UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE ESPACIAL DE *Toxoplasma gondii* NO LEITE BOVINO EM ASSENTAMENTOS RURAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO

BRUNA DOS SANTOS LEITE

Botucatu – SP

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE ESPACIAL DE *Toxoplasma gondii* NO LEITE BOVINO EM ASSENTAMENTOS RURAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO

BRUNA DOS SANTOS LEITE

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

D724i

dos Santos Leite, Bruna

Investigação Molecular e Análise Espacial de Toxoplasma gondii no Leite Bovino em Assentamentos Rurais do Estado de São Paulo / Bruna dos Santos Leite. -- , 2026

140 p. : tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,

Orientadora: Simone Baldini Lucheis

1. Medicina Veterinária. 2. Diagnóstico molecular. 3. Toxoplasmose. 4. Vacas. 5. Leite. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Impacto científico esperado: Investigar a presença e a possível circulação de *Toxoplasma gondii* em assentamentos rurais localizados na região Noroeste do estado de São Paulo, por meio da detecção molecular do protozoário em amostras de leite. A investigação apresenta relevância para a saúde pública e a saúde dos animais, uma vez que *T. gondii* é um agente zoonótico capaz de infectar diversas espécies animais e o ser humano.

Impacto social: Com a detecção molecular de *Toxoplasma gondii* em leite bovino podemos estabelecer medidas preventivas e de controle para reduzir a disseminação do protozoário e minimizar seus possíveis impactos à saúde, tendo-se elaborado folder educativo para os produtores rurais dos assentamentos visitados. Essa contribuição está inserida na perspectiva da Saúde Única, considerando a inter-relação entre saúde animal, saúde humana e ambiente, e diretamente relacionada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), especialmente à promoção da saúde e do bem-estar.

Impacto econômico: A identificação de *Toxoplasma gondii* no leite bovino pode contribuir para a criação de medidas de controle sanitário e de boas práticas de manejo nas propriedades rurais, incluindo cuidados relacionados à higiene do ambiente, à prevenção da contaminação de alimentos e água e à segurança do leite destinado ao consumo. Essas ações podem contribuir para a redução de potenciais impactos econômicos associados à ocorrência de agentes zoonóticos na produção pecuária, garantindo a segurança e a qualidade dos produtos de origem animal.

Nome da Autora: Bruna dos Santos Leite

Título: INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE ESPACIAL DE *Toxoplasma gondii* NO LEITE BOVINO EM ASSENTAMENTOS RURAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Simone Baldini Lucheis
Presidente e Orientadora
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Cassiano Victória
Membro Titular
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª Drª Kátia Denise Saraiva Bresciani
Membro Titular
Departamento de Produção e Saúde Animal
FMVA – UNESP – Araçatuba

Data da Defesa: 8 de julho de 2026

AGRADECIMENTOS

Eu tenho que agradecer à minha família, em especial meu pai Carlos. minha mãe Roseli e minha tia Glória. Eles me apoiaram todo esse tempo em que estive longe de casa.

Às minhas amigas que conheci durante a pós-graduação, Natalia e Raphaela, pelas conversas e risadas.

Aos produtores rurais que abriram as portas de suas casas e disponibilizaram seus animais, sem eles , este projeto não poderia ser executado.

Ao Médico Veterinário Fernando Morelli, que foi um profissional incrível nos ajudando durante as coletas, sendo essencial neste trabalho.

Meus agradecimentos aos profissionais do Instituto de Terras do Estado de São Paulo, pelo auxílio e pela parceria na realização deste projeto.

Aos Médicos Veterinários e mestrandos Maria Flávia Alencar e Vinicius Santos, pelo auxílio durante as coletas durante as visitas nas propriedades.

Aos meus colegas Isabella Aires, Amanda Corvino, Marcos Rangel e Laís Pereira, pelo apoio e ajuda, que tornaram a rotina no laboratório mais leve.

Aos Professores, Dr. Hélio Langoni e Drª. Katia Bresciani, pelas reconsiderações durante o Exame Geral de Qualificação.

À minha orientadora Professora Drª Simone Baldini Lucheis, por ter me aceitado como sua orientanda e me apoiado durante a Pós-Graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento à pesquisa concedido por meio do Processo 2023/00076-9.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estudos sorológicos da presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos do Brasil realizados entre 1978 e 2018. 13

Quadro 2. Número de animais e propriedades rurais por assentamentos amostrados e distribuídos em sete municípios da região Noroeste do estado de São Paulo, para coleta de leite de vacas em lactação, para pesquisa de *Toxoplasma gondii* 30

Quadro 3. Distribuição do número e percentual de amostras positivas para *Toxoplasma gondii* em leite bovino, de acordo com o município de origem, detectadas por PCR convencional com os *primers* TOX4 e TOX5. 40

Quadro 4. Distribuição do número e percentual de amostras positivas para *Toxoplasma gondii* em leite bovino, de acordo com o município de origem, detectadas por Nested PCR com os *primers* NN1/ NN2 e TgNP1/TgNP2..... 41

Quadro 5. Distribuição do número e percentual de amostras positivas para *Toxoplasma gondii* em leite bovino, de acordo com o município de origem, detectadas por Nested PCR com os *primers* Tg18s48F/Tg18s359R e Tg18s58F/Tg18s348R. 43

Quadro 6. Amostras de leite bovino e percentual de positividade para *Toxoplasma gondii* segundo os *primers* utilizados em cada amostra..... 46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descrição completa do ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* 8

Figura 2. Mapa do Estado de São Paulo com destaque para os municípios com animais amostrados no estudo. 28

Figura 3. Mapa do Estado de São Paulo com a distribuição dos assentamentos utilizados no estudo em seus respectivos municípios. 28

Figura 4. Mapa do Estado de São Paulo com destaque para o número de assentamentos dentro de cada município amostrado no estudo. 29

Figura 5. (A) Presença de felino próximo a sala de ordenha de assentamento rural; (B) Galinha (seta vermelha) próxima ao tanque de refrigeração de sala de ordenha do assentamento rural. 38

