

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 58, No 1 (2007)



### Serological survey of antibodies against *Toxoplasma gondii* in organic sheep and goat farms in Greece

V. NTAFIS (Β. ΝΤΑΦΗΣ), E. XYLOURI (Ε.Μ. ΞΥΛΟΥΡΗ), A. DIAKOU (Α. ΔΙΑΚΟΥ), Κ. SOTIRAKOGLU (Α. Κ. ΣΩΤΗΡΑΚΟΓΛΟΥ), Ι. KRITIKOS (Ι. ΚΡΗΤΙΚΟΣ), E. GEORGAKILAS (Ε. ΓΕΩΡΓΑΚΙΛΑΣ), Ι. MENEGATOS (Ι. ΜΕΝΕΓΑΤΟΣ)

doi: [10.12681/jhvms.14972](https://doi.org/10.12681/jhvms.14972)

#### To cite this article:

NTAFIS (Β. ΝΤΑΦΗΣ) V., XYLOURI (Ε.Μ. ΞΥΛΟΥΡΗ) E., DIAKOU (Α. ΔΙΑΚΟΥ) A., SOTIRAKOGLU (Α. Κ. ΣΩΤΗΡΑΚΟΓΛΟΥ) Κ., KRITIKOS (Ι. ΚΡΗΤΙΚΟΣ) Ι., GEORGAKILAS (Ε. ΓΕΩΡΓΑΚΙΛΑΣ) Ε., & MENEGATOS (Ι. ΜΕΝΕΓΑΤΟΣ) Ι. (2017). Serological survey of antibodies against *Toxoplasma gondii* in organic sheep and goat farms in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 58(1), 22–33. <https://doi.org/10.12681/jhvms.14972>

## Ανίχνευση αντισωμάτων κατά του *Toxoplasma gondii* σε βιολογικές εκτροφές αιγών και προβάτων

B. Ντάφης<sup>1</sup>, E. Ξυλούρη<sup>1</sup>, A. Διάκου<sup>2</sup>,  
K. Σωτηράκογλου<sup>3</sup>, I. Κρητικός<sup>1</sup>,  
E. Γεωργακίλας<sup>1</sup>, I. Μενεγάτος<sup>1</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Η τοξοπλάσμωση είναι ένα παρασιτικό νόσημα με παγκόσμια εξάπλωση που οφείλεται στο πρωτόζωο *Toxoplasma gondii*. Η παρούσα μελέτη χωρίζεται στην προκαταρκτική και στην κύρια έρευνα. Κατά την προκαταρκτική έρευνα ανιχνεύθηκαν ορολογικά με τη δοκιμασία ELISA IgG αντισώματα κατά του *T. gondii* σε μικρά μηρυκαστικά (184 πρόβατα και 229 αίγες) βιολογικών εκτροφών της Πελοποννήσου και της Δυτικής Στερεάς Ελλάδας. Η προκαταρκτική δειγματοληψία έλαβε χώρα την άνοιξη του 2005 και αφορούσε σε αρσενικά ζώα και θηλυκά που είχαν αποβάλει κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2004-2005. Σε ένα σημαντικό ποσοστό των ζώων ανιχνεύθηκαν αντισώματα κατά του *T. gondii*, με αποτέλεσμα να αποφασιστεί περαιτέρω διερεύνηση του νοσήματος στις βιολογικές εκτροφές της Δυτικής Ελλάδας. Ακολούθησε η κύρια έρευνα, κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες το καλοκαίρι του 2006, σε βιολογικές εκτροφές αιγών και προβάτων της Πελοποννήσου, της Δυτικής Στερεάς Ελλάδας και του Ν. Ιωνίνων. Οι αιμοληψίες αφορούσαν σε ζώα από ποιμνία με ιστορικό αποβολών κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2005-2006. Το σύνολο των ζώων χωρίστηκε σε τρεις ομάδες: σε ενήλικα αρσενικά, σε θηλυκά που απέβαλαν κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2005-2006 και σε θηλυκά χωρίς ιστορικό αποβολών κατά το ίδιο χρονικό διάστημα. Κατά την κύρια έρευνα εξετάστηκαν συνολικά 182 οροί προβάτων και 167 οροί αιγών με τη δοκιμασία ELISA. Αναλυτικά, το 38,46% των κριών, το 60,87% των προβατινών που απέβαλαν και το 54,21% των προβατινών που δεν απέβαλαν είχε αντισώματα κατά του παρασίτου και οι διαφορές ήταν στατιστικώς σημαντικές μόνο μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών ζώων ( $p < 0.05$ ). Αντίστοιχα, το 12,12% των τράγων, το 14,29% των αιγών που απέβαλαν και το 22,35% των αιγών που δεν απέβαλαν είχε αντισώματα κατά του παρασίτου, χωρίς στατιστικώς σημαντικές διαφορές ( $p > 0.05$ ). Οι αίγες σε σχέση με τα πρόβατα εμφάνισαν

## Serological survey of antibodies against *Toxoplasma gondii* in organic sheep and goat farms in Greece

Ntakis V.<sup>1</sup>, Xylouri E.<sup>1</sup>, Diakou A.<sup>2</sup>,  
Sotirakoglou K.<sup>3</sup>, Kritikos I.<sup>1</sup>, Georgakilas E.<sup>1</sup>,  
Menegatos I.<sup>1</sup>

**ABSTRACT.** Toxoplasmosis is a parasitic infection with global distribution caused by the protozoon *Toxoplasma gondii*. The present study is divided into the preliminary and the basic research. In the preliminary research, 413 serum samples (184 sheep and 229 goats) from organic farms of Peloponnese and Western Sterea Hellas were tested for IgG antibodies against *T. gondii*, by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Blood sampling took place during spring of 2005 and samples were taken from male animals and female that had aborted during the reproductive period of 2004-2005. Significant prevalence of antibodies was the reason that further research of toxoplasmosis in organic farms was conducted. For the basic research, small ruminants' blood samples from organic farms of Peloponnese, Western Sterea Hellas and the county of Ioannina, were collected during summer of 2006. Blood samples were collected from flocks with cases of abortions during the reproductive period of 2005-2006. Animals were separated into 3 groups: males, females that had abortions during the reproductive period of 2005-2006 and females that did not have abortions during the same period. A total number of 182 sheep sera and 167 goat sera were tested by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that antibodies were detected in 38.46% of male sheep, 60.87% of female sheep that had abortions during the reproductive period 2005-2006 and in 54.21% of female sheep that did not have abortions during the same period. Significant difference was determined only between male and female animals ( $p < 0.05$ ). In addition, antibodies were detected in 12.12% of male goats, 14.29% of female goats that had abortions and in 22.35% of female goats that did not have abortions in the reproductive period 2005-2006. There was no significant difference between the results ( $p > 0.05$ ). Seroprevalence in goats was significantly lower than that of the sheep ( $p < 0.05$ ). In animals,

<sup>1</sup> Εργ. Ανατομίας & Φυσιολογίας Αγρ. Ζώων, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

<sup>2</sup> Εργ. Παρασιτολογίας και Παρασιτικών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 541 24, Θεσσαλονίκη

<sup>3</sup> Εργ. Μαθηματικών, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

<sup>1</sup> Department of Anatomy & Physiology of Farm Animals, Faculty of Animal Science, Agricultural University of Athens, 75, Iera Odos Str., 118 55, Athens, Greece.

<sup>2</sup> Lab. of Veterinary Parasitology and Parasitic Diseases, Veterinary Faculty, Aristotelian University of Thessaloniki, 541 24, Thessaloniki.

<sup>3</sup> Department of Mathematics and Statistics, Faculty of Science, Agricultural University of Athens, 75, Iera Odos Str., 118 55, Athens, Greece.



στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά οροθετικών ζώων και στις τρεις κατηγορίες ( $p < 0.05$ ). Επίσης, στα ζώα ηλικίας έως και 4 ετών, τα ποσοστά οροθετικότητας ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα (39,58% στα πρόβατα και 13,04% στις αίγες) σε σχέση με αυτά των ζώων ηλικίας μεγαλύτερης των 4 ετών (61,97% και 24%, αντίστοιχα) ( $p < 0.05$ ). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η τοξοπλάσμωση απαντάται σε υψηλό ποσοστό τόσο σε ζώα που απέβαλαν όσο και σε ζώα που δεν απέβαλαν, καθώς και ότι είναι συχνότερη σε ζώα μεγαλύτερης ηλικίας. Επιπλέον, παρατηρείται διαφορετική ευπάθεια είδους και φύλου στη μόλυνση αιγών και προβάτων με το παράσιτο.

