

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO” - UNESP - CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETECÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* EM LINGÜIÇAS  
SUÍNAS TIPO FRESCAL, COMERCIALIZADAS NO  
MUNICÍPIO DE BOTUCATU-SP

André de Oliveira Mendonça

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Estadual Paulista, Campus de  
Botucatu, para concorrer ao título de Mestre,  
pelo curso de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, Área de Concentração: Vigilância  
Sanitária.

Botucatu-SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Mendonça, André de Oliveira.

Detecção de *Toxoplasma gondii* em lingüiças suínas tipo frescal, comercializadas no município de Botucatu-SP / André de Oliveira Mendonça. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: Paulo Francisco Domingues

Co-orientador: Helio Langoni

Assunto CAPES: 50505009

1. *Toxoplasma gondii* - Isolamento 2. Saúde Pública

CDD 616.94

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Lingüiça; PCR; Isolamento

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

André de Oliveira Mendonça

**Detecção de *Toxoplasma gondii* em lingüiças suínas  
tipo frescal, comercializadas no município de  
Botucatu - SP**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em  
Medicina Veterinária, Área de Concentração em Vigilância  
Sanitária, para obtenção do título de Mestre

**Orientador: Prof. Ass. Dr. Paulo Francisco Domingues**

**Co-orientador: Prof. Adj. Helio Langoni**

Botucatu - SP

2003

*Ao Criador do Universo, Rei da Glória,  
Senhor dos Senhores, meu Pai e Salvador  
amado. A Ele toda honra, glória e louvor.*

## AGRADECIMENTOS

A meus pais e irmãos, que não mediram esforços para me ofertar o bem maior da humanidade: formação moral, espiritual e intelectual.

À minha noiva Karen pelo amor, carinho e amizade eternos.

Ao mestre e amigo Helio Langoni, maior incentivador da minha carreira acadêmica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo F. Domingues, pela atenção e dedicação em todas as etapas deste trabalho.

Ao amigo Aristeu V. da Silva, pelas muitas contribuições e aconselhamentos técnicos.

Ao amigo Fábio H. Shimabukuro, pelo companheirismo e auxílio na coleta das amostras.

Ao amigo Hediéferson dos Santos, pelo companheirismo e auxílio na execução do experimento.

À amiga Érika M. Tanaka, pela disposição constante em ajudar em tudo que fosse necessário.

Aos residentes, pós-graduandos, funcionários e docentes do departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, pelos anos de trabalho, estudo e amizade.

À FAPESP e à FUNDUNESP pela concessão de auxílio financeiro para a execução do experimento (processos FAPESP 01/10275-0 e FUNDUNESP 427/2001).

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
3. OBJETIVO .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
A. Colheita das amostras .....	12
B. Isolamento em camundongos .....	12
C. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....	14
D. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) .....	15
E. Análise Estatística .....	17
5. RESULTADOS .....	22
6. DISCUSSÃO .....	29
7. CONCLUSÕES .....	32
8. REFERÊNCIAS .....	33
9. ABSTRACT .....	41

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Pesagem das amostras de linguiça para pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> . Botucatu-SP, 2003 .....	18
FIGURA 2. Trituração e diluição da amostra de linguiça em PBS pH 7,2. Botucatu-SP, 2003 .....	18
FIGURA 3. Filtragem da amostra de linguiça diluída em PBS pH 7,2 para posterior centrifugação. Botucatu-SP, 2003 .....	19
FIGURA 4. Pepsinização de uma amostra de linguiça em agitador magnético. Botucatu-SP, 2003 .....	19
FIGURA 5. Inoculação de uma amostra de linguiça pepsinizada em camundongo, pela via subcutânea, para isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> . Botucatu-SP, 2003 .....	20
FIGURA 6. Local onde os camundongos inoculados eram mantidos em observação pelo período de 30 dias. Botucatu-SP, 2003 .....	20
FIGURA 7. Coleta de sangue para exame sorológico após período de observação. Botucatu-SP, 2003 .....	21
FIGURA 8. Termociclador utilizado para a amplificação do DNA do <i>Toxoplasma gondii</i> . Botucatu-SP, 2003 .....	21
FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose após Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de linguiça suína frescal. Botucatu-SP, 2003 .....	27
FIGURA 10. Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de linguiça suína frescal pela técnica de PCR em amostras digeridas e não digeridas pela pepsina. Botucatu-SP, 2003 .....	28
FIGURA 11. Distribuição das amostras de linguiça positivas para presença de <i>T. gondii</i> , pela técnica de PCR, de acordo com o tratamento das mesmas. Botucatu-SP, 2003 .....	28

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resultados da bioprova em camundongos para detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de linguiça suína frescal. Botucatu-SP, 2003 .....	23
TABELA 2. Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de linguiça suína frescal pela técnica de PCR, segundo o tratamento da amostra. Botucatu-SP, 2003 .....	24
TABELA 3. Comparação do número de amostras positivas e negativas para a detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de linguiça suína frescal pela técnica de PCR, segundo o tratamento das mesmas. Botucatu-SP, 2003 .....	25
TABELA 4. Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de linguiça suína frescal pela técnica de PCR, de acordo com o estabelecimento em que foram coletadas. Botucatu-SP, 2003 .....	25
TABELA 5. Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de linguiça suína frescal pela técnica de PCR, em estabelecimentos em que foram coletadas duas amostras em épocas diferentes. Botucatu-SP, 2003 .....	26



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- – Negativo	mmol – milimol
+ – Positivo	NaCl – Cloreto de Sódio
% – Porcentagem	nm – nanômetro
° – Graus	NUPEZO – Núcleo de Pesquisas em Zoonoses
°C – Graus Centígrados	p – valor de probabilidade
µl – Microlitros	PBS – Solução Salina Tamponada de Fosfatos
$\chi^2$ – Qui-quadrado	PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase
$\kappa$ – Índice Kappa	pH – Potencial hidrogeniônico
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	pmol – picomol
DNA – Ácido desoxiribonucléico	PR – Paraná
EDTA – Ácido etileno diaminotetracético	RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorfisms”
ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”	RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo	RNA – Ácido ribonucléico
FUNDUNESP – Fundação para o Desenvolvimento da UNESP	rpm – Rotações por minuto
g – grama	RS – Rio Grande do Sul
G – Gravidade	SDS – Sódio-duodecil-sulfato
GO – Goiás	SP – São Paulo
HAI – Hemaglutinação Indireta	Tris – tris (hidroximetil) aminometano
HCl – Ácido Clorídrico	Tris-HCl – tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto
IgG – Imunoglobulina da classe G	U – Unidade
IgM – Imunoglobulina da classe M	UI – Unidade Internacional
KCl – Cloreto de Potássio	UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
M – Molar	
mg – miligramas	
MG – Minas Gerais	
MgCl <sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio	
ml – mililitros	

## RESUMO

Estudou-se a ocorrência do protozoário *Toxoplasma gondii* em 70 amostras de linguiças suínas tipo frescal, comercializadas no município de Botucatu-SP, a fim de avaliar a participação deste alimento na cadeia epidemiológica da toxoplasmose. Para tanto, utilizou-se a técnica de isolamento do agente em camundongos e a amplificação do material genético pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Esta última foi realizada com amostras digeridas e não digeridas pela pepsina. Não se isolou o parasita de nenhuma amostra estudada, entretanto, 33 amostras (47,14%) apresentaram resultado positivo à PCR. Para as amostras submetidas à digestão péptica, 21 (30,0%) mostraram-se positivas e para aquelas que não sofreram este tratamento, 25 (35,71%) reagiram positivamente. Não houve diferença significativa entre os dois tratamentos. Os resultados obtidos indicam que a linguiça suína frescal provavelmente tem pouca importância como fonte de infecção para a toxoplasmose humana, na região estudada. No entanto, o elevado índice de amostras positivas na reação de PCR demonstra que o parasita pode estar presente, porém é inviabilizado pela ação do sal adicionado ao tempero das linguiças.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma*, linguiça, PCR, isolamento.

## 1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose parasitária de ampla distribuição mundial, podendo causar sintomatologia clínica na espécie humana, especialmente em gestantes primoinfectadas e em pacientes imunodeprimidos.

A espécie suína tem uma participação muito importante na cadeia epidemiológica da doença, visto que a carne suína crua ou mal cozida é uma das principais fontes de infecção do *Toxoplasma gondii* para o homem.

A dificuldade no controle das populações de felinos e roedores nas granjas suínas favorece a disseminação do parasita. Os suínos infectam-se principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados ou pelo canibalismo e ingestão de roedores, práticas comuns nesta espécie.

A linguiça frescal suína é um alimento tradicional em nosso meio e o estudo do grau de contaminação deste alimento pelo *T. gondii* visa esclarecer sua participação na cadeia epidemiológica da toxoplasmose humana.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A toxoplasmose é uma infecção, algumas vezes doença, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909), sendo os felinos domésticos e silvestres os hospedeiros definitivos e o homem, outros mamíferos e aves os hospedeiros intermediários do agente (Frenkel, 1996).

Os felinos excretam oocistos de *T. gondii* nas fezes. Um a cinco dias depois estes oocistos esporulam, tornando-se infectantes para o homem e outros animais. Após a ingestão dos oocistos esporulados ocorre a liberação de oito esporozoítos, os quais se multiplicam nas células intestinais e de linfonodos associados, formando os taquizoítos, que são as formas de multiplicação rápida do *T. gondii*. Os taquizoítos se distribuem por todo o organismo e encistam-se em diversos tecidos, tais como cérebro, fígado, musculatura cardíaca e esquelética, formando os bradizoítos, que são as formas de multiplicação lenta (Dubey, 1994). Desta forma, o homem e os animais podem infectar-se das seguintes maneiras: pela ingestão de oocistos em água e alimentos contaminados, pela ingestão de bradizoítos em carne crua ou mal cozida ou pela transmissão de taquizoítos pela via transplacentária, transfusão de leucócitos, transplante de órgãos, ingestão de leite caprino não pasteurizado ou em acidentes laboratoriais (Dubey & Beattie, 1988; Tenter, 1998).