Figura 6. (A) Realização da ordenha em propriedade rural no município de Castilho; (B) Identificação das amostras, após a retirada do leite..... 39

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* TOX4 e TOX5 (529 pb) para *Toxoplasma gondii* . Marcador de peso molecular 100 pb; coluna 15 (circulado em vermelho) – amostra procedente do assentamento Rio Paraná do município de Castilho; colunas 18 e 19 – controles positivos; 20 – controle negativo (água ultrapura). 40

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* TgNP1/TgNP2 (227 pb) que amplificam um fragmento da região ITS1 de *Toxoplasma gondii* . Marcador de peso molecular 100 pb; colunas 4 e 5 (circuladas em vermelho) – amostra procedente do assentamento Timboré do município de Andradina; coluna 16 (circulada em azul) – amostra procedente do assentamento Rio Paraná do município de Castilho; colunas 18 e 19 – controles positivos; 20 – controle negativo (água ultrapura). 42

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* Tg18s48F/Tg18s359R (300 pb) do gene do DNA ribossômico 18S (rDNA) do Filo

Apicomplexa. Marcador de peso molecular 100 pb; colunas 2 a 9 (circulado em azul) – amostras procedentes do assentamento Primavera do município de Andradina; colunas 10 a 17 (circulado em vermelho) – amostra procedente do assentamento Fazenda São Sebastião do município de Andradina; colunas 18 e 19 – controles positivos; 20 – controle negativo (água ultrapura). 44

Figura 10. Distribuição espacial do número de amostras de leite bovino positivas na PCR convencional para *Toxoplasma gondii* , utilizando os *primers* TOX4 e TOX5, nos assentamentos rurais avaliados no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. 49

Figura 11. Distribuição espacial do número de amostras de leite bovino positivas na Nested PCR para *Toxoplasma gondii* , utilizando os *primers* NN1/NN2 e TgNP1/TgNP2, nos assentamentos rurais avaliados no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil..... 50

SUMÁRIO

PÁGINA

CAPÍTULO 1 1

1. INTRODUÇÃO 2

2. REVISÃO DE LITERATURA 4

2.1. Histórico 4

2.2. Ciclo biológico 6

2.3. Patogenia 10

2.4. Epidemiologia da toxoplasmose em bovinos 12

2.4.1. *Toxoplasma gondii* no leite bovino e relatos de surtos 16

2.5. Sintomatologia em bovinos e humanos 19

2.6. Diagnóstico 20

2.7. Prevenção e controle 21

2.8. *Toxoplasma gondii* e sua relevância em saúde pública 23

3. OBJETIVOS 25

3.1. Objetivo geral 25

3.2. Objetivos específicos 25

4. MATERIAL E MÉTODOS 26

4.1. Comitê de Ética 26

4.2. Local de realização dos exames 26

4.3. Seleção dos animais e propriedades leiteiras 26

4.4. Coleta do leite 30

4.5. Extração do DNA à partir das amostras de leite para pesquisa de *Toxoplasma gondii* 31

4.6. Análise de pureza 31

4.7. Exames moleculares 31

4.7.1. Controle Endógeno de Extração 31

4.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) – *primers* TOX4/TOX5 32

4.7.3. Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – *primers* TgNP1/TgNP2 33

4.7.4. Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – *primers* Tg18s48F/Tg18s359R - Filo Apicomplexa. 34

4.7.5. Eletroforese em gel de agarose 34

4.7.6. Controles 35

4.8. Sequenciamento 35

4.9. Análise espacial 36

4.10. Análise estatística 36

CAPÍTULO 2 37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38

5.1. Características dos rebanhos e das propriedades visitadas 38

5.2. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) – *primers* TOX4/TOX5 39

5.3. Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – *primers* TgNP1/TgNP2 41

5.4. Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – Filo Apicomplexa..... 42

5.5. Sequenciamento 48

5.6. Análise espacial 49

5.6.1. Assentamentos com amostras de leite bovino positivas para *T. gondii* com os *primers* TOX4/TOX5. 49

5.6.2. Assentamentos com amostras de leite bovino positivas para *T. gondii* com os *primers* NN1/NN2 e TgNP1/TgNP2. 50

5.7. Análise estatística 50

6. CONFECÇÃO DE FOLDER EDUCATIVO..... 52

7. CONCLUSÕES 53

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

CAPÍTULO 3 78

9. TRABALHO CIENTÍFICO 79

CAPÍTULO 4 104

10. ANEXOS 105

10.1. Anexo 1: Atestado do CEUA. 105

10.2. Anexo 2: Protocolo de extração das amostras de leite com o Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (Cytiva®). 106

10.3. Anexo 3: Resultados da análise de pureza por espectrofotometria .. 108

10.4. Anexo 4: Resultados individuais das amostras de leite bovino (n = 160), distribuídas por município e assentamento da região Noroeste do Estado de São Paulo, quanto à detecção de *Toxoplasma gondii* por PCR convencional (*primers*

TOX4/TOX5) e Nested PCR (*primers* NN1/NN2 e TgNP1/TgNP2), além da amplificação do gene 18S rRNA (*primers* Tg18s48F/Tg18s359R e Tg18s58F/Tg18s348R). 113

10.5. Anexo 5: Eletroferogramas das amostras sequenciadas 118

10.5.1. Amostra 102 (*primers* TgNP1 e TgNP2) 119

10.5.2. Amostra 107 (*primers* TgNP1 e TgNP2) 121

10.5.3. Amostra 116 (*primers* TgNP1 e TgNP2) 123

10.6. Anexo 6: Folder educativo 125

RESUMO

LEITE, B. S. Investigação molecular e análise espacial de *Toxoplasma gondii* no leite bovino de assentamentos rurais do Estado de São Paulo. Botucatu – SP, 2026, 140p., Mestrado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) – Botucatu.