**Λέξεις ευρητηρίας:** *Toxoplasma gondii*, πρόβατα, αίγες, βιολογικά, ELISA, Ελλάδα

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τοξοπλάσμωση αποτελεί μία παρασιτική ζωοανθρωπονόσο που οφείλεται στο πρωτόζωο *Toxoplasma gondii*. Το *T. gondii* είναι ενδοκυτταρικό παράσιτο που προσβάλλει ένα ευρύτατο φάσμα οργανισμών. Οι ενδιάμεσοι ξενιστές του παρασίτου φαίνεται ότι είναι περισσότερα από διακόσια είδη θηλαστικών, όπως ο σκύλος, η γάτα, τα βοοειδή, το πρόβατο, η αίγα, ο χοίρος, η αρκούδα κ.α. (Haralabidis 1995), διάφορα είδη θαλάσσιων θηλαστικών, όπως οι φάλαινες Beluga και άλλα κητώδη (Mikaelian et al. 2000, Dubey et al. 2003), διάφορα είδη πτηνών (Dubey 2002), καθώς και ο άνθρωπος. Τα μέλη της οικογένειας Felidae, στα οποία ανήκει και η κατοικίδια γάτα, αποτελούν τους τελικούς ξενιστές του *T. gondii* (Urquhart et al. 1996).

Η μόλυνση των ξενιστών του παρασίτου μπορεί να γίνει από τρία μολυσματικά στάδια του βιολογικού κύκλου του παρασίτου, τα οποία είναι οι ώριμες ωοκύστες, τα βραδυζωΐδια, που περιέχονται σε κύστες των μυών και των σπλάχνων, και τα ταχυζωΐδια. Μετά τη μόλυνση, το παράσιτο σχηματίζει κύστες στους ιστούς των ξενιστών (Bowman 1999).

Οι αίγες, τα πρόβατα και γενικά οι φυτοφάγοι ξενιστές μολύνονται κατά κύριο λόγο με την κατάποση ώριμων ωοκύστεων από το περιβάλλον (Jubb et al. 1993). Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί κάθετη μετάδοση της τοξοπλάσμωσης με τη διέλευση των ταχυζωΐδιων στο έμβρυο, κατά το στάδιο της παρασιταϊμίας (Tenter et al. 2000). Σε πολλά είδη, όπως στις αίγες, στα πρόβατα και στις αγελάδες, παρατηρείται μετάδοση μέσω των ταχυζωΐδιων που περιέχονται στο γάλα (Powell et al. 2001). Στα πρόβατα ενδεχομένως να λαμβάνει χώρα και αφροδίσια μετάδοση του παρασίτου (Martinez-Garcia et al. 1996).

Στα μέλη της οικογένειας Felidae, ο βιολογικός κύκλος είναι παρόμοιος με εκείνον που παρατηρείται στους ενδιάμεσους ξενιστές, με τη διαφορά ότι περι-

aged less than 4 years old, seroprevalence was significantly lower (39.58% for sheep and 13.04% for goats) than that for animals aged more than 4 years old (61.97% for sheep and 24% for goats) ( $p < 0.05$ ). The results of the survey suggest that there is high prevalence of toxoplasmosis both in animals that had aborted and in animals that had not aborted and that there are different species and gender susceptibility. Results also indicate that toxoplasmosis is more common in older animals.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, sheep, goats, organic, ELISA, Greece

## INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a parasitic zoonosis caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. It is an intracellular parasite which infects a wide range of species. Over two hundred mammals (Haralabidis 1995) and marine mammals (Mikaelian et al. 2000, Dubey et al. 2003), along with birds (Dubey 2002) and human, seem to be intermediate hosts of this parasite. Members of the family Felidae, such as domestic cat, act as definite hosts (Urquhart et al. 1996).

Oocysts, bradyzoites contained in tissue cysts and tachyzoites are the three infectious stages in the life cycle of *T. gondii*. These stages are infectious for both intermediate and definite hosts. *T. gondii* forms tissue cysts after host infection (Bowman 1999).

Herbivores, such as sheep and goats, are mainly infected by sporulated oocysts oral ingestion (Jubb et al. 1993). Vertical transmission of *T. gondii* during pregnancy, with the tachyzoites being transmitted to the fetus transplacentally, can also be observed (Tenter et al. 2000). In several species, such as sheep, goats and cattle, transmission of *T. gondii* with consumption of milk, containing tachyzoites, is possible (Powell et al. 2001). Finally, in sheep, venereal transmission is considered to be probable (Martinez-Garcia et al. 1996).

In definite hosts, apart from the asexual multiplication of *T. gondii*, which is also observed in intermediate hosts, there is a sexual phase of the life cycle. This phase results in unsporulated oocyst formation passing into the environment. Oocysts play a major role in the epizootiology of toxoplasmosis in sheep and goats, since sporulated oocysts are very resistant to environmental conditions (Tenter et al. 2000).

In sheep, usually there is no clinical manifestation of toxoplasmosis. During the first days, though, an increase in respiratory rate and a febrile response may be observed (Esteban-Redondo et al. 1999). A goat, however,



λαμβάνει και τον εγγενή πολλαπλασιασμό, ο οποίος απολήγει σε παραγωγή ωοκύστεων και σε αποβολή τους στο περιβάλλον. Οι ωοκύστες παίζουν τον κύριο ρόλο στην επιζωοτιολογία του νοσήματος στις αίγες και στα πρόβατα, καθώς οι ώριμες μορφές τους είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Tenter et al. 2000).

Στα πρόβατα, η μόλυνση συνήθως δεν συνοδεύεται από συμπτώματα. Ωστόσο, τις πρώτες ημέρες μετά τη μόλυνση με ωοκύστες ή ταχυζωΐδια παρατηρείται άνοδος της θερμοκρασίας του σώματος και αύξηση της συχνότητας της αναπνοής (Esteban-Redondo et al. 1999). Οι αίγες, και ιδιαίτερα τα νεαρά άτομα, εμφανίζουν βαρύτερη κλινική εικόνα από τα υπόλοιπα αγροτικά ζώα. Μετά από μόλυνση με κατάποση ωοκύστεων είναι δυνατό να παρατηρηθεί ανορεξία, διάρροια, δύσπνοια έως και θάνατος (Dubey 1989).

Στις αίγες και στα πρόβατα, σε περίπτωση που η τοξοπλάσμωση μεταδοθεί για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της κνοφορίας, είναι δυνατόν να εμφανιστεί και κάθετη μόλυνση. Η κάθετη μόλυνση θεωρείται ότι στα μικρά μηρυκαστικά πραγματοποιείται μία φορά κατά τη διάρκεια της ζωής τους και μόνο σε περίπτωση που το παράσιτο μεταδοθεί κατά τη διάρκεια της κνοφορίας. Ωστόσο, σε πρόσφατες πειραματικές μελέτες, διαπιστώθηκε ότι δεν είναι απίθανη η πρόκληση επαναλαμβανόμενων αποβολών και η μετάδοση του παρασίτου διαδοχικά από γενιά σε γενιά (Duncanson et al. 2001, Buxton et al. 2006).

Γενικά, σε περίπτωση εμφάνισης τοξοπλάσμωσης σε αίγες και πρόβατα, τα συμπτώματα που κυριαρχούν στην κλινική εικόνα των ζώων είναι οι εμβρυϊκοί θάνατοι, οι αποβολές, η μουμιοποίηση και η γέννηση θνησιγενών αμνών και εριφιών. Τα περισσότερα μολυσμένα έμβρυα αποβάλλονται μετά το μέσο διάστημα της κνοφορίας (Esteban-Redondo and Innes 1997).

Στη χώρα μας οι μόνες αναφορές μελέτης ύπαρξης του παρασίτου σε παραγωγικά ζώα μέχρι σήμερα αφορούν σε συμβατικές εκτροφές αιγοπροβάτων (Haralabidis 1987, Stefanakis et al. 1995, Kontos et al. 2001, Diakou et al. 2005a, Diakou et al. 2005b).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση των αντισωμάτων για το *T. gondii* σε ζώα βιολογικών εκτροφών αιγών και προβάτων σε περιοχές της Δυτικής Ελλάδας.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Δειγματοληψία

Η παρούσα μελέτη χωρίζεται στην προκαταρκτική και στην κύρια έρευνα. Για την προκαταρκτική έρευνα ανίχνευσης αντισωμάτων κατά του *T. gondii* σε

and especially kids, can develop more severe clinical manifestation. Anorexia, diarrhea, dyspnoea and even death can be observed after infection with oocysts (Dubey 1989).