A toxoplasmose humana encontra-se amplamente distribuída no mundo, com taxas de infecção variando de 0 a 100% (Tenter et al., 2000). No Brasil, estudos indicam índices de soropositividade de até 81% (Dubey & Beattie, 1988). Cantos et al. (2000) estudaram a prevalência de indivíduos soropositivos, detectando 41,91% de soropositividade para anticorpos anti-*T. gondii* da classe

IgG e 0,87% para IgM, dentre 2.994 pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Em estudo semelhante, Reiche et al. (2000), encontraram uma prevalência de 67,0% de soros positivos, dentre 1.559 amostras séricas de gestantes atendidas no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina. Neste mesmo estudo, 1,8% das amostras mostravam-se positivas para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgM. Mais recentemente, Giraldi et al. (2002), obtiveram 42,4% (184/343) de positividade (anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG), em estudo realizado com estudantes da primeira à quarta série do ensino fundamental da rede municipal de ensino de Rolândia-PR.

A infecção divide-se basicamente em primária ou pós-natal e secundária ou congênita. No primeiro caso, as manifestações clínicas são raras em pessoas imunocompetentes, sendo a retinocoroidite uma das principais. O Estado do Rio Grande do Sul tem apresentado elevados índices de toxoplasmose ocular em pacientes imunocompetentes. Em estudo realizado no município de Erechim-RS, 17,7% (184/1.042) dos indivíduos amostrados apresentaram toxoplasmose ocular (Glasner et al., 1992).

Por outro lado, em indivíduos que utilizam drogas imunossupressoras, aidéticos ou imunodeprimidos por outras causas, a infecção por *T. gondii* provoca frequentemente sérias complicações, sendo a encefalite a manifestação clínica predominante. Estima-se que, no mundo, a encefalite por *T. gondii* acomete 40% dos pacientes aidéticos (Tenter et al., 2000). Este percentual chega a 50% na Europa e África (Luft & Remington, 1992). De acordo com trabalho publicado por Guimarães (2000), foram notificados 157.775 casos de AIDS no Brasil, entre os anos de 1980 e 1999. Destes pacientes, 24.068 (15,3%) desenvolveram neurotoxoplasmose. A taxa de mortalidade aguda devido à neurotoxoplasmose em pacientes aidéticos atendidos em São Paulo, foi de 25,4% (18/71), no período de 1988 a 1991 (Passos et al., 2000).

A infecção secundária ou congênita ocorre quando a mulher se infecta pela primeira vez durante a gravidez, podendo ocorrer aborto ou nascimento de

crianças com encefalomielite, sendo que as consequências para o feto são mais graves quando a infecção ocorre nos primeiros meses da gestação (Dubey & Beattie, 1988; Luft & Remington, 1992). Estima-se que 2% das infecções congênitas levem à morte da criança e em 11% dos casos ocorre doença severa, ocasionando principalmente cegueira e/ou retardo mental (Roberts & Frenkel, 1990).

Guimarães et al. (1993) estimaram uma prevalência de 0,8 casos de toxoplasmose congênita para cada 1.000 nascimentos na região metropolitana de São Paulo, o que representa 280 novos casos por ano. Mais recentemente, Neto et al. (2000), trabalhando com 140.914 amostras de soros de recém-nascidos oriundas de diferentes regiões do Brasil, estimaram uma prevalência de um caso de toxoplasmose congênita para cada 3.000 nascimentos. Em 17% dos casos houve manifestação clínica da doença, representada por calcificação intracraniana, lesões de retina, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia.

Mead et al. (1999), calcularam que, nos Estados Unidos, ocorrem aproximadamente 1.500.000 novas infecções agudas por ano, sendo 15% delas assintomáticas. Afirmam ainda que 12.100 pessoas por ano desenvolvem sequelas crônicas devido à toxoplasmose. Segundo estes autores 50% das infecções são adquiridas pela ingestão de alimentos contaminados.

A carne suína representa uma das principais fontes de infecção de *T. gondii* para o homem, sendo que dentre os animais de produção destinados ao consumo humano, os suínos são os mais importantes na transmissão da toxoplasmose (Dubey, 1994; Gamble & Murrel, 1998; Tenter, 1998). Farrel et al. (1952) foram os primeiros a descrever a infecção nesta espécie. Desde então, muitos estudos têm revelado uma elevada prevalência da toxoplasmose em suínos, em diversas partes do mundo. Nos Estados Unidos, a prevalência da infecção por *T. gondii* nos suínos foi, em média, de 23,9%, chegando a 42% em criações não comerciais, segundo estudo realizado por Dubey et al. (1991). No Canadá, obteve-se um índice de 3,5% a 13,2% de animais soropositivos em diferentes regiões do país (Gajadhar et al., 1998). Pesquisas realizadas recentemente no Zimbábue,

Gana e Peru, revelaram uma prevalência de 9,3%, 39,0% e 32,3% de animais soropositivos, respectivamente (Hove & Dubey, 1999; Arko-Mensah et al., 2000; Suárez-Aranda et al., 2000).

O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo, com um rebanho de aproximadamente 38 milhões de cabeças. A população brasileira consumiu, em média, 11,3Kg de carne suína no ano de 2001 (Abipecs, 2001). A atividade suinícola brasileira pode ser dividida em dois tipos de criação, a saber, tradicional e de animais tipo carne. A primeira é constituída por raças nativas e de baixo desempenho zootécnico, situada principalmente acima da região Sudeste. A segunda utiliza-se de alta tecnologia e está situada nas regiões Sul e Sudeste do país. De uma forma geral, a suinocultura no Brasil é uma atividade predominantemente praticada em pequenas propriedades rurais, sendo que, cerca de 82% dos suínos são criados em unidades de até 100 hectares. (Silva et al., 1998).

No Brasil, a toxoplasmose suína foi diagnosticada pela primeira vez por Da Silva (1959). Estudos realizados entre os anos de 1972 e 1984, revelaram as seguintes prevalências de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos: 22% a 67% em São Paulo; 30% a 33% em Belo Horizonte; 11% a 50% no Rio Grande do Sul; 47% em Jaboticabal (Dubey, 1986).

D'Angelino (1983), estudou a prevalência de animais soropositivos oriundos de duas propriedades rurais do município de Pirassununga-SP, sendo uma de criação intensiva e outra semi-intensiva. Na primeira, 54% dos animais mostraram-se positivos para a prova de HAI e 46,6% para a RIFI. Na segunda, 49,2% e 42,7% apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* para as provas de HAI e RIFI, respectivamente.

Em estudo realizado por Wentz et al. (1986), na região de Santa Catarina, apenas 1,16% (12/1033) das amostras de soro de suínos oriundos de 61 propriedades apresentaram títulos de anticorpos anti-*T. gondii* iguais ou superiores a 64.

Vidotto et al. (1990) obtiveram prevalência de 37,84% de suínos soropositivos, de um total de 1.131 amostras colhidas de 12 granjas da região de Londrina-PR. Araujo et al. (1998), trabalhando com animais nas fases de crescimento e terminação de pequenas propriedades da região do Grande Erechim-RS, detectaram 9,4% de soropositivos, e em 792 amostras de sangue coletadas em abatedouros da mesma área, obtiveram 9,5% de positividade. Em estudo realizado com amostras de soro de matrizes oriundas de sete municípios do Estado de São Paulo, 29,72% (74/249) mostraram-se positivas para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* (Barci et al., 1998). Matos et al. (1999), detectaram a presença de suínos soropositivos em 95% de 40 granjas localizadas próximas ao município de Goiânia-GO, com índice de positividade de, em média, 27,74%, de um total de 829 amostras testadas.

Silva et al. (1999a) examinaram 223 amostras de soro de suínos procedentes de 65 propriedades dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, obtendo uma soroprevalência de 12,69%, 10,00% e 26,66%, respectivamente. Trabalhando com 115 amostras de soro coletadas de 13 criações extensivas nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Silva et al. (1999b), detectaram um índice de 86,08% de soropositivos. Garcia et al. (1999) determinaram a prevalência da toxoplasmose em 267 amostras de suínos provenientes de 31 propriedades do município de Jaguapitã, norte do Estado do Paraná, sendo 24% delas positivas. Suárez-Aranda et al. (2000), estudaram a prevalência da infecção por *T. gondii* em 300 amostras de soro de suínos, colhidas em abatedouros de São Paulo, encontrando 9,6% de animais positivos.

Caporali et al. (2002), pesquisaram a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de suínos provenientes da região de Botucatu-SP e do Estado do Pernambuco. Das 759 amostras examinadas, 10 (1,32%) mostraram-se positivas.

A detecção de *T. gondii* em amostras de carne destinadas ao consumo humano é fundamental para o conhecimento do grau de risco desta fonte de infecção para o homem, visto que o estudo soroepidemiológico em rebanhos suínos é insuficiente para determinar a importância da espécie na cadeia



epidemiológica, pois animais soropositivos não são necessariamente potenciais transmissores do agente para o homem (Dubey et al., 1995). Entretanto, poucos são os trabalhos que visam o isolamento do agente na carne suína, seja a nível de abatedouro ou em alimentos prontos para o consumo.