Toxoplasma gondii (T. gondii) é um protozoário intracelular obrigatório, agente da toxoplasmose, uma zoonose de ampla distribuição mundial. Felídeos podem ser tanto hospedeiros definitivos quanto hospedeiros intermediários, enquanto aves e mamíferos, incluindo humanos e bovinos, atuam como intermediários. Embora bovinos sejam considerados pouco eficientes na manutenção do ciclo deste parasito, a infecção apresenta relevância sanitária e zoonótica, sobretudo pelo consumo de leite cru e derivados em sistemas familiares. Neste estudo foi investigada a presença de *T. gondii* em leite cru de 160 vacas em lactação, procedentes de 20 assentamentos rurais em sete municípios do Noroeste paulista. Amostras em *pool* dos quatro tetos foram submetidas à PCR convencional (TOX4/TOX5), Nested PCR (TgNP1/TgNP2) e Filo Apicomplexa (Tg18s48F/Tg18s359R). Positividade de 13,12% (21/160) foi detectada à PCR convencional; 26,25% (42/160) à Nested PCR e 100% (160/160) para o Filo Apicomplexa, havendo diferença estatisticamente significativa entre os três conjuntos de *primers* avaliados ($Q = 48,1091$; $gl = 2$; $p < 0,0001$). Três amostras positivas à Nested PCR foram sequenciadas, uma delas com similaridade de 99,45% e duas de 100% para *T. gondii* , confirmando-se a identidade do referido protozoário. Por meio dos achados desta pesquisa, verifica-se que o leite cru pode representar potencial fonte de infecção, o que reforça a necessidade de controle sanitário, orientação aos produtores e cautela quanto ao consumo e à comercialização deste alimento sem pasteurização.

Palavras-chave: Diagnóstico; Leite; Toxoplasmose; Vacas; Agricultura familiar.

ABSTRACT

LEITE, B. S. Molecular investigation and spatial analysis of *Toxoplasma gondii* in bovine milk in rural settlements in the State of São Paulo. Botucatu – SP, 2026, 140p., Mestrado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) – Botucatu.

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is an obligate intracellular protozoan, the agent of toxoplasmosis, a zoonosis with a wide global distribution. Felines can be both definitive and intermediate hosts, while birds and mammals, including humans and cattle, act as intermediates. Although cattle are considered inefficient in maintaining the life cycle of this parasite, the infection has sanitary and zoonotic relevance, mainly due to the consumption of raw milk and implications in family farming systems. We investigated the presence of *T. gondii* in raw milk from 160 lactating cows from 20 rural settlements in seven municipalities in northwestern São Paulo state. Pooled samples from all four teats were subjected to conventional PCR (TOX4/TOX5), Nested PCR (TgNP1/TgNP2), and Phylum Apicomplexa (Tg18s48F/Tg18s359R). A positivity rate of 13.12% (21/160) was detected by conventional PCR; 26.25% (42/160) by Nested PCR and 100% (160/160) for the phylum Apicomplexa, with a statistically significant difference between the three primer sets evaluated ($Q = 48.1091$; $df = 2$; $p < 0.0001$). Three Nested PCR-positive samples were sequenced, one with 99.45% similarity and two with 100% similarity for *T. gondii*, confirming the identity of the protozoan. By our findings, raw milk can represent a potential source of infection, reinforcing the need for sanitary control, guidance for producers, and caution regarding the consumption and marketing of unpasteurized foods.

Keywords: Diagnosis; Milk; Toxoplasmosis; Cows; Family farming.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (Wong; Remington, 1993) apresenta distribuição geográfica cosmopolita e infecta uma ampla variedade de mamíferos e aves, domésticos e silvestres, incluindo felídeos e o ser humano, o que caracteriza seu elevado potencial zoonótico (Dubey, 2022; Hatam-Nahavandi *et al.*, 2021).

Os bovinos atuam como hospedeiros intermediários no ciclo biológico de *T. gondii* , sendo a principal via de infecção a ingestão de pastagens contaminadas com oocistos, principalmente em sistemas de criação extensivos. (Costa *et al.*, 2011; Millar *et al.*, 2008).

A presença de *T. gondii* no solo tem sido amplamente relatada como uma importante via de infecção tanto para humanos quanto para animais, configurando um relevante problema de saúde pública. Grupos de risco, como crianças, gestantes, jardineiros e indivíduos imunocomprometidos, apresentam maior suscetibilidade à infecção, principalmente devido ao contato direto com solos contaminados por oocistos eliminados por felinos (Oliveira *et al.*, 2021).

O sistema de criação de bovinos também exerce influência direta na ocorrência da toxoplasmose. Sistemas de produção semi-intensivos e extensivos estão associados a maiores taxas de soropositividade quando comparados aos sistemas intensivos, uma vez que favorecem maior contato dos animais com o solo e com fontes ambientais potencialmente contaminadas por oocistos de *T. gondii* (Barros *et al.*, 2020).

Apesar de haver poucos relatos da infecção em bovinos no Brasil, em estudos tem sido demonstrado que esses animais são suscetíveis à infecção, porém relativamente resistentes ao desenvolvimento da doença clínica, sendo capazes de eliminar o parasito ou reduzi-lo a níveis indetectáveis em poucas semanas (Dubey; Jones, 2008).

A toxoplasmose, contudo, não é reconhecida como uma causa relevante de abortos ou natimortos em bovinos, como em ovinos e caprinos, embora a transmissão transplacentária possa ocorrer em condições naturais ou

experimentais, sem que haja confirmação de sua relação direta com esses eventos (Stelzer *et al.*, 2019).

O consumo de produtos de origem animal, como leite cru bovino, tem aumentado consideravelmente devido a aspectos culturais, sensoriais e nutricionais. No entanto, esse hábito pode elevar a transmissão de patógenos zoonóticos, incluindo *T. gondii* (Cisak *et al.*, 2017).