In intermediate hosts, such as sheep and goats, primary exposure to *T. gondii* during gestation can lead to vertical transmission of toxoplasmosis. In small ruminants, vertical transmission takes place once in a lifetime and only if the parasite is transmitted during gestation. Recent studies, though, support that vertical transmission may occur more than once and in successive litters (Buxton et al. 2006, Duncanson et al. 2001).

Fetal deaths, mummifications, abortions and birth of stillborn or weak lambs and kids are the most frequent symptoms in flocks of sheep and goats being infected with toxoplasmosis. Abortions are more frequent after mid-gestation (Esteban-Redondo and Innes 1997).

Studies taken place in this country so far concerned conventional flocks of sheep and goats (Haralabidis 1987, Stefanakis et al. 1995, Kontos et al. 2001, Diakou et al. 2005a, Diakou et al. 2005b).

The aim of the present study was to detect antibodies against *T. gondii* in organic flocks of sheep and goats at Western Greece.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

The present study is divided into the preliminary and the basic research. For the preliminary research, blood sampling took place during spring of 2005 from flocks with history of abortions during the reproductive period of 2004-2005 and antibodies against *T. gondii* were detected. Sera from 11 sheep flocks, 8 goat flocks and 8 sheep and goat flocks from Peloponnese and Western Sterea Hellas were tested. Blood was collected from 413 animals and specifically from 47 ewes and 116 goats that had aborted and from 137 rams and 113 male goats.

For the conduction of the basic research, blood sampling took place during the summer of 2006 in organic farms of sheep and goats in Peloponnese, Western Sterea Hellas and the county of Ioannina. Blood sampling was from flocks with history of abortions during the reproductive period of 2005-2006. Serum samples tested were from 7 sheep flocks, 4 goat flocks and 2 sheep and goat flocks. Total animal number divided into three groups: adult males, females that aborted during the reproductive period 2005-2006 and females that did not abort during the same reproductive period. Blood samples were from 349 animals and more specifically from 23 ewes and 49 goats that aborted, 107 ewes and 85 goats that did not abort and 52 rams and 33



ορούς προβάτων και αιγών βιολογικών εκτροφών πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες την άνοιξη του 2005 από ζώα ποιμνίων που εμφάνισαν αποβολές κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2004-2005. Οι οροί αίματος που εξετάστηκαν προέρχονταν από 11 εκτροφές προβάτων, 8 εκτροφές αιγών και 8 μικτές εκτροφές (με αίγες και πρόβατα) της Πελοποννήσου και της Δυτικής Στερεάς Ελλάδας. Συνολικά, έγινε λήψη αίματος από 413 ζώα και συγκεκριμένα από 47 προβατίνες και 116 αίγες που είχαν αποβάλει, καθώς και από 137 κριούς και 113 τράγους.

Για την εκπόνηση της κύριας έρευνας πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες το καλοκαίρι του 2006, σε βιολογικές εκτροφές αιγών και προβάτων της Πελοποννήσου, της Δυτικής Στερεάς Ελλάδας και του Ν. Ιωαννίνων και αφορούσαν σε ζώα από ποίμνια που εμφάνισαν αποβολές κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2005-2006. Οι οροί αίματος που εξετάστηκαν προέρχονταν από 7 εκτροφές προβάτων, 4 εκτροφές αιγών και 2 μικτές εκτροφές. Το σύνολο των ζώων χωρίστηκε σε τρεις ομάδες: σε ενήλικα αρσενικά, σε θηλυκά που απέβαλαν κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2005-2006 και σε θηλυκά που δεν απέβαλαν κατά το ίδιο χρονικό διάστημα. Συνολικά, έγινε λήψη αίματος από 349 ζώα και συγκεκριμένα από 23 προβατίνες και 49 αίγες που είχαν αποβάλει, 107 προβατίνες και 85 αίγες που δεν είχαν αποβάλει και από 52 κριούς και 33 τράγους. Από κάθε εκτροφή έγινε λήψη αίματος από το 25% των αρσενικών ζώων και των θηλυκών που απέβαλαν, καθώς και από το 7% των θηλυκών ζώων που δεν απέβαλαν κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2005-2006. Αυτός ο τρόπος δειγματοληψίας επιλέχθηκε, λόγω του ότι στις δύο πρώτες ομάδες ο αριθμός των ζώων ήταν περιορισμένος, ενώ η τρίτη ομάδα αποτελούσε και την πολυπληθέστερη.

Η λήψη αίματος έγινε από την σφαγίτιδα φλέβα και χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια τύπου vacutainer χωρίς αντιπηκτικό και βελόνες μίας χρήσης. Τα φιαλίδια τοποθετούνταν μέσα σε ισοθερμικά κιβώτια με κατεψυγμένες παγοκύστες, ώστε να βρίσκονται σε άμεση επαφή με αυτές. Τα δείγματα το πολύ εντός 8 ωρών μεταφέρονταν στο εργαστήριο, όπου ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 2.000 στροφές/λεπτό, επί 20 λεπτά για το διαχωρισμό του ορού. Ο ορός κάθε δείγματος τοποθετείτο σε φιαλίδιο τύπου eppendorf και καταψυχόταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την εξέτασή του.

#### Ανίχνευση αντισωμάτων

Για την ανίχνευση των ειδικών IgG αντισωμάτων κατά του *T. gondii*, οι οροί εξετάστηκαν με την ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εφαρμο-

male goat. From each flock 25% of the male and female that aborted and 7% of the female that did not abort were tested during the reproductive period 2005-2006. The experimental design was based on the fact that the first and second categories were smaller compared to the third one, respectively.

Blood was collected from the jugular vein using vacutainer tubes without anticoagulant and syringes. The tubes were placed in isothermal boxes using ice bags and transferred in the lab within 8 hours. The samples were centrifuged in 2.000 rpm for 20 minutes. Each serum sample was put in eppendorf vial and kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until tested.

#### Antibodies detection

*T. gondii* specific IgG antibodies were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The testing was completed in four stages (Haralabidis 1984). Antigen (in vivo cultured parasites) was diluted in a buffer solution ( $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9,6) and it was added in flat bottom, polystyrene microtiter plate of 96 wells. After two hours incubation in room temperature and washing of the microtiter plate with distilled water containing 0.05% Tween-20, animal sera, diluted 1:300 in PBS, pH 7.2, were added in the microtiter plate. In each plate, there were three pairs of control sera being added. After incubation and washing of the microtiter plate, during the third stage, conjugate was added. Anti-Sheep IgG, whole molecule Sigma A-5187 (diluted with PBS, pH 7.2) was used for sheep sera and Anti-Goat IgG, whole molecule Sigma A-4187 (diluted with PBS, pH 7.2) was used for goat sera, respectively. During the fourth stage, after incubation and washing of the microtiter plate, enzyme substrate, being diluted in buffer solution ( $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9.8) was added (p-Nitrophenyl Phosphate, Sigma 104 Phosphate Substrate). After a ten minute incubation, stop solution, 0,1-3N NaOH was placed in every microtiter plate well and test results were being analyzed using a photometer HUMANREADER (HUMAN Diagnostic Systems, Germany) at 405 nm wave length.

Results were estimated by determining the cut off. Cut off was calculated by adding the mean of the OD negative control sera values and the threefold standard deviation.

$$\text{Cut off} = \text{Ave} + 3\text{SD}$$

Serum samples with OD values, higher than the cut off, were considered to be positive, whereas serum samples with OD values, lower than or equal to the cut off, were considered to be negative (Haralabidis 1987).

