003.

GARCIA, J.L. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine, bovine, ovine and equine, and their correlation with human, felines and canines, from farms in North Region of Paraná State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 29, p. 91-97, 1999.

GAZZONIS, A. L. *et al.* *Toxoplasma gondii* antibodies in bulk tank milk samples of caprine dairy herds. **Journal of Parasitology**, v. 104, n. 5, p. 560-565, 2018.

GEORGIEVA, D. A.; PRELEZOV, P. N.; KOINARSKI, V. T. S. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. A review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-26, 2006.

GHALMI, F. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 161-167, 2008.

GHAREKHANI, J. *et al.* Herd-level contamination of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* in milk of Iranian dairy farms. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103873, 2021.

GOMES, D.F.C., *et al.* *Toxoplasma gondii* in cattle in Brazil: A review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v29, e015719, 2020.

GONDIM, L.F.P *et al.* *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 35-35, 1999.

GONDIM, L.F. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 34, n. 2, p. 159–161, 2004.

GONDIM, L.F.P; MINEO, J.R.; SCHARES, G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia spp.*, *Neospora spp.*, *Sarcocystis spp.* and *Besnoitia besnoiti*. **Parasitology**, v. 144, n. 7, p. 851-868, 2017.

GONZÁLEZ-WARLETA, M. *et al.* Endogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* during successive pregnancies across three generations of naturally infected sheep. **Veterinary research**, v. 49, n. 106, 2018.

GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, P.J.; ELLIS, J.T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133-150, 2013.

GUIDO, Stefano *et al.* Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

GUIMARÃES JR, J.S. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, 2004.

HEUKELBACH, Jorg *et al.* Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 287, 2007.

HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal health research reviews**, v. 6, n. 1, p. 41-61, 2005.

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

HOLLAND, P.M. *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, 1991.

HUGHES, J. M. *et al.* The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 29-36, 2006.

IACOBUCCI, E. *et al.* Detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* DNA within the milk of Mongolian livestock. **Parasitology research**, v. 118, n. 6, p. 2005-2008, 2019.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA; **Estatística. Produção agropecuária PPM - Pesquisa Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha>. Acesso em: 13 de dezembro de 2022.

KAUFMANN, H. *et al.* Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 4, p. 289-298, 1996.

KHAN, A. *et al.* Neosporosis: An Overview of Its Molecular Epidemiology and Pathogenesis. **Engineering**, v. 6, n. 1, p. 10-19, 2020.

KIM, Pomy CP *et al.* Serological response to *Neospora caninum* infection in goats and agreement between three diagnostic techniques to detect caprine neosporosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 25-31, 2019.

KLAUCK, V. *et al.* Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 46-49, 2016.

KOETHE, M. *et al.* Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simulated gastric fluid and cow's milk. **Veterinary Parasitology**, v. 233, p. 111-114, 2017.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 108, 2017.

KYAW, T *et al.* Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows, with a low rate of transplacental transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 145-150, 2005.

LASRI, S. *et al.* Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 1-2, p. 25-32, 2004.

LEONEL, J.A.F *et al.* *Neospora caninum*: avaliação de anticorpos e problemas reprodutivos em vacas de corte até 60 dias de gestação. **Ars Veterinaria**, v. 32, n. 2, p. 97-104, 2017.

LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1583-1587, 1999.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants: an update. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 205-222, 2020.

LIU, Y.; REICHEL, M.P.; LO, W-C. Combined control evaluation for *Neospora caninum* infection in dairy: Economic point of view coupled with population dynamics. **Veterinary Parasitology**, v. 277, 108967, 2020.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **Veterinaria Record** v. 44, p. 804-807, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3-4, p. 215-221, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 191-195, 2008.

LUPTAKOVA, L. *et al.* DNA detection of *Toxoplasma gondii* in sheep milk and blood samples in relation to phase of infection. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 3-4, p. 250-253, 2015.

MAHITTIKORN, A. *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification technique and comparison with quantitative real-time PCR for the rapid visual detection of canine neosporosis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.

MANCIANTI, F. *et al.* Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. **BioMed research international**, v. 2013, 905326, 2013.

MANSILLA, F.C. *et al.* Development and validation of a novel ELISA for the detection of *Neospora caninum* antibodies in bovine sera. **Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v.7, n.2, 204, 2019.

MARANA, E.R.M. *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos de corte, abatidos em matadouros do norte do Paraná-Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 38-40, 1994.