Considerando a carência de referências na literatura científica sobre a detecção de *T. gondii* em amostras de leite bovino e devido à sua notoriedade como agente zoonótico e de importância para a saúde pública, propusemos a avaliação molecular de *Toxoplasma gondii* em vacas leiteiras provenientes de assentamentos rurais da região Noroeste do Estado de São Paulo, bem como a análise espacial com animais positivos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

O patógeno causador da toxoplasmose foi descoberto em 1908 por Nicolle e Manceaux em um roedor de nome científico *Ctenodactylus gundi*, o qual estava sendo utilizado para pesquisas de leishmaniose no Instituto Pasteur, na Tunísia. Inicialmente, o parasito foi denominado "*Leishmania gondii*", devido à sua similaridade com protozoários do gênero *Leishmania* spp. No mesmo ano, no Brasil, Splendore encontrou o mesmo parasito em um coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*), porém o identificou como *Leishmania*, sem atribuir-lhe um nome específico. Contudo, em 1909, Nicolle e Manceaux reconheceram que se tratava de um novo parasito, que passou a ser denominado *Toxoplasma gondii* em função de sua morfologia, sendo "táxon" = arco, "plasma" = forma e "gondii" em homenagem ao roedor *Ctenodactylus gundi* (Dubey, 2022; Vaz *et al.*, 2011).

Em 1937, estudos experimentais com cepas de *T. gondii* , inicialmente obtidas acidentalmente durante pesquisas com vírus, revelaram que o parasito se multiplica exclusivamente dentro de células vivas, sendo cultivado com sucesso em tecidos vivos como embriões de galinha, mas não em meios acelulares. Pesquisas de patogenicidade mostraram que a infecção é fatal em camundongos, coelhos, cobaias e aves, mas não em macacos-rhesus (*Macaca mulatta*), apresentando diferentes padrões de tropismo: no sistema nervoso central em camundongos e em órgãos viscerais em coelhos. Também foi constatada a existência de imunidade adquirida, incluindo imunidade tecidual e anticorpos protetores em macacos-rhesus, embora esses anticorpos não atuem diretamente contra o parasito em testes *in vitro*. (Sabin; Olitsky, 1937).

A toxoplasmose congênita humana foi confirmada experimentalmente ao identificar *T.gondii* em um recém-nascido com manifestações neurológicas fatais e ao reproduzir a infecção em animais por inoculação de tecidos cerebrais, observando lesões similares e o forte tropismo pelo sistema nervoso central. O parasito foi mantido por passagens seriadas, não se multiplicando em meios acelulares, o que reforça seu caráter intracelular obrigatório, além de apresentar

proteção cruzada com cepas de animais, confirmando a identidade do agente (Wolf; Cowen, 1939).

O carnivorismo foi proposto como uma importante via de transmissão de *T. gondii* , demonstrando experimentalmente que suínos se infectam por via oral ao ingerir roedores ou carne contaminada, desenvolvendo infecções crônicas persistentes, o que sugere um ciclo envolvendo roedores, suínos e humanos. O estudo também evidenciou que o parasito permanece viável em tecidos suínos refrigerados por períodos prolongados e resiste à digestão gástrica. Além disso, experimentos com macacos rhesus (*Macaca mulatta*) mostraram soroconversão após ingestão de alimento contaminado, confirmando a suscetibilidade de primatas à infecção oral e reforçando a hipótese de transmissão humana pelo consumo de carne crua ou malcozida (Weinman; Chandler, 1956).

Experimentos mostraram que gatos alimentados com tecidos contendo *T. gondii* eliminam nas fezes uma forma infectante resistente, capaz de causar infecção mesmo após longo tempo no ambiente. Essa descoberta levou à identificação dos oocistos e ao entendimento do ciclo do parasito em felinos (Hutchison, 1965).

Entre 1970 e 1971, foi esclarecido o ciclo biológico de *T. gondii* no gato doméstico, demonstrando que o parasito realiza ciclo sexuado no intestino felino, com formação e eliminação de oocistos que, após esporulação no ambiente, tornam-se altamente resistentes e infectantes para hospedeiros intermediários, nos quais ocorre apenas o ciclo assexuado com formação de cistos teciduais (Hutchison *et al.,* 1970; Hutchison *et al.,* 1971) . Os estudos consolidaram os felinos como hospedeiros definitivos e principais disseminadores ambientais do parasito, e foi confirmada a natureza coccidiana dos oocistos e sua classificação no Filo Apicomplexa (Dubey *et al.* 1970; Frenkel *et al.* 1970).

Após estudos experimentais, os felinos se tornaram os únicos hospedeiros capazes de eliminar oocistos de *T. gondii* nas fezes, caracterizando-se como hospedeiros definitivos, enquanto mamíferos e aves atuam exclusivamente como hospedeiros intermediários (Miller *et al.*, 1972). Evidências adicionais demonstram que felídeos silvestres também realizam o ciclo sexual do parasito, reforçando o papel de toda a família Felidae na manutenção ambiental da infecção (Jewell *et al.* 1972).

Em 1986, Dubey descreveu que o primeiro relato de infecção natural por *T. gondii* na espécie bovina foi em 1953, no estado de Ohio, Estados Unidos. Contudo, ao reavaliar os mesmos tecidos utilizados no estudo original, o autor não identificou a presença de parasitos compatíveis com coccídios ou quaisquer outros protozoários, levantando questionamentos quanto à real associação daqueles achados com *T. gondii* . Posteriormente, relatou o isolamento experimental do parasito no fígado, cérebro e pulmões de bovinos, inoculados pelas vias parenteral e oral com oocistos e cistos teciduais na Alemanha, no ano de 1966. Em 1992, o parasito foi encontrado em um homogeneizado do intestino delgado de uma vaca naturalmente infectada (Dubey, 1986; Gomes *et al.*, 2020)

A transmissão congênita em bovinos foi demonstrada em estudos experimentais, com a detecção do parasito na placenta e no conteúdo gástrico de fetos abortados. Em outro estudo, foi detectado no cérebro e na retina de três bezerras naturalmente expostas. Contudo, a toxoplasmose não é considerada uma importante causa de abortos ou natimortos em gado, mesmo que em condições naturais ou experimentais a transmissão transplacentária possa ocorrer, porém ainda não está claro se foi o protozoário que causou estes abortos (Gomes *et al.*, 2020; Stelzer *et al.*, 2019).