#### Statistical Analysis

Statgraphics Plus 4.0 statistical package was used in



γή της ELISA αποτελείται από τέσσερα στάδια (Haralabidis 1984). Συνοπτικά, στο πρώτο στάδιο τοποθετείτο το αντιγόνο στα βοθρία πλάκας από πολυστιρένιο 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα (επεξεργασμένα παρόσιτα από *in vivo* καλλιέργεια), αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα ( $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9,6). Στο δεύτερο στάδιο, μετά από επώαση δύο ωρών σε θερμοκρασία δωματίου και τρεις εκπλύσεις της πλάκας με απεσταγμένο νερό που περιείχε 0.05% Tween-20, τοποθετούνταν οι υπό εξέταση οροί αραιωμένοι 1:300 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH 7,2. Σε κάθε πλάκα τοποθετούνταν παράλληλα με τους υπό εξέταση ορούς, 3 ζεύγη προτυποποιημένων ορών ελέγχου (3 θετικοί και 3 αρνητικοί). Στο τρίτο στάδιο, μετά από επώαση και έκπλυση της πλάκας, τοποθετείτο το σύζευγμα (conjugate). Για τους ορούς των προβάτων ως σύζευγμα χρησιμοποιείται το Anti-Sheep IgG, whole molecule Sigma A-5187 και για τους ορούς των αιγών το Anti-Goat IgG, whole molecule Sigma A-4187, αραιωμένο σε PBS, pH 7,2. Στο τέταρτο στάδιο, μετά από επώαση και έκπλυση της πλάκας, τοποθετείτο το υπόστρωμα (p-Nitrophenyl Phosphate, Sigma 104 Phosphate Substrate), αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα ( $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9,8) και μετά από επώαση 10 λεπτών, τοποθετείτο το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (stop solution, 0,1-3N NaOH) και ακολουθούσε ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων της αντίδρασης με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) σε φωτόμετρο HUMANREADER (HUMAN Diagnostic Systems, Germany) και σε μήκος κύματος 405 nm.

Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε με τον καθορισμό του ορίου διαχωρισμού (cut off), το οποίο υπολογίστηκε με την πρόσθεση στο μέσο όρο των τιμών OD των αρνητικών ορών ελέγχου (Ave), της τριπλάσιας τυπικής απόκλισής τους (SD). Δηλαδή:

$$\text{Cut off} = \text{Ave} + 3\text{SD}$$

Όλα τα δείγματα ορών, στα οποία αντιστοιχούσαν τιμές OD μεγαλύτερες από το όριο διαχωρισμού, χαρακτηρίστηκαν «θετικά», ενώ όλα τα δείγματα ορών, στα οποία αντιστοιχούσαν τιμές OD μικρότερες ή ίσες με το όριο διαχωρισμού, χαρακτηρίστηκαν «αρνητικά» (Haralabidis 1987).

### Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου Statgraphics Plus 4.0. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το "τεστ" σύγκρισης ποσοστών σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την προκαταρκτική έρευνα, σε 63 (45,99%)

the comparison of proportions. P-values < 0.05 were considered significant at 5% confidence level.

### RESULTS

In the preliminary research, in sheep, 63 (45.99%) out of 137 rams and 33 (70.21%) out of 47 ewes that aborted tested positive. Respectively in goats 22 (19.47%) out of 113 male goats and 29 (25%) out of 116 female goats tested positive (Figure 1).

In the basic research, in sheep, 20 (38,46%) out of 52 rams, 14 (60,87%) out of 23 ewes that aborted and 58 (54,21%) out of 107 ewes that did not abort tested positive. In goats, 4 (12,12%) out of 33 male goats, 7 (14,29%) out of 49 goats that aborted and 19 (22,35%) out of 85 that did not abort tested positive (Figure 2).

In sheep, rams have the lowest seroprevalence and ewes that aborted the highest (Table 1). The difference is not statistically significant between seroprevalence of the two female categories ( $p > 0.05$ ). Furthermore, ewes in both groups have higher seroprevalence than the rams, difference that is statistically significant ( $p < 0.05$ ).

In goats, the lowest seroprevalence is that of the males, though there is no statistically significant difference between the three groups ( $p > 0.05$ ) (Table 2). Seroprevalence in goats sampled is lower than that for sheep in all three groups. In addition, the differences are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

According to the information, resulting from sample collection animals are divided in two age groups. For sheep, seroprevalence for the respective age groups 0-4 and >4 years are 39, 85% and 61, 97% and for goats, prevalence for the same age groups are 13.04% and 24% (Figure 3). Seroprevalence in both species increases significantly with age ( $p < 0.05$ ).

### DISCUSSION

The results of the preliminary research showed for the first time that in organic farms in Greece (Peloponnese and Western Sterea Hellas) a crucial number of animals are infected with *T. gondii*. In Greece, in 2004, Ministry of Agricultural Development and Food announced that breeding of sheep and goats has the greatest sharing portion (79%), with goats having 49% of the total and sheep 30%, respectively (Greek Ministry of Agriculture, 2004). Thus, toxoplasmosis survey in organic farms is of special attention, due to economic, public health and animal welfare reasons.

Special interest had the fact that many animals that have antibodies had abortions during the reproductive period 2004-2005 and the reason for that may be the

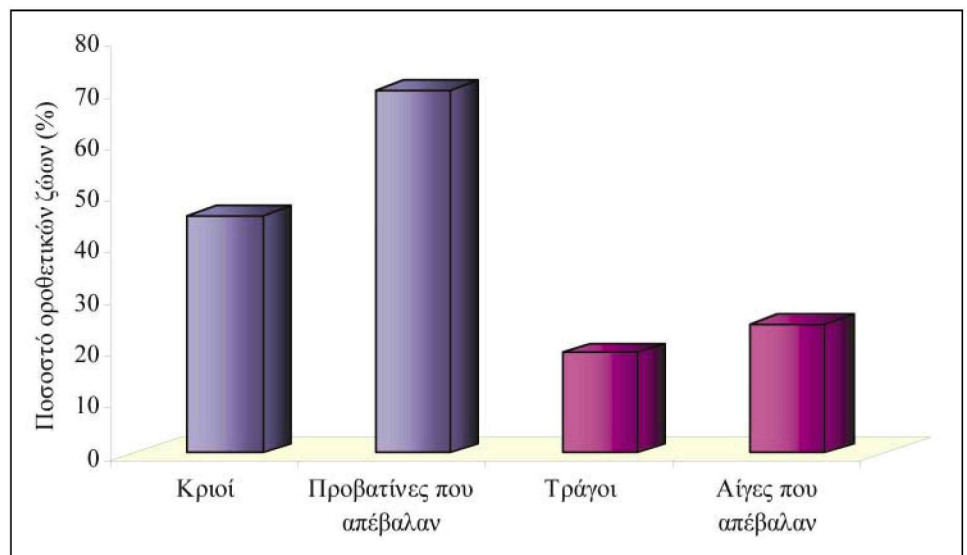


από τους 137 κριούς και σε 33 (70,21%) από τις 47 προβατίνες που απέβαλαν ανιχνεύθηκαν IgG αντισώματα κατά του *T. gondii*. Αντίστοιχα, σε 22 (19,47%) από τους 113 τράγους και σε 29 (25%) από τις 116 αίγες που απέβαλαν ανιχνεύθηκαν IgG κατά του *T. gondii* (Εικόνα 1).

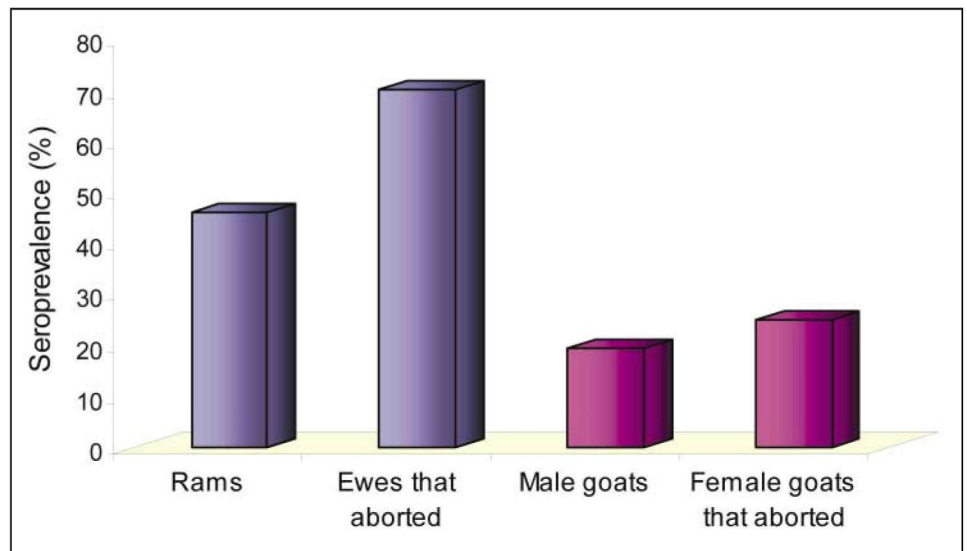
Κατά την κύρια έρευνα, σε 20 (38,46%) από τους 52 κριούς, σε 14 (60,87%) από τις 23 προβατίνες που απέβαλαν και σε 58 (54,21%) από τις 107 προβατίνες που δεν απέβαλαν, ανιχνεύθηκαν IgG κατά του *T. gondii*. Αντίστοιχα, σε 4 (12,12%) από τους 33 τράγους, σε 7 (14,29%) από τις 49 αίγες που απέβαλαν και σε 19 (22,35%) από τις 85 που δεν απέβαλαν ανιχνεύθηκαν IgG κατά του *T. gondii* (Εικόνα 2).