MCALLISTER, M.M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

MCINNES, L.M. *et al.* Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 207-213, 2006.

MEIRELLES, A. C. F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2204-2209, 2014.

MOLAN, A.A.L., WANG, W., HUNTER, M.L. Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots. **Tropical Biomedicine**, 36, p.898-925, 2019.

MORÉ, G. *et al.* Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 51-54, 2009.

MORRIS, M.C.; KHAN, M. N.; PICHICHERO, M.E. A PCR-based method for quantifying neutrophils in human nasal secretions. **Journal of immunological methods**, v. 447, p. 65-70, 2017.

MOSKWA, B. *et al.* The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. **Acta Parasitologica**, v. 48, n. 2, p. 138-141, 2003.

MOSKWA, B. *et al.* The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v. 100, n. 3, p. 633-636, 2007.

MOSKWA, B.; CABAJ, W. The role of the colostrum and milk in *Neospora caninum* transmission. **Helminthologia**, v. 44, n. 3, p. 126-129, 2007.

MOTTA, A.C. da. *et al.* Aborto em ovinos associado à toxoplasmose: Caracterização sorológica, anátomo-patológica e imunoistoquímica. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 204-208, 2008.

MOURA, de F.L. *et al.* Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant and postpartum women attended at public healthcare facilities in the City of Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n.2, p. 200-207, 2013.

MÜLLER, N. *et al.* Comparative molecular investigation of Nc5-PCR amplicons from *Neospora caninum* Nc-1 and *Hammondia heydorni*-Berlin-1996. **Parasitology Research**, v. 87, n. 10, p. 883-885, 2001.

MÜLLER, N. *et al.* Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 252-255, 2002.

MURPHY, M.A.; SHARIFLOU, M.R.; MORAN, C. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. **The Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 4, p. 645, 2002.

NAYERI, T. *et al.* Global prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the aborted fetuses and ruminants that had an abortion: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 290, 109370, 2021.

NAZIR, M. M. *et al.* Effects of age and breed on the prevalence of *Neospora caninum* in commercial dairy cattle from Pakistan. **The Journal of parasitology**, v. 99, n. 2, p. 368-370, 2013.

NOGAREDA, C. *et al.* Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 193-199, 2007.

NOVOA, M.B. *et al.* Evaluation of a competitive inhibition ELISA based on the recombinant protein tSAG1 to detect anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 3, p. 401-408, 2020.

OGAWA, L. *et al.* Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 312-316, 2005.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases**. Chapter 1.1.6. In: OIE Terrestrial Manual. Paris, France: OIE, 2018.

OKEOMA, C.M. *et al.* The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 307-315, 2004.

OKEOMA, C.M. *et al.* *Neospora caninum*: quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 48-55, 2005.

OPSTEEGH, M. *et al.* Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3-4, p. 343-354, 2011.

ORTEGA-MORA, L.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.. Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. **Acta Parasitologica**, v. 51, n. 1, p. 1-14, 2006.

OSSANI, R.A. *et al.* *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on west mesoregion of Santa Catarina state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1294-1300, 2017.

PALKOVÁ, Z. Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. **EMBO Reports**, v. 5, n. 5, p. 470-476, 2004.

PEREIRA, K. S.; FRANCO, R.M.B; LEAL, D. A.G. Transmission of toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by foods. **Advances in food and nutrition research**, v. 60, Chapter 1, p. 1-19, 2010.

PEREIRA, G. R. *et al.* *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in experimentally infected pregnant heifers. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3-4, p. 129-135, 2014.

PEROTTA, J.H. *et al.* An abortion storm in dairy cattle associated with neosporosis in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n.2, e001821, 2021.

PERRUCCI, S. *et al.* Apicomplexan Protozoa Responsible for Reproductive Disorders: Occurrence of DNA in Blood and Milk of Donkeys (*Equus asinus*) and Minireview of the Related Literature. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 111, 2021.

PETTERSEN, E.K. Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology**, v. 92, n. 1-6, p. 175-176, 1984.

PINHEIRO, A.F. *et al.* Use of ELISA based on NcSRS2 of *Neospora caninum* expressed in *Pichia pastoris* for diagnosing neosporosis in sheep and dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 148-154, 2015.

PINTO-FERREIRA, F. *et al.* Patterns of transmission and sources of infection in outbreaks of human toxoplasmosis. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 12, p. 2177-2182, 2019.