Esses avanços foram fundamentais para a compreensão atual da epidemiologia da toxoplasmose e serviram de base para os estudos modernos sobre suas vias de transmissão e impacto em saúde pública.

2.2. Ciclo biológico

O protozoário *T. gondii* é um parasito coccídio típico capaz de infectar e se replicar em praticamente todas as células nucleadas, com ciclo biológico complexo, que envolve reprodução sexuada e assexuada e apresenta três formas infectantes: esporozoítos em oocistos, que são eliminados no ambiente pelo hospedeiros definitivos, os taquizoítos, responsáveis pela fase aguda da infecção, e os bradizoítos, presentes em cistos teciduais, responsáveis na fase crônica da infecção. Parasito heteroxeno facultativo, tendo os felídeos como hospedeiros definitivos, além de também poder ser hospedeiro intermediário, e mamíferos e aves, incluindo os seres humanos, como hospedeiros

intermediários (Black; Boothroyd, 2000; Dubey, 2022; Hatam-Nahavandi *et al.*, 2021; Hill *et al.*, 2014; Wong; Remington, 1993).

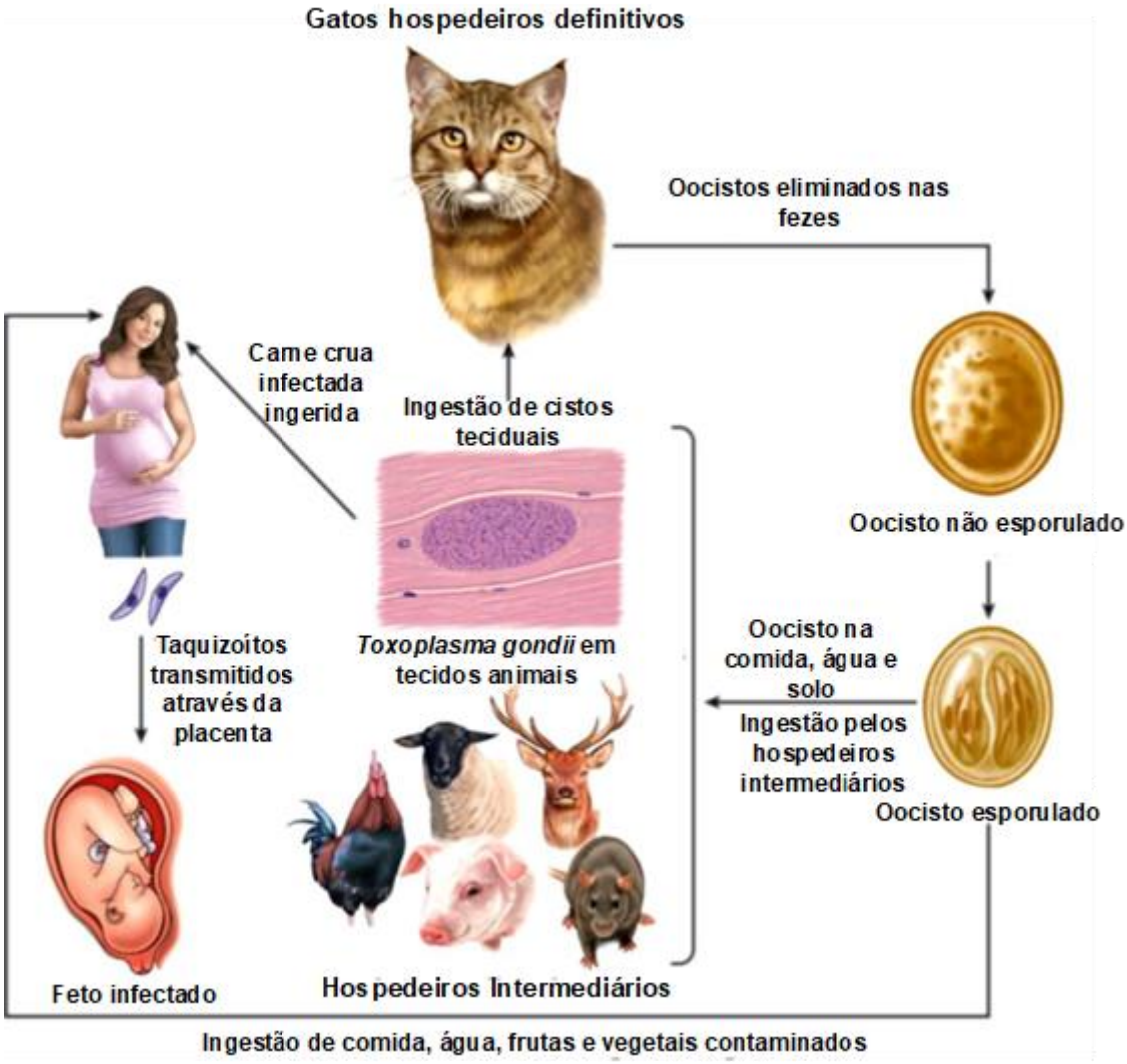
Os oocistos medem aproximadamente 10 µm × 12 µm e apresentam uma parede externa dupla, característica que lhes confere elevada resistência ambiental. Quando eliminados nas fezes dos felídeos, contêm apenas uma célula denominada esporonte, sendo, nesse estágio, não infectantes. A infectividade é adquirida após o processo de esporulação, que ocorre entre um e cinco dias, dependendo das condições ambientais, como umidade e temperatura. Após a esporulação, formam-se dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (Dubey, 1994; Hill *et al.*, 2014; Neves, 2004).