Στα πρόβατα, οι κριοί εμφανίζουν το χαμηλότερο ποσοστό οροθετικών ζώων και οι προβατίνες που απέβαλαν το υψηλότερο (Πίνακας 1). Ωστόσο, μεταξύ των ποσοστών οροθετικότητας των θηλυκών ζώων των δύο ομάδων δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p > 0.05$ ). Αντίθετα, το ποσοστό οροθετικότητας των αρσενικών ζώων εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση και με τις δύο κατηγορίες των θηλυκών ζώων ( $p < 0.05$ ).

Στις αίγες, το χαμηλότερο ποσοστό οροθετικών ζώων εμφανίζεται στην ομάδα των τράγων, ενώ το υψηλότερο, σε αυτή των θηλυκών που δεν εκδήλωσαν αποβολές (Πίνακας 2). Ωστόσο, μεταξύ των τριών ομάδων, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p > 0.05$ ). Οι αίγες, και στις τρεις ομάδες, εμφανίζουν σαφώς χαμηλότερα ποσοστά οροθετικών ζώων στο *T. gondii* σε σχέση με τα πρόβατα. Κατά τη σύγκριση ποσοστών των θετικών ζώων μεταξύ των ειδών



**Εικόνα 1.** Ποσοστό των αιγοπροβάτων βιολογικών εκτροφών που εμφάνισαν θετικό τίτλο αντισωμάτων κατά του *T. gondii*, κατά την προκαταρκτική έρευνα.



**Figure 1.** Prevalence of anti-*T. gondii* antibodies in sheep and goats (preliminary research).

parasite mentioned above. Considering the important role that *T. gondii* may have, further investigation was decided during the next reproductive period in organic farms. An important aspect is that from the animals tested, males comparing to females from each species, as long as goats comparing to sheep had lower proportion of seropositive animals, respectively. Taking into account publications all over the world (Innes 1997, Roberts et al. 2001) that refer to toxoplasmosis with difference in susceptibility among sexes and the host of the different species, the investigation in Greek sheep and goat farms proved to be very interesting.

The results of the basic research demonstrate that a

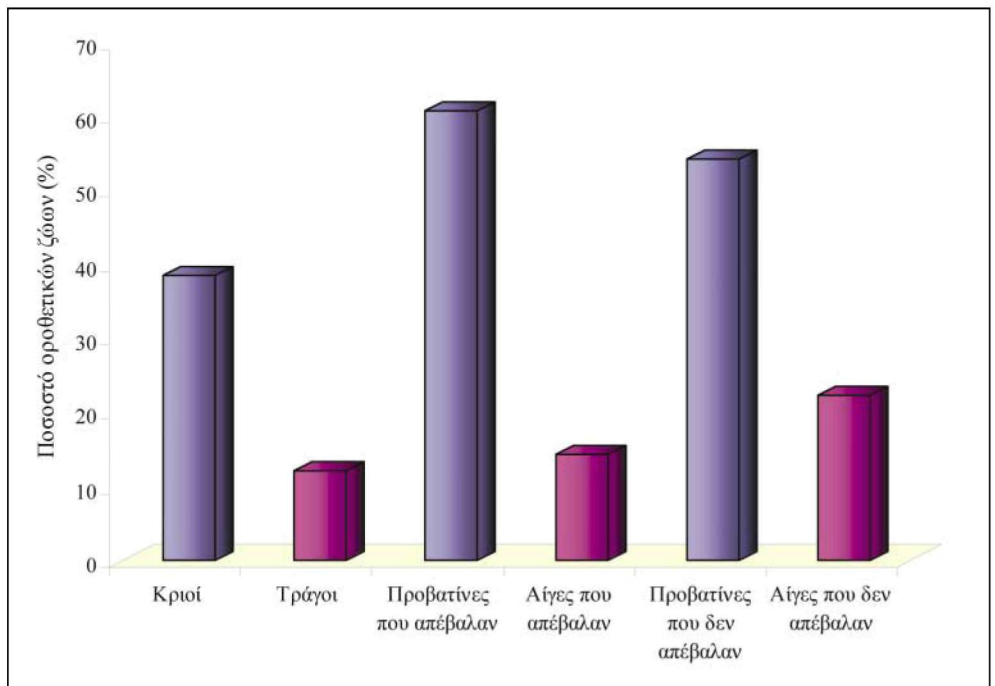
παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά και στις τρεις κατηγορίες ( $p < 0.05$ ).

Επιπλέον, με βάση τα στοιχεία της δειγματοληψίας, παρατηρείται διαχωρισμός των ζώων σε δύο ομάδες, ανάλογα με την ηλικία τους. Έτσι, το ποσοστό μόλυνσης στα πρόβατα κάτω των 4 ετών ήταν 39,58%, ενώ στα πρόβατα άνω των 4 ετών ήταν 61,97%. Αντίστοιχα, το ποσοστό μόλυνσης στις αίγες κάτω των 4 ετών ήταν 13,04%, ενώ στις αίγες άνω των 4 ετών ήταν 24% (Εικόνα 3). Το ποσοστό των ζώων που έχουν αντισώματα κατά του *T. gondii* αυξάνεται με την ηλικία και μάλιστα η αύξηση είναι στατιστικώς σημαντική, τόσο στα πρόβατα όσο και στις αίγες ( $p < 0.05$ ).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής έρευνας της παρούσας μελέτης έδειξαν για πρώτη φορά ότι σε βιολογικές εκτροφές αιγών και προβάτων της Ελλάδας (Πελοπόννησος και Δυτική Στερεά Ελλάδα) ένα σημαντικό ποσοστό ζώων έχει μολυνθεί με *T. gondii*. Η βιολογική κτηνοτροφία αποτελεί έναν αναπτυσσόμενο κλάδο με ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, οι εκτροφές αιγών και προβάτων κατέχουν το μεγαλύτερο μερίδιο συμμετοχής (79%) στο σύνολο των βιολογικώς εκτρεφόμενων ζώων, με τις αίγες να κατέχουν το 49% του συνόλου και τα πρόβατα το 30%, αντίστοιχα



Εικόνα 2. Ποσοστό των αιγών και των προβάτων από βιολογικές εκτροφές που εμφάνισαν θετικό τίτλο αντισωμάτων κατά του *T. gondii*, κατά την κύρια έρευνα.