POWELL, C.C.; BREWER, M.; LAPPIN, M.R. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 29-33, 2001

RAGOZO, A.M.A *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

RAGOZO, A.M.A. *et al.* Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 323-326, 2009.

REICHEL, M.P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

REICHEL, M.P.; WAHL, L.C.; ELLIS, J.T. Research into *Neospora caninum*—what have we learnt in the last thirty years? **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 505, 2020.

RIBEIRO, C.M. *et al.* Meta-analysis of the prevalence and risk factors associated with bovine neosporosis. **Tropical animal health and production**, v. 51, n. 7, p. 1783-1800, 2019.

SAAD, N.M.; HUSSEIN, A.A.A; EWIDA, R.M. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in raw goat, sheep, and camel milk in Upper Egypt. **Veterinary World**, v. 11, n. 9, p. 1262, 2018.

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

SANTANA ROCHA, de D. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected sheep's milk. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8658-8662, 2015.

SANTOS, A.P.M.E. *et al.* Dairy cow abortion associated with *Neospora caninum* and other infectious agents. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 545-547, 2005.

SANTOS, T.R. *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3-4, p. 324-326, 2009.

SANTOS, do J.R. *et al.* *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: seroprevalence and associated factors in cows from milk farms of Toledo, Parana, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5, p. 1581-1590, 2020.

SARTOR, I. F. *et al.* Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 1-150, 2003.

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J. Adaptation of a Surface Antigen-based ELISA for the Detection of Antibodies Against *Neospora caninum* in Bovine Milk. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 52, n. 1, p. 45-48, 2005.

SCHLÜTER, Dirk *et al.* Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 917-929, 2014.

SCHNEEBERGER, C. *et al.* Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. **Genome Research**, v. 4, n. 4, p. 234-238, 1995.

SHARIATZADEH, S.A. *et al.* The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in bovines: A systematic review and meta-analysis. **Parasitology**, v. 148, 1417-1433, 2021.

SILVA, D.A.O *et al.* Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, 2007.

SILVA, da M.G. *et al.* Epidemiological factors associated with seropositivity for toxoplasmosis in pregnant women from Gurupi, State of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 469-475, 2014.

SILVA, da J.G. *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.

SINNOTT, F.A. *et al.* Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011–2016). **Veterinary Parasitology**, v. 239, p. 19-25, 2017.

SLAPETA, J.R. *et al.* Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, v. 163, n. 2, p. 147-154, 2002.

SLAPETA J.R. *et al.* Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v.109 n.3-4, p. 157-167, 2002.

SNAK, A. *et al.* *Neospora caninum* in properties in the west region of Paraná, Brazil: prevalence and risk factors. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 1, p. 52-60, 2018.

SOARES, R.M. *et al.* Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 168-172, 2011.

ŠPILOVSKÁ, S.; MOSKWA, B.; REITEROVÁ, K. Kinetics of anti-*Neospora* antibodies during the period of two consecutive pregnancies in chronically infected dairy cows. **Acta Parasitologica**, v. 58, n. 4, p. 463-467, 2013.

SPIŠÁK, F. *et al.* Prevalence estimation and genotypization of *Toxoplasma gondii* in goats. **Biologia**, v. 65, n. 4, p. 670-674, 2010.4.

SROKA, J. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. **Folia Parasitologica**, v. 64, 2017.023, 2017.

STELZER, S. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 15, e00037, 2019.

SU, C. *et al.* Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 2010.

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

UGGLA, A. *et al.* Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1467-1472, 1998.

USMAN, T. *et al.* Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3319-3328, 2014.

VAN DEN BROM, R. *et al.* Zoonotic risks of pathogens from sheep and their milk borne transmission. **Small Ruminant Research**, v. 189, 106123, 2020.

VERONESI, F. *et al.* Screening of *Toxoplasma gondii* positive sheep flocks in Perugia Province (Umbria Region, Central Italy) using bulk milk analyses. **Large Animal Review**. v. 24, n.5, p. 185-187. 2018.

VIDAL-MARTINS, A. M. C. *et al.* Avaliação do consumo de leite e produtos lácteos informais e do conhecimento da população sobre os seus agravos à saúde pública, em um município do Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim de Indústria Animal**, v. 70, n. 3, p. 221-227, 2013.

VISMARRA, A. *et al.* *Toxoplasma gondii* and pre-treatment protocols for polymerase chain reaction analysis of milk samples: a field trial in sheep from Southern Italy. **Italian Journal of Food Safety**, v. 6, n. 1, 6501, 2017.