Jamra et al. (1969) pesquisaram a presença de *T. gondii* em 292 amostras de carne, víscera e ovos, comercializados no município de São Paulo, obtendo um percentual de 6,8% de isolamento das amostras de carne suína. Amaral & Macruz (1969) isolaram o *T. gondii* em oito amostras de diafragma de suínos abatidos em São Paulo, dentre as 25 estudadas. Schenk et al. (1977) pesquisaram a presença de *T. gondii* em 159 amostras de diafragma e 98 de cérebros suínos abatidos em Belo Horizonte-MG, sendo 15 (5,8%) delas positivas à bioprova em camundongos. Navarro et al. (1992a) coletaram 117 amostras de músculo e 36 de cérebro suíno em açougues no município de Londrina-PR, sendo que 23 amostras de carne (19,66%) e 8 (22,22%) de cérebro mostraram-se positivas ao isolamento em camundongos. Mais recentemente, Chaves et al. (1998) isolaram três cepas de *T. gondii* a partir do estudo de 38 amostras de produtos cárneos suínos, coletados em açougues na Costa Rica.

Com relação à pesquisa de *T. gondii* em linguiças de origem suína, Martins et al. (1989) isolaram o agente de uma amostra dentre as 40 estudadas, no município de Erechim-RS. Devido ao baixo índice de isolamento obtido neste estudo, Jamra et al. (1991) estudaram os efeitos do sal de cozinha sobre a viabilidade do *T. gondii*, concluindo que o sal inativa o parasita quando aplicado na concentração de 3,0% por, no mínimo, três dias. Em estudo semelhante, Navarro et al. (1992b) concluíram que concentrações de 2,0% e 2,5% de sal adicionado aos condimentos inviabilizam o parasita a partir de 48 horas após sua utilização para o tempero da linguiça suína. Venkatachalam & Zimmerman (1976) inocularam 18 suínos com *T. gondii* e estudaram a viabilidade do parasita em diferentes tipos de alimentos preparados com a carne destes animais. O parasita não foi reisolado a partir da linguiça, presunto e bacon. Os autores concluíram que os parasitas foram inativados pela ação do sal, nitritos e nitratos, visto que o

parasita estava viável em outros tipos de alimentos que sofreram processamento térmico superior a estes.

A PCR é uma técnica de biologia molecular, utilizada pela primeira vez em medicina veterinária para o diagnóstico da toxoplasmose por Savva & Holliman (1989). Estes autores amplificaram uma sequência de 915 pares de bases nitrogenadas, correspondente a uma fração do gene SAG1, que codifica uma proteína de membrana dos taquizoítos (P30), e que possui uma cópia no genoma do *T. gondii*. Segundo os autores após duas ampliações ou uma amplificação seguida de hibridização é possível detectar até um parasita por amostra. Posteriormente, Cazenave et al. (1991) utilizaram uma sequência de 88 pares de bases pertencente ao gene que codifica para RNA ribossomal (rDNA), que possui 110 cópias no genoma do *T. gondii*, para o diagnóstico da toxoplasmose congênita humana. Segundo os autores esta técnica é capaz de detectar até um parasita em solução tamponada e menos de cinco em amostras clínicas, sem necessidade de hibridização. A PCR mostrou-se superior ao isolamento em cultura de células e ao exame direto do sangue fetal. O autor sugeriu uma coamplificação utilizando as duas sequências de oligonucleotídeos (que codificam a proteína P30 e rDNA) para obtenção de um teste altamente sensível e específico.

Stiles et al. (1996) inocularam taquizoítos em amostras de humor aquoso, líquido, soro e sangue de cães e gatos para posterior execução da PCR. Neste experimento amplificou-se uma sequência de 501 pares de bases nitrogenadas pertencentes ao gene B1, que possui 35 cópias no genoma do *T. gondii*. Os resultados indicaram que a PCR foi capaz de detectar até 10 parasitas no humor aquoso, líquido e soro e até 100 parasitas no sangue.

Wyss et al. (2000) estudaram a prevalência da infecção por *T. gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos abatidos na Suíça, utilizando a PCR e o ELISA. Os resultados indicaram uma prevalência muito maior de amostras positivas para o ELISA, em relação à PCR.

Da Silva & Langoni (2001) compararam os resultados da PCR com o isolamento em camundongos em 40 amostras de diafragma e cérebro de ovinos

sorologicamente positivos. A PCR foi dirigida para detecção de uma sequência de 300 pares de bases nitrogenadas do gene B1. Das 40 amostras, 34 (85,0%) foram positivas para o isolamento e 15 (37,5%) para a PCR, mostrando que o primeiro método foi significativamente superior ao segundo para o diagnóstico da toxoplasmose em ovinos.

Warnekulasuriya et al. (1998) utilizaram os métodos de PCR (com primers para amplificação do gene SAG 1) e isolamento em cultivo celular para a detecção de *T. gondii* em 67 amostras de linguiça e presunto cozido coletadas em Londres. Apenas uma amostra de presunto foi considerada positiva para ambas as técnicas. A avaliação da sensibilidade das técnicas revelou que, o isolamento em cultura celular seria capaz de detectar até 1.000 taquizoítos/g e a de PCR até 5.000 taquizoítos/g. Os autores atribuíram a baixa sensibilidade de ambas as técnicas devido às altas concentrações de sal dos alimentos, que levaria a um efeito citopático indesejável às células e à inibição da enzima DNA polimerase.

Aspinall et al. (2002) pesquisaram a presença de *T. gondii* em 71 amostras de carne, sendo 57 delas de origem suína, oriundas de açougues no Reino Unido, pela técnica de PCR (amplificando o gene SAG 2). Do total das amostras, 38,0% mostraram-se positivas, sendo que dentre as de origem suína, 19 (33,33%) estavam infectadas com o parasita.

Utilizando a técnica de RFLP, Howe & Sibley (1995) analisaram 106 cepas de *T. gondii* isoladas de humanos e animais, identificando três grupos geneticamente similares, aos quais os autores denominaram de genótipos I, II e III. De uma forma geral, a toxoplasmose humana esteve associada principalmente às cepas do tipo II (mais de 70,0% dos casos), enquanto que as do tipo III foram as mais comuns nos animais. As cepas do tipo I mostraram-se altamente virulentas em camundongos e estiveram mais comumente associadas à toxoplasmose humana congênita, enquanto as do tipo II foram responsáveis por 65,0% dos casos de toxoplasmose em pacientes aids. No entanto, todas as três linhagens foram detectadas em uma variedade de hospedeiros, oriundos de diferentes regiões da América do Norte e Europa.

Mondragon et al. (1998) determinaram o genótipo de 43 cepas de *T. gondii* isoladas do coração de suínos adultos abatidos na região de Iowa, Estados Unidos. O tipo II foi o mais frequente (83,7%), seguido do tipo III (16,3%). Nenhuma cepa foi classificada dentro do genótipo I. Em contrapartida, Aspinall et al. (2002), determinaram o genótipo de 27 cepas isoladas a partir de amostras de alimentos comercializados no Reino Unido, sendo 19 de origem suína, seis de origem ovina, uma de origem bovina e uma de origem bovina e suína. Dentre as cepas estudadas, 21 (77,78%) foram classificadas dentro do tipo I e as demais eram mistas, ou seja, as amostras possuíam parasitas do tipo I e do tipo II. Nenhuma cepa foi classificada como tipo III.

A literatura nacional é escassa em trabalhos que relatam a utilização da PCR para a detecção de *T. gondii* em carne suína. Em um dos poucos trabalhos publicados, estudou-se a taxa de reisolamento do *T. gondii* a partir de tecidos de suínos inoculados oralmente com oocistos, pelas técnicas de bioensaio em camundongos e PCR. A primeira foi capaz de detectar o parasita em 50,0% das amostras e a segunda em 62,5%. O limiar de detecção do parasita pela técnica de PCR foi de 10 taquizoítos/ml de suspensão de cérebro de camundongos inoculados artificialmente (Yai, 2000).

### **3. OBJETIVO**

O presente trabalho teve por objetivo detectar a presença e a viabilidade do protozoário *T. gondii* em amostras de linguiça suína fresca, comercializadas no município de Botucatu-SP, utilizando-se as técnicas de PCR e bioensaio em camundongos, a fim de avaliar a importância deste alimento na cadeia epidemiológica da toxoplasmose humana.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os trabalhos experimentais foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses, NUPEZO, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Câmpus de Botucatu-SP.

### **A. Colheita da amostras**

Foram coletadas 70 amostras de linguiça suína tipo frescal de pelo menos 50g cada, em 55 estabelecimentos comerciais no município de Botucatu-SP. De acordo com dados oficiais fornecidos pela prefeitura de Botucatu, os estabelecimentos foram classificados em: açougue, casa de carnes, supermercado, carne rotisserie e açougue rotisserie. Após a identificação, as amostras foram encaminhadas em bolsa térmica ao NUPEZO para serem processadas.

### **B. Isolamento em camundongos**

#### **a. Digestão péptica das amostras de linguiça**

Procedeu-se a digestão péptica das amostras de linguiça, de acordo com a técnica descrita por Dubey (1998). As amostras foram pesadas em duas porções de 20g cada (Figura 1). Uma delas foi triturada e diluída em 100 ml de solução de PBS pH 7,2 (Figura 2) e a outra em 100 ml de uma solução de antibióticos (Solução fisiológica com 1000 UI de penicilina G potássica/ml + 0,1 mg estreptomicina/ml). A amostra diluída em PBS foi filtrada em gaze estéril e centrifugada (Figura 3). O precipitado foi ressuspenso em PBS e aliqotado em tubos plásticos de 1,5 ml para a posterior extração do DNA.