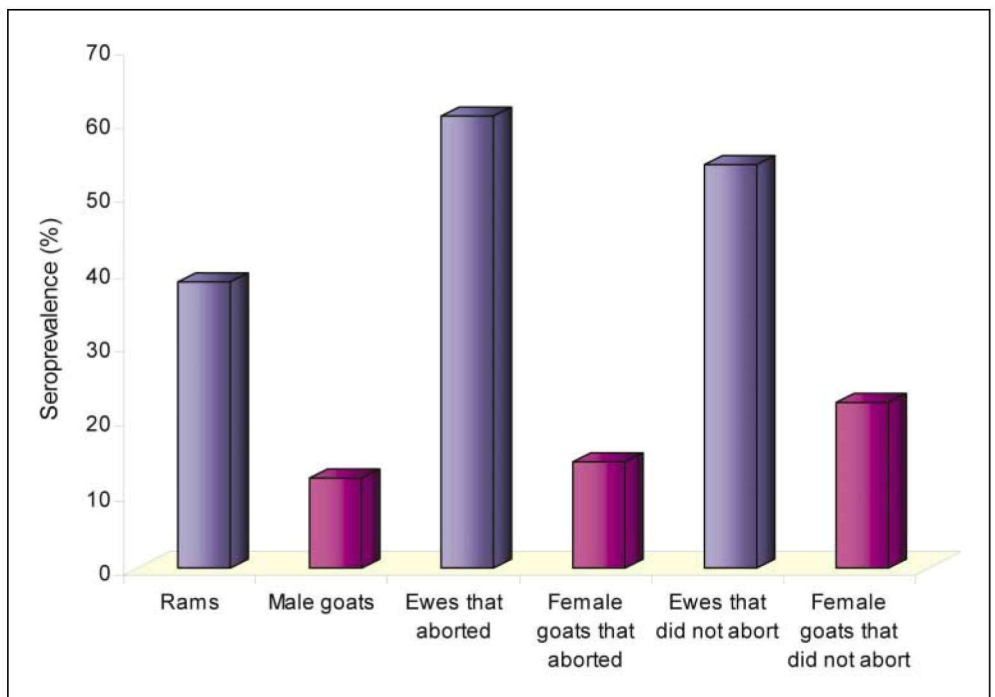


Figure 2. Prevalence of anti-*T. gondii* antibodies in sheep and goats of different categories (main research).

high proportion of the animals in western Greece (Peloponnese, Western Sterea Hellas and the county of Ioannina) have antibodies against *T. gondii*. This can be explained by the fact that on all farms, from which samples were taken, one or more cats were present. Sheep and goats, and generally all herbivores, infected



(Υπ. Αγρ. Ανάπτυξης & Τροφίμων, 2004). Έτσι, η διερεύνηση της τοξοπλάσμωσης σε βιολογικές εκτροφές αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον για λόγους οικονομικούς, δημόσιας υγείας και ευζωίας των ζώων.

Έντονο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι πολλά από τα ζώα στα οποία ανιχνεύθηκαν αντισώματα είχαν εμφανίσει αποβολές κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2004-2005, για τις οποίες ενδεχομένως να ήταν υπεύθυνο το συγκεκριμένο παράσιτο. Άξιο προσοχής, επίσης, είναι το γεγονός ότι από τα ζώα που εξετάστηκαν, τόσο τα αρσενικά σε σχέση με τα θηλυκά κάθε είδους όσο και οι αίγες σε σχέση με τα πρόβατα, εμφάνιζαν μικρότερο ποσοστό οροθετικότητας. Δεδομένου ότι έχουν γίνει αναφορές παγκοσμίως (Innes 1997, Roberts et al. 2001), οι οποίες σχετίζουν την τοξοπλάσμωση με διαφορετική ευπάθεια φύλου, αλλά και των ξενιστών των διαφόρων ειδών, θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί το κατά πόσο αυτό ισχύει και στις υπό μελέτη βιολογικές εκτροφές.

Από τα αποτελέσματα της κύριας έρευνας καταδεικνύεται ότι ένα σημαντικό ποσοστό των ζώων των συγκεκριμένων βιολογικών εκτροφών της Δυτικής Ελλάδας (Πελοπόννησος, Δυτική Στερεά Ελλάδα και Ν. Ιωαννίνων) είχε αντισώματα κατά του *T. gondii*. Αυτό πιθανόν να δικαιολογείται από το γεγονός ότι σχεδόν σε όλες τις εκτροφές, από τις οποίες έγινε η δειγματοληψία, υπήρχαν γάτες. Οι αίγες και τα πρόβατα, όπως και όλα τα φυτοφάγα ζώα, μολύνονται κυρίως από τις ωοκύστες που αποβάλλονται στο περιβάλλον με τα κόπρανα των γατών (Urquhart et al. 1996). Οι συγκεκριμένες γάτες είχαν πρόσβαση στους αποθηκευτικούς χώρους των ζωοτροφών και χρησιμοποιούνταν για την εξόντωση των τρωκτικών. Σε ελάχιστες περιπτώσεις οι γάτες δεν ανήκαν στην εκτροφή, υπήρχαν όμως στο ευρύτερο περιβάλλον και είχαν πρόσβαση στους αποθηκευτικούς χώρους των ζωοτροφών.

Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της κύριας έρευνας, η σύγκριση των ποσοστών των οροθετικών θηλυκών ζώων που απέβαλαν κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2005-2006 και των θηλυκών που δεν απέβαλαν κατά τη διάρκεια της ίδιας χρονικής περιόδου δεν εμφανίζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές, τόσο στα πρόβατα όσο και στις αίγες. Γίνεται, λοιπόν, κατανοητό ότι η τοξοπλάσμωση δεν σχετίζεται άμεσα με το σύνολο των αποβολών αυτών. Το νόσημα φαίνεται να έχει αποκτήσει ενζωτικό χαρακτήρα στις εκτροφές, με αποτέλεσμα να μην εκδηλώνεται με μαζικές αποβολές.

Όσον αφορά στην ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ φύλου και διαφορετικής ευπάθειας έναντι του *T. gondii*, φαίνεται ότι τα αρσενικά ζώα εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά οροθετικότητας συγκρινόμενα με τις δύο κα-

**Πίνακας 1.** Ποσοστά οροθετικών ζώων για αντισώματα κατά του *T. gondii* στις τρεις κατηγορίες προβάτων που εξετάστηκαν στην ELISA

Είδος	Κατηγορία	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων	Ποσοστό θετικών ζώων* (%)
Πρόβατα	Κριοί	52	20	38,46 <sup>a</sup>
	Προβατίνες που απέβαλαν	23	14	60,87 <sup>b</sup>
	Προβατίνες που δεν απέβαλαν	107	58	54,21 <sup>b</sup>

\*Τα ποσοστά με στατιστικώς σημαντική διαφορά σημειώνονται με διαφορετικούς εκθέτες ( $p < 0.05$ )

**Table 1.** Prevalence of anti- *T. gondii* antibodies in sheep detected using ELISA

Animal species	Category	Number sampled	Number positive	Sero-prevalence* (%)
Sheep	Rams	52	20	38,46 <sup>a</sup>
	Ewes that aborted	23	14	60,87 <sup>b</sup>
	Ewes that did not abort	107	58	54,21 <sup>b</sup>

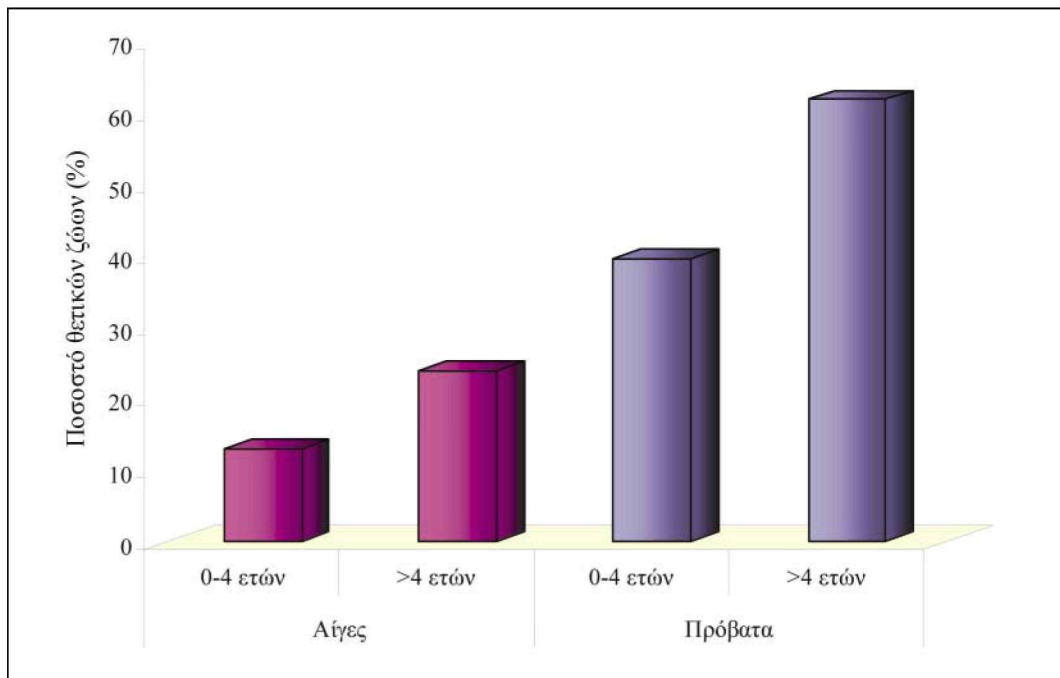
\* Different superscripts indicate statistic difference ( $p < 0.05$ )