VON BLUMRÖDER, D. *et al.* Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 1-2, p. 11-22, 2004.

WALSH, C. P. *et al.* Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. **Journal of eukaryotic microbiology**, v.46, n.5, p.73S-74S, 1999.

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.



WESTON, J. F.; WILLIAMSON, N. B.; POMROY, W. E. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, n. 2, p. 142-148, 2005.

WIGINGTON, C.P. *et al.* The polyadenosine RNA-binding protein, zinc finger Cys3His protein 14 (ZC3H14), regulates the pre-mRNA processing of a key ATP synthase subunit mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 43, p. 22442-22459, 2016.

WOUDA, W. *et al.* Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 5, p. 711-716, 1998.

XU, M. J. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in dairy cows in subtropical southern China. **Parasitology**, v.139, n.11, p.1425-1428, 2012

APÊNDICE 1 - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS DE LEITE

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	
	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFPR	
	LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA	
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP	

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA NO LEITE

Pré-tratamento

1. Centrifugar 10 a 50 ml de leite em um tubo falcon a 2400 g por 10 min.
2. Após centrifugar, retirar a camada de gordura com uma espátula estéril e descartar a maior parte do sobrenadante, exceto o pellet ao fundo do tubo.
3. Transferir o pellet e o sobrenadante remanescente para tubos eppendorfs de 1,5-2,0 ml.
4. Resuspender cerca de 1ml do pellet adicionando 200 µL de TE (1mM EDTA, 10mM Tris HCL (pH 7,6) e 300 µL 0,5 M EDTA (pH =8) e centrifugar a 4500 g por 10 min.
5. Após centrifugar descartar o sobrenadante e resuspender o novo pellet em 200 µL de PBS.

Extração

Kit de extração PureLink Genomic DNA Kit – Invitrogen com algumas modificações

Antes de iniciar: Ajustar o banho maria a 55°C, separar etanol a 100% pré-resfriado, esterilizar eppendorfs de 1,5ml.

1. Após resuspending em 200 µL de PBS, adicionar 20 µl de solução de proteinase K.
2. Adicionar 20 µl de RNase A, misturar rapidamente em vórtex e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos.
3. Adicionar 200 µl do PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer.
4. Fechar e misturar bem em vórtex para obter uma solução homogênea.
5. Incubar a 55 ° C de 1 a 3h, até a dissolução completa do pellet
6. Remover o tubo do banho-maria. Adicionar 200 µl de etanol 96-100% e misturar bem com vórtex durante 5 segundos para obter uma solução homogênea.
7. Separar a PureLink Spin Column e os tubos coletores.
8. Adicionar o conteúdo do item 6 (~ 640 µl) à PureLink Spin Column devidamente identificada e posicionada sobre o tubo coletor, tampar e colocar na microcentrífuga.
9. Centrifugar a coluna a 12.000 RPM por 1 minuto à temperatura ambiente. Remover o tubo coletor contendo o líquido lisado e colocar a coluna em um novo tubo coletor.
10. Adicionar 500 µl de **tampão de lavagem 1 previamente preparado com etanol** na coluna.
11. Centrifugar a coluna a 12.000 RPM por 1 minuto à temperatura ambiente. Remover o tubo de coletor e colocar a coluna em um novo tubo coletor para a segunda lavagem.
12. Adicionar 500 µl de **tampão de lavagem 2 previamente preparado com etanol** na coluna.
13. Centrifugar a coluna a 12.000 RPM por 3 minutos à temperatura ambiente. Remover o tubo de coletor.
14. Colocar a coluna em um microtubo de 1,5ml estéril e identificado. Deixar a tampa aberta por 2 min para permitir a evaporação do etanol restante.
15. Adicionar 25-200 µl (utilizar 30 µl) de tampão de eluição genômica PureLink previamente aquecido na coluna.
16. Incubar à temperatura ambiente por 5 min. Centrifugar à temperatura ambiente a 12.000 RPM por 1 minuto. Descartar a coluna. (no microtubo contém DNA genômico purificado).
17. Armazenar o DNA purificado a -20°C.

APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO REALIZADO COM OS PRODUTORES DAS PROPRIEDADES INCLUÍDAS NO ESTUDO

PROJETO Diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii* e monitoramento de *Neospora caninum* no leite de cru vacas naturalmente infectadas

Questionário Epidemiológico – Fatores de risco e Aspectos de manejo

Proprietário:	Município:
Propriedade:	Identificação/ código:
Endereço:	Contato :
Médico Veterinário Responsável:	

Esse questionário pertence a um projeto de doutorado e tem como objetivo estabelecer fatores de risco e aspectos de manejo relacionados a prevalência de *Neospora caninum* no soro e no leite de vacas leiteiras. Sua colaboração é de extrema importância para o andamento desse projeto, seguem abaixo algumas perguntas sobre a propriedade, manejo, rebanho e informações individuais a respeito dos animais. Nenhuma dessas informações será divulgada para terceiros e será de uso exclusivo para a pesquisa.

Características da propriedade e manejo

➤ Características da propriedade

1. Área total aproximada da propriedade

2. Número de animais no rebanho:

3. Sistema de criação:

- Extensivo
- Semi-extensivo
- Intensivo (confinamento)

4. Sistema de confinamento

- Confinamento total em baias individuais (Tie Stall)
- Confinamento em estábulos e com áreas coletivas livres para repouso e exercício (Loose Housing)
- Confinamento em galpões, uma área cercada com vacas soltas e baias para descanso (Free-stall)
- Confinamento alternativo, vacas circulam livremente dentro de um galpão coberto, possui uma grande área de cama coletiva feita com material de compostagem (Compost Barn)

➤ Armazenamento de água e alimentos

5. Existe uma área restrita para armazenamento de alimentos/ração?

- Sim
- Não

6. Armazenamento de silagem

- Empilhado no chão (acima do solo) – aberto
- Empilhado no chão (acima do solo) – coberto
- Poços de silo
- Silo/compartimento fechado

7. Armazenamento de feno

- Empilhado no chão – aberto
- Empilhado no chão – coberto
- Celeiro/compartimento fechado

8. Histórico de contaminação de forragem ou silagem por micotoxinas ?

Sim

Não

9. Qual a fonte da água fornecida aos animais ?

Lagoa Açude Abastecimento público

Poço Cisterna

10. Armazenam água para fornecimento aos animais?

Sim

Não

11. Armazenam água em tanques/compartimentos

Abertos

Cobertos –

➤ Manejo sanitário/Presença de animais contactantes

12. É realizado um controle periódico de roedores?

Sim

Não

13. Presença de cães na propriedade

Sim

Não

14. Presença de gatos

Sim

Não

15. Quantos cães

1 () 2 () 3 () 4 () 5 () >5 ()

16. Quantos gatos

1 (x) 2 () 3 () 4 () 5 () >5 ()

17. Presença recente de cães/gatos ou filhotes ou ninhadas na propriedade?

() Sim

() Não

18. Os cães são criados

() Soltos () Canis/áreas restritas

19. Os cães possuem acesso as áreas de pastagem, alimentação e armazenamento de alimento?

Sim ()

Não ()

20. Os cães possuem acesso as áreas de armazenamento de água?

Sim ()

Não ()

21. Os cães possuem acesso as áreas de parto?

Sim ()

Não ()

22. Qual a alimentação dos cães e gatos?

() Ração () Somente do que caçam

() Vísceras de animais abatidos na propriedade

() Sobras de alimento

23. É oferecida carne crua aos cães?

Sim ()

Não ()

24. É oferecido leite de vaca cru aos cães?

Sim ()

Não ()

25. Presença de cães selvagens

Sim ()

Não ()

26. Presença de aves domésticas

Sim ()

Não ()

27. Se sim, quais:

Galinhas ()

Patos, gansos, marrecos ()

Perus ()

Outras: _____

28. Presença de outros animais domésticos:

() Cavalos () Cabras

() Ovelhas Outros:

29. Destinação de carcaças:

() Enterradas () Incineração

() Compostagem

30. Realizam a remoção de placentas e restos fetais?

Sim ()

Não ()

31. Placentas e restos fetais são enterrados?

Sim ()

Não ()

32. As vacas tem hábito de placentofagia (ingerir a placenta após o parto)?

Sim ()

Não ()

33. Oferecem leite pasteurizado para os bezerros?

Sim ()

Não ()

34. Utilizam colostro combinado de várias vacas?

Sim ()

Não ()

Rebanhos

➤ Problemas reprodutivos

35. Histórico de aborto no rebanho

Sim () Não ()