A amostra diluída em solução de antibióticos permaneceu em repouso pelo período de uma a três horas em temperatura ambiente. O conteúdo foi então transferido para um béquer contendo 100 ml de solução ácida de pepsina (2,6 g pepsina + 5,0 g NaCl + 7,0 ml HCl + 493 ml água deionizada). A solução obtida foi mantida em estufa a 37°C por 60 minutos sob constante agitação, utilizando-se para tal, um agitador magnético (Figura 4). A seguir, procedeu-se a filtração em gaze estéril para quatro tubos de centrífuga de 50 ml e a centrifugação a 1200G durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 20 ml de PBS e 5 ml de bicarbonato de sódio 1,2%. A suspensão obtida foi centrifugada, como anteriormente, e o sedimento ressuspensionado em 5 ml da solução de antibióticos. Esta solução final foi utilizada tanto para a inoculação em camundongos como para a extração do DNA.

#### **b. Inoculação em camundongos**

Foi efetuada de acordo com a metodologia proposta por Dubey et al. (1995). Para a inoculação utilizou-se a solução obtida após a digestão péptica das linguças. Inoculou-se 1,0 ml de cada amostra, pela via subcutânea (Figura 5), em cinco camundongos Swiss de 30 dias de idade, procedentes de colônias soronegativas para toxoplasmose. Estes camundongos foram observados diariamente (Figura 6) e, daqueles que vieram a óbito, coletou-se o exsudato peritonal e procedeu-se impressões do cérebro, fígado, pulmão e baço, para exame citológico direto, segundo a técnica de coloração de Giemsa. Dos camundongos sobreviventes coletou-se, 30 a 45 dias após a inoculação, amostras de sangue, pela punção do seio orbital (Figura 7), e também de cérebro. Utilizou-se a RIFI para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*. Uma amostra seria considerada positiva caso apresentasse pelo menos uma das seguintes condições: presença de taquizoítos no exame citológico e/ou exsudato peritonal de pelo menos um camundongo que viesse a óbito antes do prazo estipulado para a colheita de sangue; título de anticorpos igual ou superior a 16 na RIFI de pelo menos um camundongo sobrevivente.

## **C. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

### **a. Obtenção do antígeno**

Foram mantidos taquizoítos da cepa RH em camundongos Swiss por inoculações intraperitoniais semanais. Para a sensibilização das lâminas de imunofluorescência, procedeu-se da seguinte forma: selecionou-se 2 ml de um lavado peritonal rico em taquizoítos e com poucas células; adicionou-se igual volume de uma solução de formol a 20%; incubou-se a 37°C por 30 minutos, agitando-se delicadamente a cada 10 minutos; centrifugou-se a 3000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 2 ml de PBS (pH 7,2), procedendo-se nova centrifugação e ressuspensão em PBS, e uma terceira centrifugação. O sedimento final foi ressuspensionado em solução fisiológica. A solução obtida foi avaliada quanto à quantidade de taquizoítos, utilizando-se para a sensibilização das lâminas, uma solução contendo aproximadamente 30 taquizoítos/campo (aumento de 400x). Após a sensibilização as lâminas foram armazenadas a -8°C até o momento de uso.

### **b. Execução da prova sorológica**

A RIFI foi executada de acordo com a técnica descrita por Camargo (1974). Os soros foram diluídos a 1:16 em PBS (pH 7,2). Aplicou-se 10 µl do soro diluído à lâmina sensibilizada. Incubou-se a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. Procedeu-se duas lavagens em PBS, de 10 minutos cada. Após a secagem das lâminas, adicionou-se 10 µl de conjugado anti-IgG de camundongo e incubou-se por mais 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após mais duas lavagens de 10 minutos em PBS e secagem das lâminas, procedeu-se a leitura em microscópio de imunofluorescência Zeiss (400x). Para cada lâmina testou-se soros controles negativo e positivo.



## **D. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

A PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Homan et al. (2000). A reação foi dirigida para amplificação de uma sequência de 529 pares de bases, repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii*.

### **a. Extração do DNA**

Para cada uma das 70 amostras de língua, procedeu-se a extração do DNA a partir de alíquotas pepsinizadas e não pepsinizadas. Cada alíquota de 250 µl foi homogeneizada em vórtex juntamente com igual volume de uma solução tampão de extração (200 mmol NaCl + 20 mmol Tris + 50 mmol EDTA + 1 mg/ml Proteinase K + 2% SDS) em tubo plástico de 1,5 ml. Esta solução foi incubada a 56°C por 60 minutos, com inversão delicada a cada 15 minutos. Adicionou-se então 500 µl de fenol e homogeneizou-se em vórtex antes de centrifugar (13000G/3minutos). A seguir transferiu-se uma alíquota de 300 µl do sobrenadante para um novo tubo plástico de 1,5 ml. Neste tubo foi adicionado 150 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1).

A solução obtida foi homogeneizada em vórtex e centrifugada (13000G/3 minutos). Uma alíquota de 200 µl do sobrenadante foi transferida para um novo tubo plástico de 1,5 ml, no qual adicionou-se 36 µl de acetato de sódio 2M e 470 µl de etanol absoluto gelado, mantendo-se a -20°C por 12 a 16 horas. Após este período a amostra foi centrifugada (13000G/10 minutos) e o etanol vertido cuidadosamente para então se adicionar 470 µl de etanol 70°. Após homogeneização delicada a amostra foi novamente centrifugada (13000G/10 minutos), retirando-se em seguida o etanol e secando-se os tubos à temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em 50 µl de água ultra pura e armazenadas a -20°C até a execução da PCR.

## **b. PCR**

A reação de PCR foi realizada em tubos plásticos de 0,2 ml, de acordo com o seguinte protocolo: 5 µl de tampão de PCR (50mmol KCl + 10mmol Tris-HCl) + 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (1,5mmol) + 8 µl da solução de deoxinucleotídeos (1,25mmol) + 1,5 U de taq-polimerase + 10pmol de cada oligonucleotídeo + 10 µl da amostra resultante da extração do DNA + 15,2 µl de água ultra pura.

Os oligonucleotídeos utilizados foram os seguintes:

5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3' (TOX4)

5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3' (TOX5)

A amplificação foi realizada em termociclador (Figura 8), de acordo com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por sete minutos e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 60 segundos, pareamento a 60°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final foi efetuada a 72°C por 10 minutos.

## **c. Eletroforese em gel de agarose**

A uma alíquota de 10 µl da amostra amplificada adicionou-se 2 µl de uma solução de azul de bromofenol (0,15 g Tris-hidroximetil-aminometano-Tris + 1 mg azul de bromofenol + 4 g sacarose + 10 ml água deionizada). Após homogeneização esta solução foi submetida a eletroforese horizontal em gel de agarose 2% com tampão tris-borato-EDTA 0,5x (54 g Tris-hidroximetil-aminometano-Tris + 27,5 g ácido bórico + 20 ml solução estoque de EDTA 0,5M + 980 ml água deionizada) e corrida a 100 voltz por 20 minutos. Após a corrida o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (5 µl brometo de etídeo + 20 ml tampão tris-borato-EDTA 5x + 80 ml água deionizada). A visualização das bandas foi efetuada em transluminador ultravioleta com filtro de 300 nm. O gel foi fotografado com sistema fotográfico Polaroid.

### **E. Análise Estatística**

Para a comparação dos resultados entre as amostras pepsinizadas e não pepsinizadas, utilizou-se o teste do Qui-quadrado de McNemar para proporções de sucesso em amostras dependentes (Mackinnon, 2000).

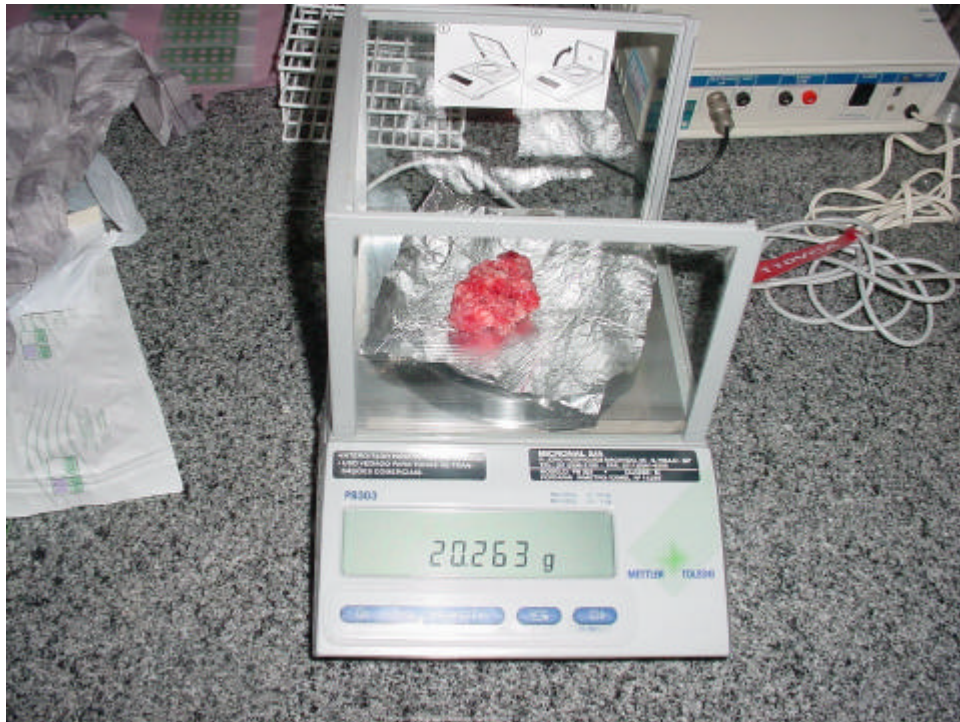


FIGURA 1. Pesagem das amostras de linguiça para pesquisa de *Toxoplasma gondii*. Botucatu-SP, 2003