**Πίνακας 2.** Ποσοστά οροθετικών ζώων για αντισώματα κατά του *T. gondii* ζώων στις τρεις κατηγορίες αγών που εξετάστηκαν στην ELISA

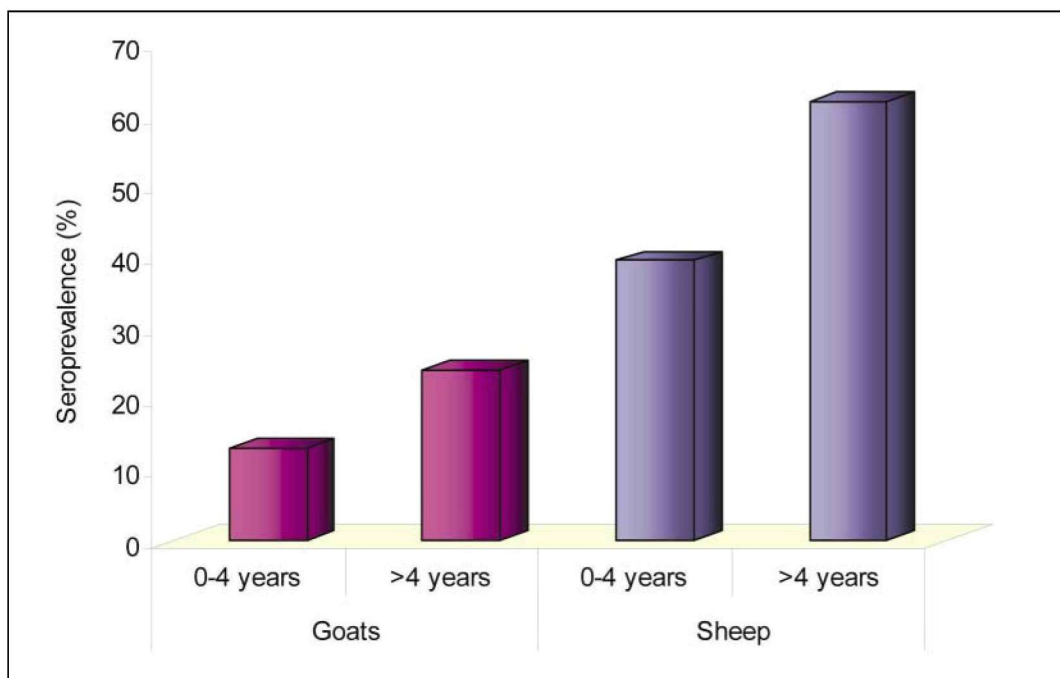
Είδος	Κατηγορία	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων	Ποσοστό θετικών ζώων (%)
Αίγες	Τράγοι	33	4	12,12
	Αίγες που απέβαλαν	49	7	14,29
	Αίγες που δεν απέβαλαν	85	19	22,35

**Table 2.** Prevalence of anti- *T. gondii* antibodies in goats detected by ELISA

Animal species	Category	Number sampled	Number positive	Sero-prevalence (%)
Goats	Male goats	33	4	12,12
	Female goats that aborted	49	7	14,29
	Female goats that did not abort	85	19	22,35



**Εικόνα 3.** Ποσοστό των αιγών και των προβάτων από βιολογικές εκτροφές που εμφάνισαν θετικό τίτλο αντισωμάτων κατά του *T. gondii*, σε διαφορετικές ηλικιακές κατηγορίες.



**Figure 3.** Prevalence of anti-*T. gondii* antibodies in sheep and goats of different age groups.

τηγορίες των θηλυκών και στα δύο είδη. Από τα δύο είδη των ζώων που μελετήθηκαν η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική μόνο στα πρόβατα. Σε διάφορες ερευνητικές εργασίες υποστηρίζεται ότι τα θηλυκά ζώα είναι πιο ευπρόσβλητα σε σχέση με τα αρσενικά, κυρίως λόγω του ορμονικού τους προτύπου (Van der

mostly with oocysts that excreted in the environment with cat faeces (Urquhart et al. 1996). Those cats had access to animal feedstuffs storage rooms and were used for the elimination of rodents. In few cases cats were not on the farm, although they were located in the overall area and had access to feedstuffs storage rooms.



Puije et al. 2000, Roberts et al. 2001). Αυτό αποδίδεται συγκεκριμένα στην επίδραση της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης, τόσο στη μη ειδική (Walker et al. 1997) όσο και στην ειδική ανοσία έναντι του *T. gondii* (Roberts et al. 1995). Αυτή, λοιπόν, η διαφορά των ποσοστών οροθετικότητας ενδεχομένως να μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα αρσενικά ζώα ανταποκρίνονται ανοσολογικά ισχυρότερα, σε σύγκριση με τα θηλυκά ζώα.

Από τα αποτελέσματα της κύριας έρευνας φαίνεται ότι οι αίγες εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά οροθετικών ζώων και στις τρεις κατηγορίες, σε σχέση με τα πρόβατα. Η διαφορά αυτή μάλιστα είναι και στατιστικά σημαντική. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε άλλες εργασίες (Tenter et al. 2000, Van der Puije et al. 2000). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική ευπάθεια που εμφανίζουν οι διάφοροι ενδιάμεσοι ξενιστές του *T. gondii*, λόγω της διαφοράς στη διάρκεια της επαφής τους με το παράσιτο στο πέρασμα των χρόνων. Κάποιοι ερευνητές θεωρούν πολύ πιθανόν η διαφορά στην ευπάθεια να σχετίζεται με την ταχύτητα παραγωγής IFN- $\gamma$  από τους ξενιστές. Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι αίγες είναι πιο ανθεκτικές σε σχέση με τα πρόβατα (Innes 1997) όσον αφορά στη μόλυνσή τους από το παράσιτο. Ενδεχομένως, λοιπόν, οι αίγες που εκτρέφονται στις συγκεκριμένες βιολογικές εκτροφές να εμφανίζονται πιο ανθεκτικές σε σχέση με τα πρόβατα. Κάποιοι άλλοι, ωστόσο, υποστηρίζουν ότι οι αίγες, κλινικά, παρουσιάζουν βαρύτερη εικόνα τοξοπλάσμωσης που μπορεί να απολήξει και σε θάνατο (Dubey 1989, Kaufmann 1996). Σε περίπτωση που αυτό ισχύει, η υψηλότερη θνησιμότητα των αιγών, σε σχέση με τα πρόβατα, είναι πιθανό να διατηρεί το ποσοστό των φρέων-οροθετικών ζώων σε χαμηλότερα επίπεδα.

Στα αποτελέσματα, τέλος, διαφαίνεται ότι το ποσοστό των ζώων που φέρουν αντισώματα έναντι του *T. gondii* αυξάνεται με την ηλικία, τόσο στις αίγες όσο και στα πρόβατα. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι με την αύξηση της ηλικίας ενός ζώου, αυξάνονται και οι πιθανότητες να έρθει σε επαφή με το παράσιτο. Δεδομένου δε ότι το *T. gondii* παραμένει στους ιστούς εφ' όρου ζωής (Esteban-Redondo and Innes 1997) και οι αίγες και τα πρόβατα που μολύνονται φέρουν αντισώματα συνήθως για μακρύ χρονικό διάστημα (Conde et al. 2001), θεωρείται επακόλουθο στις μεγαλύτερες ηλικίες να παρατηρούνται υψηλότερα ποσοστά οροθετικών ζώων. Με αυτά τα στοιχεία υποστηρίζεται η άποψη ότι το νόσημα έχει ενζωτικό χαρακτήρα στις συγκεκριμένες βιολογικές εκτροφές.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης επιβεβαιώνουν την παρουσία ει-

The results of the main research reveal that the comparison of the proportions of the seropositive female animals that had abortions during reproductive period 2005-2006 and the female that did not have abortions during the same reproductive period did not have significant differences both in sheep and goats. Thus, it can be concluded that toxoplasmosis is not related directly to the abortions. The disease seems to be enzootic among farms and for this reason it is not expressed with massive abortions. Evaluating the relation between animal sex and difference in susceptibility against *T. gondii*, males have lower proportion of seropositive animals compared to the results of the female animals in both species. Between the two different species tested, the results are significant only in sheep. Female animals are more susceptible compared to males, because of their hormone profile (Van der Puije et al. 2000, Roberts et al. 2001). This is due to the effect of estradiol and progesterone on non specific (Walker et al. 1997) and specific immunity against *T. gondii* (Roberts et al. 1995). The different proportions can be attributed to the fact that male animals have stronger immunological response compared to females.