36. Qual a taxa anual de aborto no rebanho?

<2% () 2-5% () >5% () 1 vaca em 4 meses (número 487)

37. Qual a taxa anual de reabsorção fetal ?

<7% () 7-10% () >10% ()

38. Esses abortos ocorreram ou tem ocorrido

(a) Em grande quantidade de vacas em um espaço curto de tempo

(b) Em algumas vacas em espaço longo de tempo ou ao longo do ano, em gestações ou/e gerações sucessivas

39. A causa do aborto é investigada/diagnosticada ?

Sim ()

Não ()

40. Os tecidos de fetos abortados são enviados para análise ?

Sim ()

Não ()

41. Histórico de outros problemas reprodutivos

() Natimorto

() Reabsorção fetal

() Nascimento de filhotes fracos e doentes () Retenção fetal

() Bezerros mortos ao nascer

42. É realizado controle periódico para outros agentes infecciosos causadores de distúrbios reprodutivos?

() Brucelose () BVD () Leptospirose

() Tuberculose () IBR

➤ Reposição de animais no rebanho

43. Qual a taxa de reposição no rebanho ao ano?

<20% () 20-25% () >25% ()

44. A reposição é feita a partir de novilhas do próprio rebanho?

Sim ()

Não ()

45. A reposição é feita com novilhas adquiridas de outros rebanhos?

Sim ()

Não ()

46. Realizam testes para *Neospora caninum* (sorologia) ao introduzir novos animais no rebanho?

Sim ()

Não ()

47. Colocam animais novos em quarentena antes de introduzir no rebanho?

Sim ()

Não ()

48. Realizam inseminação com touros de corte?

Sim ()

Não ()

49. Realizam transferência de embriões?

Sim ()

Não ()

50. Qual a taxa anual de descarte no rebanho?

<15% () 15-20% () >20% ()

ANEXO 1 - CERTIFICADO DE DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 011/2019, referente ao projeto "Detecção de *Neospora Caninum* e *Taraxiplasma Gaudii* no leite de vacas e búfalas naturalmente infectadas", sob a responsabilidade Rosângela Lucatelli Dittrich – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau I de invasividade, em reunião de 17/04/2019.

Vigência do projeto	Abril/2019 até Dezembro/2021
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> (bovino) e <i>Bubalus bubalis</i> (bubalino)
Número de animais	200
Peso/Idade	430 – 500 kg/Adulto
Sexo	Fêmea
Origem	Propriedades particulares no Paraná, Brasil.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 011/2019, regarding the project "Detection of *Neospora caninum* and *Taraxiplasma gaudii* in milk from naturally infected cows and water buffaloes" under Rosângela Lucatelli Dittrich supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree I of invasiveness, in session of 17/04/2019.

Duration of the project	April/2019 until December/2021
Species/Line	<i>Bos taurus</i> (bovine) and <i>Bubalus bubalis</i> (bubaline)
Number of animals	200
Weight/Age	430 – 500 kg/Adult
Sex	Female
Origin	Farms in Paraná, Brazil.

Curitiba, 17 de abril de 2019

Chayane da Rocha

Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA

ANEXO 2 – OFÍCIO DE APROVAÇÃO DE ALTERAÇÕES PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OFÍCIO Nº 045/2022

Para: Rosângela Locatelli Dittrich
Assunto: Protocolo 011/2019

Prezado(a) pesquisador(a),

Após avaliação da solicitação constante em ofícios enviados em 07 de julho e 05 de agosto de 2022, acerca de projeto/aula sob sua responsabilidade, de protocolo número 011/2019 intitulado **“Detecção de Neospora caninum e Toxoplasma gondii de leite cru de vacas e bufálas naturalmente infectadas”**, a Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias – UFPR decidiu por concordar com as alterações solicitadas.

Sendo assim, o protocolo 011/2019 passa a vigorar com prazo de encerramento em 22/09/2022, com alteração no número de animais (de 110 bovinos para 118), exclusão do uso de bubalinos no experimento e, portanto, alteração no título do projeto (de **“Detecção de Neospora caninum e Toxoplasma gondii de leite cru de vacas e bufálas naturalmente infectadas”** para **“Diagnóstico molecular de Toxoplasma gondii e monitoramento de Neospora caninum no leite de vacas naturalmente infectadas”**).

Curitiba, 28 de setembro de 2022.

Alex Maiorka
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
AG - UFPR