Os taquizoítos, termo derivado do grego “taqui” (rápido) e “zoíto” (forma de vida), medem aproximadamente 2 µm × 6 µm e apresentam estrutura celular complexa. Estes são formados por uma película externa associada a um complexo de membrana interna, composto por microtúbulos subpeliculares, anéis apicais, anéis polares e conóide. Essa forma é predominante nas infecções agudas, caracterizando-se pela elevada capacidade de invasão celular e multiplicação intracelular assexuada dentro da célula hospedeira (Black; Boothroyd, 2000; Dubey, 1994).

Os bradizoítos, termo derivado do grego “bradi” (lento) e “zoíto” (forma de vida), também denominados cistozoítos, correspondem ao estágio encistado do parasito nos tecidos. Apresentam morfologia semelhante à dos taquizoítos, porém com o núcleo localizado mais posteriormente. A maior prevalência de cistos ocorre em tecidos neurais e musculares, como cérebro, olhos, músculos esqueléticos e cardíacos, sendo menos frequentes em órgãos viscerais, como pulmões, fígado e rins. Essa forma marca o estabelecimento da fase crônica da infecção, mantendo-se intracelular e resultando da divisão lenta dos bradizoítos por endodiogenia (Black; Boothroyd, 2000; Dubey, 1986; Dubey, 2022).

O ciclo de vida do parasito inicia-se quando os felídeos ingerem oocistos esporulados presentes no solo ou na água contaminada, ou em tecidos contendo cistos com bradizoítos (**Figura 1**) (Hill *et al.*, 2014; Neves, 2004).

Figura 1. Descrição completa do ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* .



Fonte: (Dubey, 2022).

Após a ingestão, o parasito se aloja nas células epiteliais do intestino delgado, onde se inicia a fase assexuada, denominada merogonia. Nesse estágio, ocorre a formação de trofozoítos que, após sofrerem o processo de multiplicação por endodiogenia e esquizogonia, diferenciam-se em merozoítos, permanecendo organizados em estruturas denominadas merontes ou esquizontes maduros. Com a ruptura dos merontes, os merozoítos são liberados para a luz intestinal e invadem novas células epiteliais, dando início à fase sexuada do ciclo, denominada gamogonia (Hill *et al*., 2014; Neves, 2004).

Durante a gamogonia, parte dos merozoítos diferencia-se em macrogametócitos, que após maturação originam os macrogametas (gametas femininos imóveis), enquanto outra parte se diferencia em microgametócitos,

que amadurecem formando microgametas (gametas masculinos móveis). Os macrogametas permanecem no interior das células epiteliais, enquanto os microgametas migram para fecundá-los, resultando na formação do zigoto. Este, por sua vez, desenvolve uma parede externa dupla, originando o oocisto. Após alguns dias, a célula epitelial se rompe, permitindo a eliminação do oocisto imaturo nas fezes do hospedeiro definitivo. No ambiente, o oocisto passa pelo processo de esporogonia, que ocorre entre um e cinco dias, dependendo das condições ambientais, culminando na formação de dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada, tornando-se infectante (Hill *et al.*, 2014; Neves, 2004).

Nos hospedeiros intermediários, como os bovinos, a infecção ocorre pela ingestão de água contaminada ou de pastagens com oocistos esporulados. Após a ingestão, os esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos liberados iniciam intensa multiplicação intracelular. Na forma de taquizoítos, o parasito atravessa rapidamente o epitélio intestinal e invade diferentes tipos celulares, formando um vacúolo parasitóforo no qual ocorre a multiplicação por endodiogenia. Essa fase corresponde à fase proliferativa e aguda da doença, caracterizada pela ruptura das células infectadas e disseminação do parasito para novos tecidos (Neves, 2004; Silva *et al.*, 2006).

A disseminação sistêmica ocorre por meio dos taquizoítos livres, que alcançam a corrente sanguínea ou linfática, atingindo principalmente o sistema nervoso central, músculos esqueléticos, vísceras e olhos. Em indivíduos imunocompetentes, de forma geral, a resposta imune específica leva à redução ou interrupção da parasitemia, promovendo a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos e a formação de cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da infecção (Dubey, 2022; Neves, 2004; Silva *et al.*, 2006).

A presença do protozoário ou de seu DNA em tecidos bovinos já foi relatada em estudos experimentais e em condições naturais, sendo já relatados na literatura surtos de toxoplasmose por conta do consumo de carne bovina contaminada (Gomes *et al.*, 2020).

Em indivíduos imunocomprometidos, entretanto, a infecção pode evoluir de forma grave, podendo resultar em óbito. Além disso, em situações de imunossupressão, pode ocorrer a reativação dos cistos teciduais, levando à

reagudização da doença, com manifestações clínicas semelhantes às observadas na primo-infecção (Dubey, 2022; Neves, 2004; Silva *et al.*, 2006).

Entretanto, o *T. gondii* pode realizar a reprodução assexuada nos tecidos de felídeos, que passam a atuar como hospedeiros intermediários no ciclo da toxoplasmose. No início da infecção, os taquizoítos se multiplicam nos tecidos, principalmente no sistema nervoso central e na musculatura estriada, formando cistos com bradizoítos; esta seria a infecção crônica da doença. Em seguida, esses bradizoítos são liberados e penetram nas células epiteliais do intestino delgado, originando os esquizontes que formarão gamontes e, por fim, os oocistos, que são eliminados aos milhares nas fezes durante um período limitado, contaminando o solo e a água (Hatam-Nahavandi *et al.*, 2021), tornando principalmente os bovinos suscetíveis à infecção do parasito (Dubey; Jones, 2008) .

2.3. Patogenia

A patogenia da toxoplasmose está diretamente relacionada à capacidade do *T. gondii* de invadir, multiplicar-se e disseminar-se em diferentes tipos celulares do hospedeiro. Após a ingestão, oocistos e cistos teciduais resistem às condições do trato gastrointestinal e liberam esporozoítos ou bradizoítos, que atravessam o epitélio intestinal e iniciam o processo infeccioso (Dubey, 2022; Flores; Knoll, 2025).