FIGURA 2. Trituração e diluição da amostra de linguiça em PBS pH 7,2. Botucatu-SP, 2003



FIGURA 3. Filtragem da amostra de língua diluída em PBS pH 7,2 para posterior centrifugação. Botucatu-SP, 2003



FIGURA 4. Pepsinização de uma amostra de língua em agitador magnético. Botucatu-SP, 2003

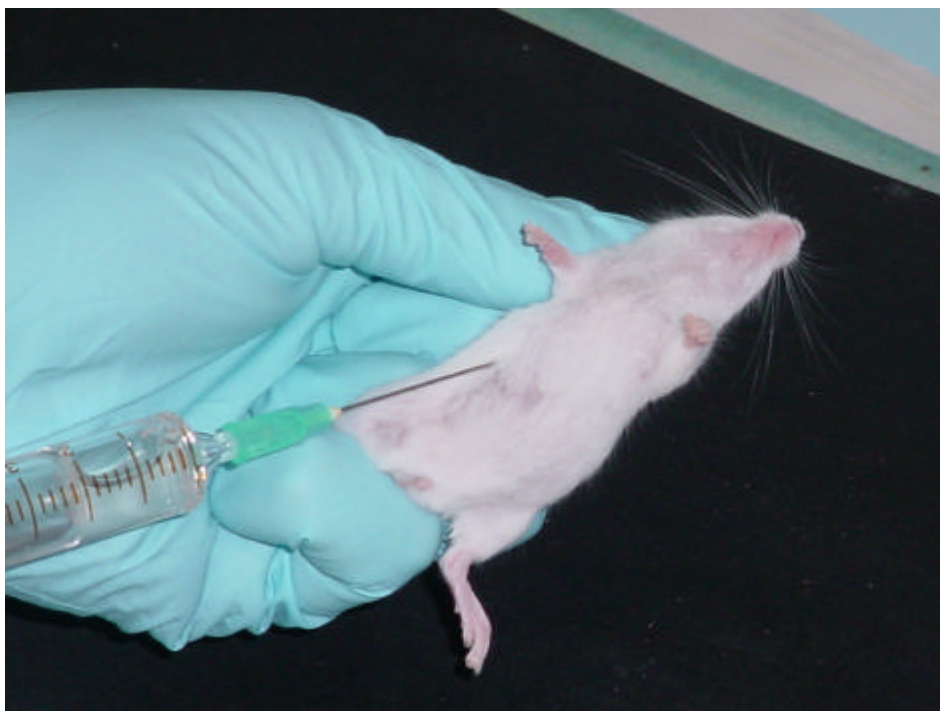


FIGURA 5. Inoculação de uma amostra de linguiça pepsinizada em camundongo, pela via subcutânea, para isolamento de *Toxoplasma gondii*. Botucatu-SP, 2003



FIGURA 6. Local onde os camundongos inoculados eram mantidos em observação pelo período de 30 dias. Botucatu-SP, 2003

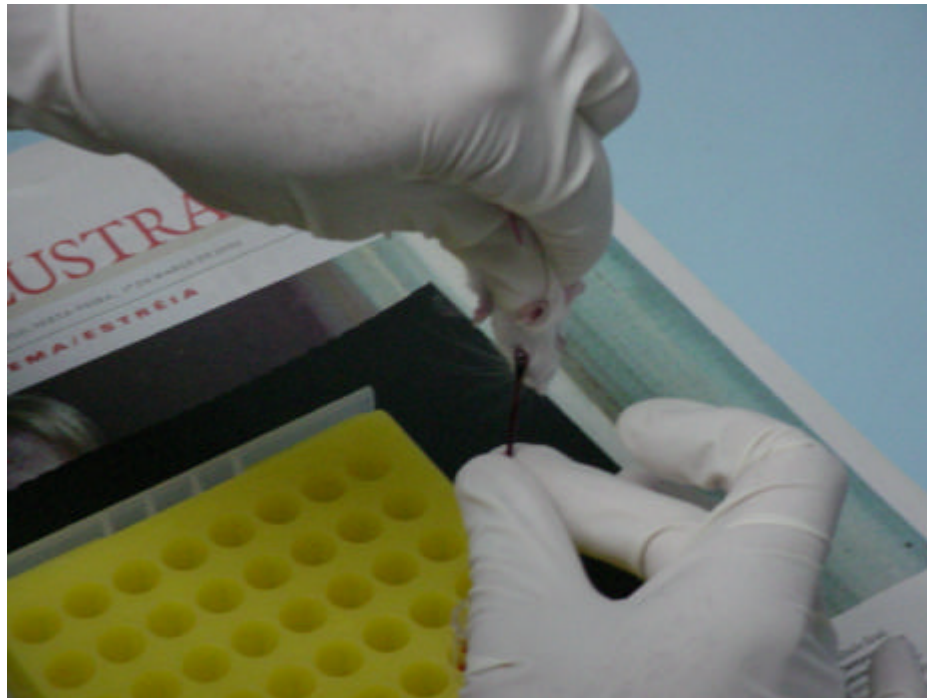


FIGURA 7. Coleta de sangue para exame sorológico após período de observação. Botucatu-SP, 2003

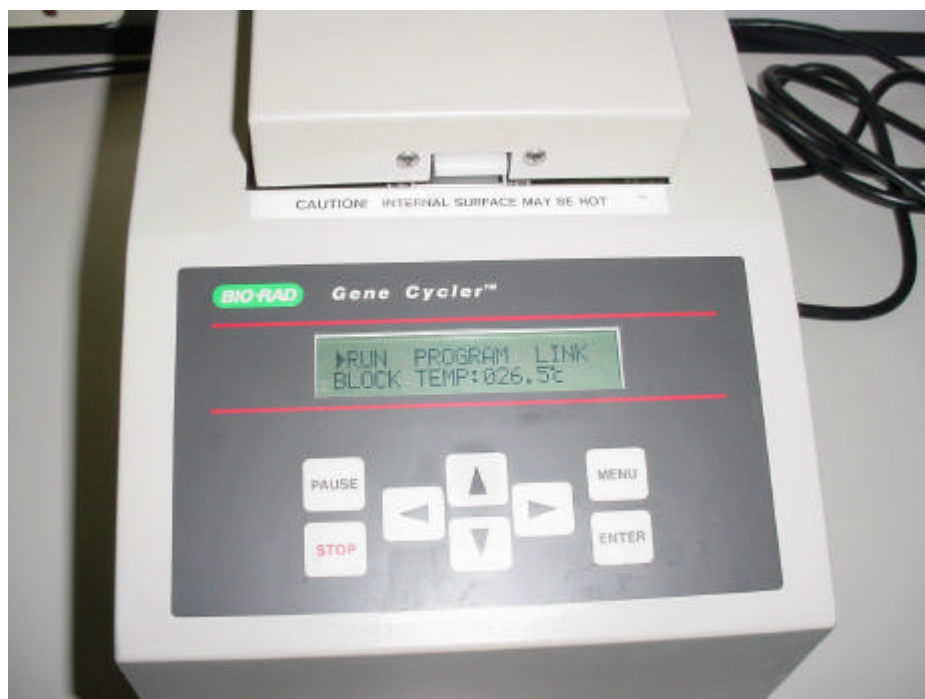


FIGURA 8. Termociclador utilizado para a amplificação do DNA do *Toxoplasma gondii*. Botucatu-SP, 2003

## 5. RESULTADOS

Todas as amostras testadas mostraram-se negativas à prova biológica. Dentre os 350 camundongos inoculados (grupos de cinco para cada uma das 70 amostras), nove vieram à óbito durante o período de observação. Cada um deles pertencia a um grupo diferente e em nenhum destes casos detectou-se infecção toxoplásmica de acordo com os exames citológicos realizados. Nos 61 grupos restantes, todos os cinco camundongos inoculados sobreviveram até o final do período de observação. Coletou-se amostras de soro sanguíneo de todos os camundongos sobreviventes para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, porém nenhuma das amostras mostrou-se positiva na diluição mínima de 1:16 (Tabela 1).

Com relação à PCR, 33 amostras (47,14%) apresentaram resultado positivo, entretanto, os resultados variaram de acordo com o tratamento das mesmas. Para as amostras submetidas à digestão péptica, 21 (30,0%) mostraram-se positivas e para aquelas que não sofreram este tratamento, 25 (35,71%) reagiram positivamente (Tabelas 2 e 3; Figuras 9 e 10). Dentre as amostras positivas, 13 (39,39%) reagiram positivamente para ambos os tratamentos, 12 (36,36%) apenas para as amostras não digeridas e 08 (24,24%) apenas para as amostras digeridas com pepsina (Figura 11). A análise estatística destes resultados não indicou diferença significativa entre os dois tipos de tratamento ( $\chi^2 = 0,45$ ;  $p = 0,50$ ;  $\kappa = 0,3548$ ).

As amostras coletadas em estabelecimentos do tipo “açougue rotisserie” e supermercado apresentaram maior (83,3%) e menor (37,9%) porcentagem de positividade, respectivamente (Tabela 4) . Em dois estabelecimentos coletaram-se três amostras em épocas diferentes. Em um deles, duas amostras mostraram-se positivas e uma negativa, enquanto que no outro, duas amostras mostraram-se



negativas e uma positiva. Os resultados referentes aos estabelecimentos em que foram coletadas duas amostras em épocas diferentes estão expressos na Tabela 5.