Basic research suggests that goats have lower proportion of seropositive animals in all three categories compared to sheep and the difference is significant. Those results agree with the results mentioned in similar experiments (Tenter et al. 2000, Van der Puije et al. 2000). This can be explained due to difference in susceptibility among intermediate hosts of *T. gondii*. It is believed that the duration of host-parasite contact is responsible for this difference. Some scientists believe that different species susceptibility is related to how quickly the immune system can produce the key cytokine IFN $\gamma$ . Some scientists mention that goats are more resistant than sheep concerning infection of the parasite (Innes 1997). Goats that are reared on those organic farms seem to be more susceptible than sheep. However, some other researchers demonstrate that goats have more severe clinical symptoms of toxoplasmosis that can be result to death (Dubey 1989, Kaufmann 1996). If the above statement is correct, the higher mortality of goats compared to sheep may keep the proportion of seropositive animals at lower levels.

As a result, the proportion of animals that has antibodies against *T. gondii* increase with the age of both sheep and goats. This can be attributed to the fact that the increase in the age of the animal increases the possibility of the animal being infected by the parasite. Taking into consideration that toxoplasmosis is a chronic disease (Esteban-Redondo and Innes 1997) and



δικών αντισωμάτων κατά του *T. gondii* σε αίγες και πρόβατα βιολογικών εκτροφών της Δυτικής Ελλάδας. Καταδεικνύουν, επίσης, ότι το νόσημα στις εκτροφές αυτές έχει ενζωτικό χαρακτήρα, ενώ υποστηρίζουν την ύπαρξη διαφορετικής ευπάθειας μεταξύ αιγών και προβάτων, καθώς και μεταξύ των δύο φύλων. Κρίνεται σκόπιμο να γίνει περαιτέρω έρευνα, ώστε να διευκρινιστεί το ποσοστό των αιγών και των προβάτων που έχουν αντισώματα κατά του *T. gondii*, στο σύνολο των βιολογικών εκτροφών της Ελλάδας και να αποσαφηνιστεί η ύπαρξη της διαφορετικής ευπάθειας μεταξύ των δύο αυτών ειδών.

### Ευχαριστίες

Εκφράζονται ευχαριστίες στο Ινστιτούτο Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu στο Bilthoven της Ολλανδίας για την παραχώρηση του αντιγόνου *T. gondii*. Ευχαριστούμε, επίσης, τους κτηνοτρόφους που συμμετείχαν στην έρευνα για τη συνεργασία τους. □

sheep and goats that are infected have antibodies for a long lasting period (Conde et al. 2001), it is expected that older animals have higher proportions of seropositive individuals. It can also be noted that the number of reported cases in those organic farms is high enough to conclude that the disease is enzootic.

In conclusion, the results of the present research justify the presence of IgG antibodies against *T. gondii* on organic sheep and goat farms in Western Greece. It also demonstrates that the disease on those farms is enzootic, while there is different susceptibility between goat and sheep and between sexes. Further research is needed to clarify the proportion of sheep and goats that have antibodies against *T. gondii* in the total number of organic farms in Greece and also to reveal the different susceptibility among those species.

### Acknowledgments

Special thanks to the Institute Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu in Bilthoven, Holland, for the *T. gondii* antigen grant. Also, special thanks to the farmers that cooperated for the present study. □

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Bowman DD (1999) Protozoans. In: Georhis' Parasitology for Veterinarians. 7th ed, W.B. Saunders Company,: 96-98.
- Buxton D, Rodger SM, Maley SW, Wright SE (2006) Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. *Sm Rum Res*, 62:43-46.
- Conde M, Molina Caballero JM, Rodriguez-Ponce E, Ruiz A, Gonzalez J (2001) Analysis of IgG response to experimental infection with RH *Toxoplasma gondii* in goats. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 24:197-206.
- Diakou A, Papadopoulos E, Panousis N, Giadinis N, Karatzias C (2005a) Prevalence of *Toxoplasma Gondii* in sheep and goats in mixed stockfarmings. 4<sup>th</sup> Hellenic Congress in Farm Animals Veterinary Medicine, Thessaloniki, Greece, Book of abstracts pg 98.
- Diakou A, Papadopoulos E, Panousis N, Giadinis N, Karatzias C (2005b) *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. infection in sheep and goats mixed stock farming. 6<sup>th</sup> International Sheep Veterinary Congress, Hersonissos, Crete, Greece, Proceedings pg 170.
- Dubey JP (1989) Lesions in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet Parasitol*, 32:133-144.
- Dubey JP (2002) A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet Parasitol*, 106:121-153.
- Dubey JP, Zarnke R, Thomas NJ, Wong SK, Van Bonn W, Briggs M, Davis JW, Ewing R, Mense M, Kwok OCH, Romand S, Thulliez P (2003) *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet Parasitol*, 116:275-296.
- Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G (2001) High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in commercial sheep flock. *Int J Parasitol*, 31:1699-1703.
- Esteban-Redondo I, Innes EA (1997) *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 20 (No 2):191-196.
- Esteban-Redondo I, Maley SW, Thomson K, Nicoll S, Wright S, Buxton D, Innes EA (1999) Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet Parasitol*, 86:155-171.
- Greek Ministry of Agriculture (2004) <http://www.minagric.gr/greek/data/B.%20Γ&K%202004.doc>
- Haralabidis STh (1984) The immunodiagnosis of the parasitic diseases and the immunoenzyme assay ELISA. Monography. Scientific Yearbook of the Veterinary Faculty of the Aristotle University of Thessaloniki, 22:75-253.
- Haralabidis STh (1987) Seroepidemiology of parasitic diseases of sheep and goats by means of ELISA. *Bull Hell Vet Med Soc*, 38:215-223.
- Haralabidis STh (1995) *Toxoplasma*. In: Protozoology. 1st ed, University Studio Press, Thessaloniki;72-76.
- Innes EA (1997) Toxoplasmosis: Comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immun Microbiol Effect Dis*, 20 (No 2):131-138.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (1993) The Female Genital System. In: Pathology of domestic animals. Vol.3, 4th ed, Academic Press, Inc, USA.;421-423.
- Kaufmann J (1996) Parasites of sheep and goats. In: Parasitic infections of domestic animals. 1st ed, Birkhauser,:176.
- Kontos V, Boutsini S, Haralabidis S, Diakou A, Athanasiou L, Magana O, Nomikou K (2001) Ovine Toxoplasmosis. An Epizootiological Research. 3rd Hellenic Symposium in Farm Veterinary Medicine, Thessaloniki, Greece, Book of abstracts pg 81.
- Martinez-Garcia F, Regadera J, Mayer R, Sanchez S, Nistal M (1996) Protozoan infections in the male genital track. *J Urol*, 156:340-349.



- Mikaelian I, Boisclair J, Dubey JP, Kennedy S, Martineau D (2000) Toxoplasmosis in Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence Estuary: Two case reports and a serological survey. J Comp Path, 122:73-76.
- Powell CC, Brewer M, Lappin MR (2001) Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. Vet Parasitol, 102:29-33.
- Roberts CW, Cruickshank SM, Alexander J (1995) Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. Infect Immun, 63 (No 7): 2549-2555.
- Roberts CW, Walker W, Alexander J (2001) Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. Clin Microbiol Rev, 14 (No 3):476-488.
- Stefanakis A, Bizaki A, Krampovitis E (1995) Seroprevalence of toxoplasmosis in the sheep and goats of Crete. Bull Hell Vet Med Soc, 46 (4):243-249.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol, 30: 1217-1258.
- Urquhart GM, Armour J, Dunkan JL, Dunn AM, Jennings FW (1996) *Veterinary Protozoology*. In: *Veterinary Parasitology*. 2nd ed, Blackwell Science Ltd.;96-98.
- Van der Puije WNA, Bosompem KM, Canacoo EA, Wastling JM, Acanmori BD (2000) The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. Acta Trop, 76:21-26.
- Walker W, Roberts CW, Ferguson DJP, Jebbari H, Alexander J (1997) Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in Interleukin-12 and Gamma Interferon production. Infect Immun, 65 (No 3):1119-1121.