Uma vez ultrapassada a barreira intestinal, o parasito invade células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas, utilizando dessas células como meio de disseminação pelo organismo. Nesse estágio, ocorre a diferenciação do parasito em taquizoítos, forma responsável pela fase aguda da infecção, caracterizada por intensa multiplicação intracelular e ampla distribuição tecidual. A disseminação pelo sangue e pela linfa permite que *T. gondii* alcance diversos órgãos e tecidos, incluindo linfonodos, fígado, pulmões, músculos esqueléticos, miocárdio, retina e sistema nervoso central, podendo resultar em manifestações clínicas variáveis (Dubey, 2022).

A resposta imune do hospedeiro exerce papel central na evolução da infecção. A imunidade celular, especialmente mediada por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, citocinas como o interferon-gama (IFN-γ) e a ativação de macrófagos, é essencial para o controle da multiplicação dos taquizoítos (Dubey, 2022; Flores; Knoll, 2025) e a diferenciação destes em bradizoítos, culminando na formação de cistos teciduais (Dubey, 2022; Lüder, 2024).

Esses cistos se localizam predominantemente no sistema nervoso central, na musculatura esquelética, no miocárdio e nos tecidos oculares, caracterizando a fase crônica da infecção. A manutenção desse estado de latência depende do equilíbrio entre a persistência parasitária e a vigilância imunológica contínua, na qual o IFN-γ exerce papel central ao limitar a replicação e prevenir a reativação do parasito. Os cistos teciduais representam uma estratégia adaptativa essencial para a sobrevivência de *T. gondii* , permitindo sua permanência prolongada no hospedeiro e favorecendo a transmissão ao longo da cadeia alimentar, especialmente entre hospedeiros intermediários (Dubey, 2022; Lüder, 2024).

Em situações de imunossupressão, como em indivíduos portadores de doenças imunodebilitantes, pacientes transplantados ou em uso de terapias imunossupressoras, pode ocorrer a reativação da infecção crônica. A redução da resposta imune mediada por células T e IFN-γ compromete o controle da replicação parasitária, favorecendo a ruptura dos cistos teciduais e a liberação de bradizoítos, que se diferenciam novamente em taquizoítos. Essa retomada da multiplicação intracelular resulta em intensa parasitemia e dano tecidual significativo, particularmente no sistema nervoso central, onde pode desencadear encefalite toxoplásmica. A reativação também pode acometer tecidos oculares e outros órgãos, configurando formas clínicas graves e potencialmente fatais, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Dubey, 2022; Lüder, 2024).

Durante a gestação, a patogenia da toxoplasmose adquire relevância particular, uma vez que os taquizoítos podem atravessar a barreira placentária e infectar o feto. A gravidade da infecção congênita está relacionada ao período gestacional no qual ocorre a infecção materna, sendo mais severa quando adquirida no início da gestação. As manifestações incluem alterações

neurológicas, oculares e sistêmicas, reforçando a importância do diagnóstico precoce e do acompanhamento pré-natal. A patogênese envolve invasão do trofoblasto, resposta inflamatória local e desequilíbrio imunológico na interface materno-fetal, fatores que contribuem para dano tecidual e comprometimento do desenvolvimento fetal (Flores; Knoll, 2025; Lüder, 2024).

Em animais de produção, a patogenia da toxoplasmose apresenta características semelhantes às observadas em humanos, variando conforme a espécie, a carga parasitária e o estado fisiológico do animal. Em bovinos, a infecção geralmente ocorre de forma subclínica, com formação de cistos teciduais e baixa ocorrência de manifestações clínicas evidentes, embora sua relevância epidemiológica esteja relacionada ao potencial papel na cadeia de transmissão e ao risco à saúde pública. Esses aspectos reforçam a importância da toxoplasmose sob a perspectiva de Saúde Única, considerando sua interface entre produção animal, segurança alimentar e saúde humana (Dubey, 2022; Farhab, 2025; Silva *et al.*, 2015).

A compreensão dos mecanismos patogênicos do *T. gondii* é fundamental para o entendimento da dinâmica da infecção, da persistência do parasito no hospedeiro e das diferentes formas de transmissão. Esses aspectos ressaltam a importância da toxoplasmose como uma zoonose de ampla distribuição mundial, com impacto tanto na saúde humana quanto na produção animal, justificando a adoção de medidas de prevenção e controle ao longo da cadeia produtiva (Gomes *et al.*, 2020).

2.4. Epidemiologia da toxoplasmose em bovinos

Dentre as diversas vias de transmissão descritas, a transmissão horizontal ocorre predominantemente pela ingestão de cistos teciduais presentes em tecidos de hospedeiros intermediários ou pela ingestão acidental de oocistos presentes no ambiente e em alimentos contaminados (Dubey, 1994).

Em humanos, a infecção por *T. gondii* ocorre principalmente pela ingestão de água ou alimentos contaminados, como carne crua ou mal cozida e vegetais mal higienizados. Contudo, *T. gondii* não é detectado pelos procedimentos

rotineiros de inspeção sanitária, o que reforça a importância do correto processamento e preparo dos alimentos. O abate clandestino representa um fator adicional de risco para a transmissão do parasito (Brasil, 2018; Groot, 2021; Olsen *et al.*, 2019).

A principal via de transmissão do *T. gondii* em bovinos ocorre pela ingestão de ração, água contaminadas e pastagens contaminadas com oocistos, especialmente em sistemas de criação extensivos, amplamente utilizados no Brasil. Essas condições favorecem a infecção da espécie, que, apesar de apresentar resistência ao parasito, pode se infectar e não desenvolver os sinais clínicos evidentes (Stelzer *et al.*, 2019).

O Brasil é o maior produtor comercial de gado bovino do mundo, e a soroprevalência de anticorpos anti- *T. gondii* do rebanho brasileiro, com base em estudos realizados de 1978 a 2018 (**Quadro 1**), varia de 1 a 89,1%, dependendo da região avaliada (Gomes *et al.*, 2020).

Quadro 1. Estudos sorológicos da presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos do Brasil realizados entre 1978 e 2018.