TABELA 1. Resultados da bioprova em camundongos para detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de linguiça suína frescal. Botucatu-SP, 2003

Número de amostras	70
Camundongos inoculados por amostra	05
Camundongos que vieram a óbito durante o período de observação	09
Número de amostras positivas para a presença de <i>T. gondii</i> , de acordo com os exames citológicos realizados nos animais que vieram à óbito	00
Camundongos sobreviventes	341
Número de amostras positivas para a presença de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> , de acordos com os exames sorológicos realizados nos animais sobreviventes	00

TABELA 2. Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de linguiça suína fresca pela técnica de PCR, segundo o tratamento da amostra. Botucatu-SP, 2003

Amostra	Sem digestão péptica	Com digestão péptica
1	-	-
2	-	-
3	-	+
4	-	-
5	-	+
6	-	-
7	-	+
8	-	+
9	+	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	+
16	-	-
17	+	+
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-
25	-	-
26	+	-
27	-	-
28	-	-
29	-	-
30	-	-
31	-	-
32	-	-
33	-	-
34	-	-
35	-	-
36	+	-

Amostra	Sem digestão péptica	Com digestão péptica
37	-	-
38	-	-
39	+	+
40	+	-
41	-	+
42	+	-
43	-	-
44	+	+
45	+	+
46	-	-
47	+	+
48	+	+
49	-	-
50	+	-
51	+	-
52	+	+
53	-	-
54	+	+
55	-	+
56	+	+
57	+	+
58	+	-
59	+	+
60	+	-
61	-	+
62	+	+
63	+	-
64	+	-
65	-	-
66	-	-
67	-	-
68	-	-
69	+	-
70	+	+
<b>Total positivos</b>	<b>25</b>	<b>21</b>

TABELA 3. Comparação do número de amostras positivas e negativas para a detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de linguiça suína frescal pela técnica de PCR, segundo o tratamento das mesmas. Botucatu-SP, 2003

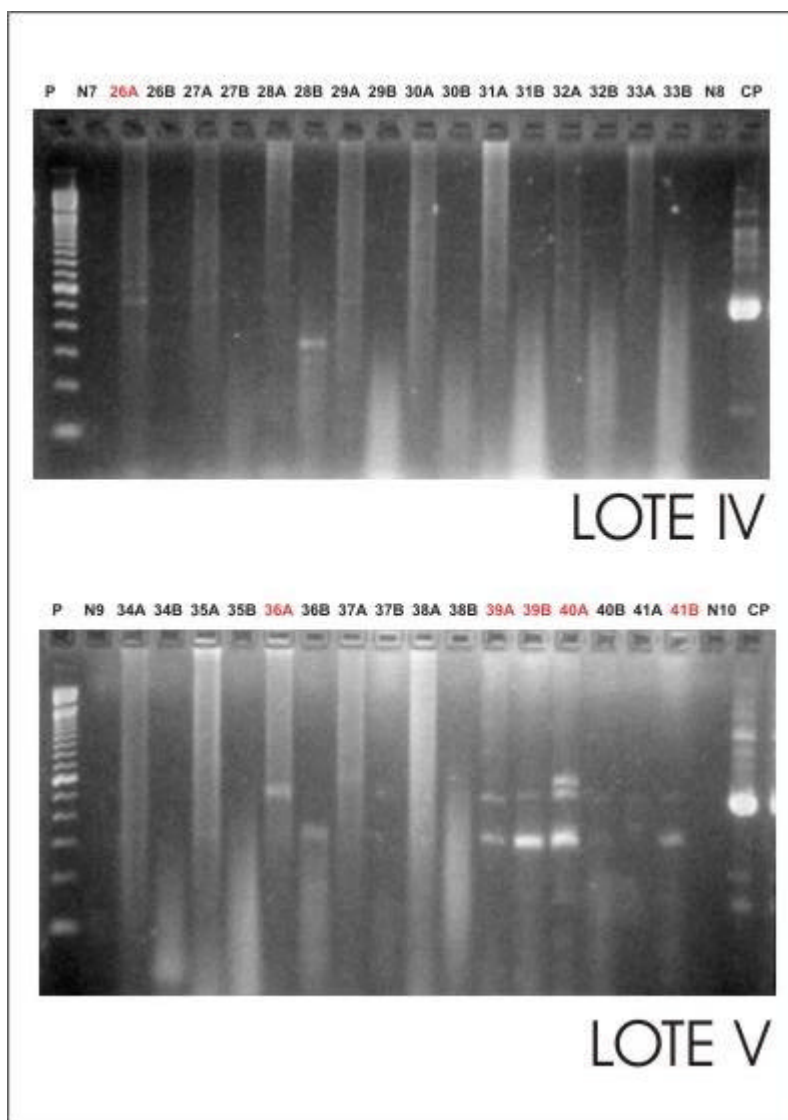
	<b>Amostras digeridas</b>	<b>Amostras não digeridas</b>
<b>Amostras positivas</b>	<b>21</b>	<b>25</b>
<b>Amostras negativas</b>	<b>49</b>	<b>45</b>
<b>TOTAL</b>	<b>70</b>	<b>70</b>

TABELA 4. Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de linguiça suína frescal pela técnica de PCR, de acordo com o estabelecimento em que foram coletadas. Botucatu-SP, 2003

<b>Estabelecimento</b>	<b>Amostras Positivas</b>	<b>Amostras Negativas</b>	<b>% Amostras Positivas</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Açougue Rotisserie</b>	5	1	83,3	6
<b>Casa de Carnes</b>	6	3	66,7	9
<b>Carne Rotisserie</b>	2	3	40,0	5
<b>Açougue</b>	7	11	38,9	18
<b>Supermercado</b>	11	18	37,9	29
<b>Outros</b>	2	1	66,7	3
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>37</b>	<b>47,1</b>	<b>70</b>

TABELA 5. Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de linguiça suína frescal pela técnica de PCR, em estabelecimentos em que foram coletadas duas amostras em épocas diferentes. Botucatu-SP, 2003

<b>Resultado</b>	<b>Ambas negativas</b>	<b>Uma positiva e uma negativa</b>	<b>Ambas positivas</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Número de amostras</b>	2	7	2	11
<b>%</b>	18,2	63,6	18,2	100,0



As letras em vermelho indicam as amostras positivas, ou seja, aquelas em que se amplificou uma seqüência de 529 pares de bases. Os lotes representam o grupo de amostras em que se correu a eletroforese no mesmo gel. P = Padrão de peso molecular; N = Amostras controle negativas; CP = Amostras controle positivas; A = Amostras não digeridas; B = Amostras digeridas

FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose após Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de linguiça suína frescal. Botucatu-SP, 2003

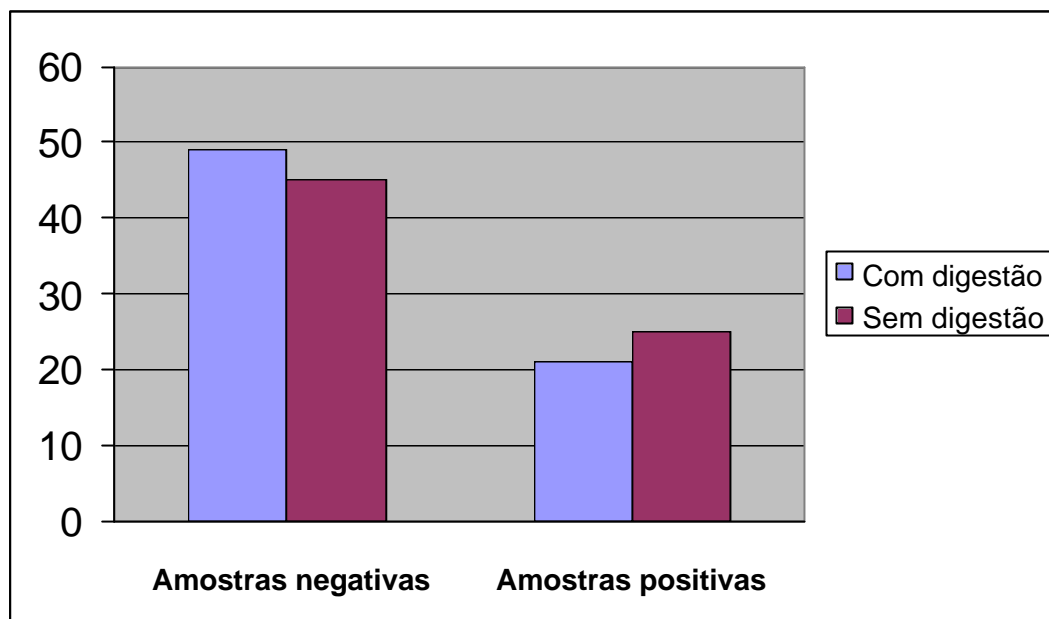


FIGURA 10. Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de linguiça suína fresca pela técnica de PCR em amostras digeridas e não digeridas pela pepsina. Botucatu-SP, 2003

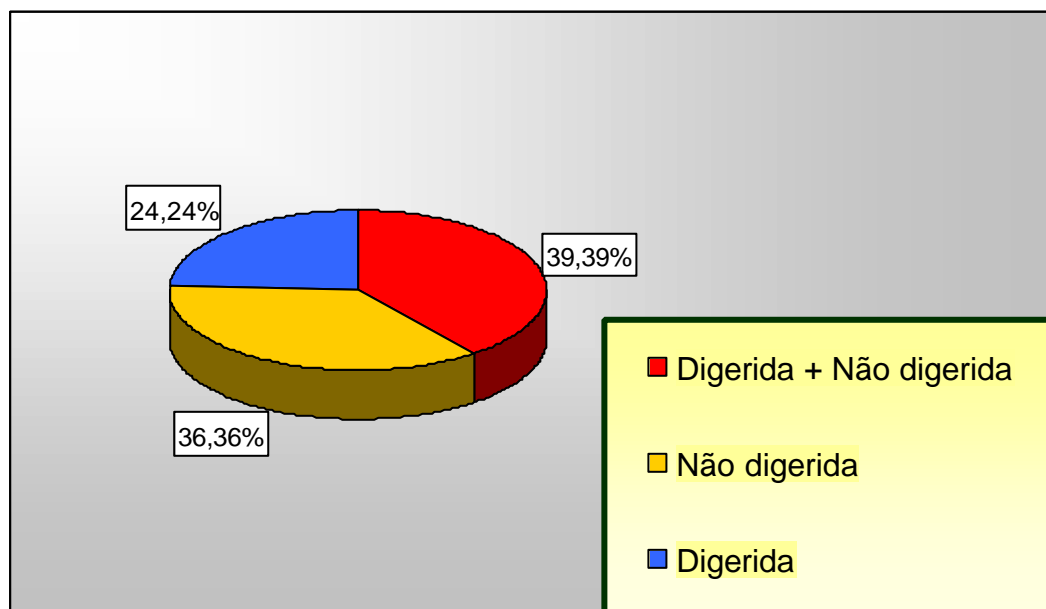


FIGURA 11. Distribuição das amostras de linguiça positivas para presença de *T. gondii*, pela técnica de PCR, de acordo com o tratamento das mesmas. Botucatu-SP, 2003

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho não se verificou a presença do parasita *T. gondii* viável em nenhuma das amostras estudadas. No entanto, os resultados obtidos a partir da técnica de PCR, revelaram a presença do parasita em quase metade das amostras (47,14%). Estes dados podem ser interpretados de duas maneiras, a saber: ou a técnica de PCR empregada tem baixa especificidade e, portanto, acarreta em resultados falso-positivos; ou a ocorrência do parasita é de fato elevada, porém os mesmos são inativados pela ação do sal e condimentos empregados para o tempero das linguiças.

Com relação à técnica de PCR, sabe-se que os “primers” utilizados para a reação no presente estudo, promovem a amplificação de um fragmento de DNA de 529bp, que se repete 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii*. Este fato torna a técnica dez vezes mais sensível em relação à utilização dos pares de “primers” para amplificação do gene B1, um dos mais utilizados no momento, de acordo com Homan et al. (2000). Estes autores testaram os “primers” frente a diferentes parasitas geneticamente próximos do *T. gondii*, não detectando reações cruzadas.

Desde a década de 70 tem-se estudado a influência dos condimentos utilizados para o tempero de linguiças na viabilidade dos cistos de *T. gondii*. Venkatachalam & Zimmerman (1976) estudaram a viabilidade do parasita em relação a diferentes métodos de processamento cárneo. Os autores inocularam 18 suínos e prepararam alguns alimentos, incluindo a linguiça, a partir dos animais inoculados. O *T. gondii* não foi reisolado a partir das amostras de linguiça, fato este atribuído à ação dos nitritos, nitratos e sal presentes neste alimento.

Navarro et al. (1992b) estudaram a viabilidade do *T. gondii* em relação a diferentes concentrações de sal na linguiça suína. O parasita foi reisolado de todas as amostras de linguiça sem sal, porém com condimentos (alho e pimenta-do-

reino), comprovando que tais condimentos não são capazes de, por si só, inativarem os cistos. Com relação às amostras tratadas com diferentes concentrações de sal (1,25%, 2,00% e 2,50%), constatou-se que houve decréscimo no isolamento à medida que se aumentou a quantidade de sal e o seu tempo de ação. No entanto, a inativação total dos cistos só foi observada nas concentrações mais elevadas de sal e com 48 horas de atuação. Concluiu-se que, sob refrigeração por 24 horas, ainda é possível isolar o *T. gondii* de amostras de linguiça suína submetidas a concentrações de sal normalmente utilizadas na fabricação artesanal e industrial da mesma.

Jamra et al. (1991), estudaram a viabilidade de cistos e de taquizoítos de *T. gondii*, obtidos em camundongos previamente inoculados, frente a diferentes concentrações de sal de cozinha. De acordo com este estudo, concentrações de 3,00% de sal de cozinha são suficientes para inativar, tanto cistos como taquizoítos, após um período de ação de, no mínimo, 3 dias.

No presente estudo, infelizmente não foi prevista a determinação do teor de sal nas amostras coletadas, o que dificulta uma melhor interpretação dos resultados. É provável que os parasitas presentes nas amostras, cujo DNA foi amplificado pela PCR, tenham sido inviabilizados pela ação do sal, conforme apontam os estudos supracitados, porém não foi possível confirmar esta hipótese pela mensuração do teor de sal nas amostras.

Considerando-se os resultados da PCR, a porcentagem de amostras positivas detectadas no presente estudo foi superior à obtida por Aspinall et al. (2002) que trabalharam com amostras de carne suína e derivados oriundas de açougues britânicos. Estes autores não realizaram a tentativa de isolamento do parasita.

O fato de que em supermercados a proporção de amostras positivas foi inferior em relação aos outros tipos de estabelecimento, sugere que os supermercados são mais cuidadosos em relação aos seus fornecedores.



Ao se coletar duas amostras de um mesmo estabelecimento em épocas diferentes, a probabilidade de detectar pelo menos uma amostra positiva foi de 81,8%, indicando que, provavelmente, poucos são os estabelecimentos que comercializam linguças livres de *T. gondii* ao longo do tempo. Isto porque, de uma forma geral, os fornecedores de linguças suínas são os mesmos para os diferentes estabelecimentos.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem a realização de novos trabalhos, enfocando a genotipagem das cepas de *T. gondii*, o que permitirá um maior esclarecimento sobre a patogenicidade das mesmas para camundongos, além de aprofundar os estudos de epidemiologia molecular da toxoplasmose. Neste sentido, de acordo com trabalho realizado por Howe & Sibley (1995), as cepas do tipo I são altamente virulentas para camundongos, enquanto que as do tipo II provocam infecções crônicas nos mesmos.

Mondragon et al. (1998) determinaram o genótipo de 43 cepas de *T. gondii* isoladas do coração de suínos adultos abatidos na região de Iowa, Estados Unidos. O tipo II foi o mais frequente (83,7%), seguido do tipo III (16,3%). Nenhuma cepa foi classificada dentro do genótipo I. Em contrapartida, Aspinall et al. (2002), determinaram o genótipo de 27 cepas isoladas a partir de amostras de alimentos comercializados no Reino Unido, sendo 19 de origem suína, seis de origem ovina, uma de origem bovina e uma de origem bovina e suína. Dentre as cepas estudadas, 21 (77,78%) foram classificadas dentro do tipo I e as demais eram mistas, ou seja, as amostras possuíam parasitas do tipo I e do tipo II.

São necessários ainda maiores estudos a respeito da importância da carne suína na epidemiologia da toxoplasmose no Brasil, visto que esta representa uma importante fonte de infecção de *T. gondii* em outros países.

## 7. CONCLUSÕES

Não se detectou o protozoário *T. gondii* viável em nenhuma das 70 amostras de linguiças suínas estudadas, indicando que este alimento provavelmente não é importante dentro da cadeia epidemiológica da toxoplasmose humana na região estudada.

Quase metade das amostras apresentaram-se positivas na reação de PCR, indicando um elevado grau de contaminação das linguiças. Entretanto, a ausência de resultados positivos na prova biológica indica que, provavelmente, os parasitas são inviabilizados pela ação do sal utilizado no tempero das linguiças.

## 8. REFERÊNCIAS

ABIPECS. Desempenho mundial da suinocultura. **Relatório Anual ABIPECS 2001**, p.4-11, 2001.

AMARAL, V.; MACRUZ, R. *Toxoplasma gondii*: isolamento de amostras a partir de diafragmas de suínos clinicamente sadios, abatidos em matadouros de São Paulo - Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.36, n.1, p.47-54, 1969.

ARAUJO, F.A.P.; SANTOS, J.R.; SOUZA, W.J.S. Detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected pigs by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the area of Great Erechim, RS, Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.26, n.2, p.57-65, 1998.

ARKO-MENSAH, J.; BOSOMPEM, K.M.; CANACOO, E.A.; WASTLING, J.M.; AKANMORI, B.D. The seroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana. **Acta Tropica**, v.76, p.27-31, 2000.

ASPINALL, T.V.; MARLEE, D.; HYDE, J.E.; SIMS, P.F.G. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1193-9, 2002.

BARCI, L.A.G.; BERSANO, J.G.; GUIMARÃES, A.C.S.; SPÓSITO FILHA, E.; REBOUÇAS, M.M. Freqüência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em plantéis de suínos reprodutores no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.65, n.1, p.111-3, 1998.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, p.143-71, 1974.

CANTOS, G.A.; PRANDO, M.D.; SIQUEIRA, M.V.; TEIXEIRA, R.M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.4, p. 335-41, 2000.

CAPORALI, E.H.G.; DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos pelo método de aglutinação direta e reação de imunofluorescência indireta. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, supl.1, n.458, p.265, 2002.

CAZENAVE, J.; CHEYROU, A.; BLOUIN, P.; JOHNSON, A.M.; BEGUERET, J. Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma*. **Journal of Clinical Pathology**, v.44, p.1037, 1991.

CHAVES, J.; REYES, L.; CHINCHILLA, M. Aislamiento de *Toxoplasma gondii* en carne de cerdo, confirmación de una hipótesis. **Parasitología al día**, v.22, n.3-4, p.111-3, 1998.

D'ANGELINO, J.L. **Toxoplasmose suína: contribuição para o estudo epidemiológico**. 1983. 90p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v.97, n.3, p.193-200, 2001.

DA SILVA, J.M.L. Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais**, v.12, p.425-8, 1959.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in pigs. **Veterinary Parasitology**, v.19, p. 181-223, 1986.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.205, n.11, p.1593-8, 1994.

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v.74, p.75-7, 1998.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of animals and man**. 1.ed. Boca Raton: CRC Press, 1988, 220p.

DUBEY, J.P.; LEIGHTY, J.C.; BEAL, V.C.; ANDERSON, W.R.; ANDREWS, C.D.; THULLIEZ, P. National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. **Journal of Parasitology**, v.77, n.4, p.517-21, 1991.

DUBEY, J.P.; THULLIEZ, P.; POWELL, E.C. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titer to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. **Journal of Parasitology**, v.81, n.1, p.48-53, 1995.

FARREL, R.L.; DOCTON, F.L.; CHAMBERLAIN, D.M.; COLE, C.R. Toxoplasmosis I. *Toxoplasma* isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.13, n.47, p.181-5, 1952.

FRENKEL, J.K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 99, p.1290-305.

GAJADHAR, A.A.; ARAMINI, J.J.; TIFFIN, G.; BISAILLON, J.R. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in canadian market-age pigs. **Journal of Parasitology**, v.84, n.4, p.759-63, 1998.

GAMBLE, H.R.; MURREL, K. D. Detection of parasites in food. **Parasitology**, n.117, p.S97-S111, 1998.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais no norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.29, n.1, p.91-7, 1999.

GIRALDI, N.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L.; OGAWA, L., KOBAYAKA, E. *Toxoplasma* antibody and stool parasites in public school children, Rolândia, Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.3, p.215-9, 2002.

GLASNER, P.D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MARTINS, M.C.; BURNIER JR, M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M.E.; NUSSENBLATT, R.B.; KASLOW, R.A.; BELFORT JR, R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v.114, p.136-44, 1992.

GUIMARÃES, M.D.C. Estudo temporal das doenças associadas à AIDS no Brasil, 1980-1999. **Caderno de Saúde Pública**, v.16 (supl.1), p.21-36, 2000.

GUIMARÃES, A.C.S.; KAWARABAYASHI, M.; BORGES, M.M.; TOLEZANO, J.E.; ANDRADE JR, H.F. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, n.6, p.479-83, 1993.

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

HONORÉ, S.; COUVELARD, A.; GARIN, Y.J.F.; BEDEL, C.; HÉNIN, D.; DARDÉ, M.L.; DEROUIN, F. Génotypage de souches de *Toxoplasma gondii* chez des patients immunodéprimés. **Pathologie et Biologie**, v.48, p.541-7, 2000.

HOVE, T.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic pigs and some wild game species from Zimbabwe. **Journal of Parasitology**, v.85, n.2, p.372-3, 1999.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v.172, p.1561-6, 1995.

JAMRA, L.M.F.; DEANE, M.P.; GUIMARÃES, E.C. On the isolation of *Toxoplasma gondii* from human food of animal origin. Partial results in the city of São Paulo (Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.11, n.3, p.169-6, 1969.

JAMRA, L.M.F.; MARTINS, M.C.; VIEIRA, M.P.L. Ação do sal de cozinha sobre o *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, n.5, p.359-63, 1991.

LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v.15, p.211-22, 1992.

- MACKINNON, A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. **Comp. Biol. Med.**, v.30, p.127-34, 2000.
- MARTINS, M.C.; SILVEIRA, C.; JAMRA, L.M.F.; VIERIA, M.P.L. *Toxoplasma gondii* em carnes e derivados, provenientes de Erechim, RS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.31 (supl.7), p.S38, 1989.
- MATOS, M.P.C.; SOBESTIANSKY, J.; GAMBARINI, M.L.; CAIADO, K.L. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de matrizes suínas de granjas que abastecem o mercado consumidor de Goiânia. **A Hora Veterinária**, v.19, n.109, p.9-11, 1999.
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R.V. Food-Related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.607-25, 1999.
- MONDRAGON, R.; HOWE, D.K.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, v.84, n.3, p.639-41, 1998.
- NAVARRO, I.T.; VIDOTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii*: isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina-PR **Semina: Ciências Agrárias**, v.13, n.1, p.32-4, 1992a.
- NAVARRO, I.T.; VIDOTO, O.; GIRALDI, N.; MITSUKA, R. Resistência do *Toxoplasma gondii* ao cloreto de sódio e aos condimentos em lingüiça de suínos. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, v.112, n.2, p.138-43, 1992b.
- NETO, E.C.; ANELE, E.; RUBIM, R.; BRITES, A.; SCHULTE, J.; BECKER, D.; TUUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. **International Journal of Epidemiology**, v.29, p.941-7, 2000.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondii. **Science**, v.148, p.369-72, 1909.

PASSOS, L.N.; ARAÚJO FILHO, O.F.; ANDRADE JR, H.F. *Toxoplasma* encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1998 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, n.3, p.141-5, 2000.

REICHE, E.M.V.; MORIMOTO, H.K.; FARIAS, G.N.; HISATSUGU, K.R.; GELLER, L.; GOMES, A.C.L.F.; INOUE, H.Y.; RODRIGUES, G.; MATSUO, T. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.6, p. 519-27, 2000.

ROBERTS, T.; FRENKEL, J.K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.196, n.2, p.249-56, 1990.

SAVVA, D.; HOLLIMAN, R.E. Diagnosis of ovine toxoplasmosis: an alternative to serology? **The Veterinary Record**, v.124, p.212, 1989.

SCHENK, M.A.M.; LIMA, J.D.; SCHENK, J.A.P. Isolamento de *Toxoplasma gondii* em suínos do estado de Minas Gerais. **Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG**, v.29, n.1, p.25-30, 1977.

SILVA, C.A.; RIBEIRO, P.R.; SOTO, W.C.; FRANCIS, D.G. Contexto social da suinocultura brasileira. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.19, n.1, p.94-8, 1998.

SILVA, R.A.M.S.; BARATO, P.; BONASSI, C.A.; VIDAL, C.E.S.; MORES, N.; DALLA-COSTA, O.A.; DUBEY, J.P. Survey on porcine toxoplasmosis from swine farms in southern region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94 (supl.2), p.91, 1999a.

SILVA, R.A.M.S.; BONASSI, C.A.; VIDAL, C.E.S.; MORES, N.; DALLA-COSTA, O.A.; DUBEY, J.P. Survey on *Toxoplasma gondii* infection in outdoor



pig production system from southern region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94 (supl.2), p.90, 1999b.

STILES, J.; PRADE, R.; GREENE, C. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n.3, p.264-6, 1996.

SUARÉZ-ARANDA, F.; GALISTEO JR, A.J.; HIRAMOTO, R.M.; CARDOSO, R.P.A.; MEIRELES, L.R.; MIGUEL, O.; ANDRADE JR, H.F. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Veterinary Parasitology**, v.91, p.23-32, 2000.

TENTER, A.M. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v.23, n.6, p.391, 1998.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1217-58, 2000.

VENKATACHALAM, R.; ZIMMERMAN, W.J. Viability of *Toxoplasma gondii* in relation to processing of meat. **Journal of Animal Science**, v.42, n.5, p.1346, 1976.

VIDOTO, O.; NAVARRO, I.T.; GIRALDI, N.; MITSUKA, R.; FREIRE, R.L. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v.11, n.1, p.53-9, 1990.

WARNEKULASURIYA, M.R.; JOHNSON, J.D.; HOLLIMAN, R.E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.45, p.211-5, 1998.

WENTZ, I.; SOBESTIANSKY, J.; CHAPLIN, E. Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de suínos em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, n.4, p.441-3, 1986.

WYSS, R.; SAGER, H.; MULLER, N.; INDERBITZIN, F.; KONIG, M.; AUDIGE, L.; GOTTSTEIN, B. Distribution of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* under aspects of meat hygiene. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v.142, n.3, p.95-108, 2000.

YAI, L.E.O. **Avaliação da infecção experimental por *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) em suínos pelas provas de bioensaio em camundongos e reação em cadeia pela polimerase.** 2000. 71p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

## 9. ABSTRACT

Occurrence of the protozoan *Toxoplasma gondii* was studied in 70 samples of fresh swine sausages commercialized in the city of Botucatu-SP, to evaluate the importance of this kind of food in toxoplasmosis epidemiology. For that, it was proceeded the agent isolation in mice and the polymerase chain reaction (PCR) to amplify the genetic material. The PCR was made with digested samples and no digested by pepsin. The parasite wasn't isolated from any sample, however, 33 (47.14%) samples were positive to the PCR. From digested samples, 21 (30.00%) were positives and from no digested samples 25 (35.71%) showed positives. There wasn't significant difference between the two treatments. Results indicate that swine sausages probably have a little importance as infection source of human toxoplasmosis in the studied region. Nevertheless, the high amount of PCR positives samples show that the parasite may be present, but it is inactivated by the salt added to sausages seasoning.

**Key words:** *Toxoplasma*, sausage, PCR, isolation.