Região/ Estado	Nº animais	% positivos	Método diagnóstico	Cut-off	População (idade em meses/sexo /raça ou aptidão)*	Referência
Região Norte						
Amazonas	25	12	IHA	128	-	Ferraroni *et al.* (1980)
Pará	765	87.4	ELISA	200**	36/ - / Nelore	Silva *et al.* (2015)
Pará	500	40.6	RIFI	64	-/M e F/Corte	Carmo *et al.* (2017)
Pará	500	52.0	RIFI	64	36/F/-	Silva *et al.* (2017)
Pará	1749	34.4	ELISA	200**	0–24/M e F/ -	Oliveira *et al.* (2018)
Pará	1749	44.1	RIFI	64	0–24/M e F/ -	Oliveira *et al.* (2018)
Rondônia	1000	5.3	RIFI	64	- / - / Corte	Souza *et al.* (2016)
Tocantins	508	87.7	ELISA	200**	36/ - / Nelore	Silva *et al.* (2015)

Região Nordeste						
Bahia	194	1.0	LAT	64	- / -/ Corte/leite	Gondim *et al.* (1999)
Bahia	600	11.8	RIFI	64	-/M e F/-	Spagnol *et al.* (2009)
Bahia	100	26.0	RIFI	50	- /- / Nelore/ mestiço	Santos *et al.* (2010)
Bahia	92	25.2	RIFI	64	-	Passos (1984)
Pernambuco	100	3.0	RIFI	64	-	Costa *et al.* (2012)
Pernambuco	427	16.6	RIFI	64	0–36/M e F/-	Guerra *et al.* (2014)
Pernambuco	140	10.7	RIFI	64	-/M e F/-	Magalhães *et al.* (2016)
Região Centro-Oeste						
Mato Grosso	516	73.0	ELISA	200**	36/- / Nelore	Silva *et al.* (2015)
Mato Grosso	2000	71.0	RIFI	64	-/F /Leite	Santos *et al.* (2009)
Mato Grosso do Sul	466	4.3	IHA	64	-/-/Corte	Araújo *et al.* (1998)
Mato Grosso do Sul	388	5.1	DAT	25	-	Marques *et al.* (2009)
Goiás	119	89.1	ELISA	200**	>24/ F/ Curraleiro e outros	Santin *et al.* (2017)
Goiás	32	10.9	RIFI	64	-	Passos (1984)
Região Sudeste						
Minas Gerais	740	10.2	RIFI	64	-	Passos (1984)
Minas Gerais	350	12.0	RIFI	64	-	Costa; Costa (1978)
Minas Gerais	1195	2.6	RIFI	64	-/M e F/Gir	Fajardo *et al.* (2013)
São Paulo	204	32.3	RIFI	64	-	Costa *et al.* (1978)
São Paulo	50	18.0	RIFI	64	-/ F/-	Costa *et al.* (2011)
São Paulo	200	11.0	ELISA	100**	-	Meireles *et al.* (2003)

Rio de Janeiro	589	14.7	RIFI	64	>36/F/-	Albuquerque *et al.* (2011)
Rio de Janeiro	459	1.9	RIFI	64	-/M e F/-	Luciano *et al.* (2011)
Rio de Janeiro	77	49.4	ELISA	500**	-/M e F/-	Frazão-Teixeira & Oliveira (2011)
Região Sul						
Paraná	503	48.5	RIFI	64	-/M e F/ Leite	Marana *et al.* (1995)
Paraná	400	25.8	RIFI	64	-/M e F/ holandês/mestiço	Garcia *et al.* (1999)
Paraná	348	41.4	RIFI	64	-/M e F/-	Daguer *et al.* (2004)
Paraná	385	26.0	RIFI	64	- /- /Leite	Ogawa *et al.* (2005)
Paraná	250	30.8	RIFI	64	- /- / Corte	Moura *et al.* (2010)
Santa Catarina	120	29.1	RIFI	50	- / F/ Holandês/ Jersey	Macedo *et al.* (2012)
Rio Grande do Sul	112	5.4	IHA	64	-	Chaplin *et al.* (1984)
Rio Grande do Sul	134	6.7	IHA	64	-	Braccini *et al.* (1992)
Rio Grande do Sul	532	3.4	IHA	64	-	Silva *et al.* (1983)
Rio Grande do Sul	121	17.4	RIFI	64	-/ M e F/Charolês	Santos *et al.* (2013)

*Quando descrito no estudo; **diluição do soro; DAT = Teste de Aglutinação Direta; ELISA = ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked Immunosorbent Assay); RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta; IHA = *Hemaglutinação Indireta;* LAT = Teste de Aglutinação em Látex; F = fêmea; M = macho

Fonte: (Gomes *et al.*, 2020).

Estudos realizados no país demonstram frequência de anticorpos contra *T. gondii* de 45,5% na região Norte, 42,2% no Centro-Oeste, 23,4% no Sul, 17%

no Sudeste e 13,4% no Nordeste, evidenciando que a infecção pelo parasito possui relevância para a saúde pública brasileira e não deve ser negligenciada (Gomes *et al.*, 2020).

Esses dados demonstram a elevada capacidade de disseminação e adaptação do *T. gondii* em áreas tropicais e subtropicais, com registros de exposição em bovinos nas cinco regiões do Brasil, abrangendo todos os biomas e pelo menos 15 dos 27 estados brasileiros, reforçando a ampla distribuição do parasito no território nacional (Gomes *et al.*, 2020).

2.4.1. *Toxoplasma gondii* no leite bovino e relatos de surtos

A ocorrência de *T. gondii* em leite bovino ainda é pouco estudada, sendo a transmissão por meio do leite *in natura* bem estabelecida principalmente na espécie caprina (Deljavan *et al.*, 2022; Fatmawati *et al.*, 2022). No entanto, não se pode descartar o risco de transmissão da toxoplasmose pelo consumo de leite bovino não pasteurizado (Khan *et al.*, 2023).

Os poucos estudos disponíveis sobre a infecção por *T. gondii* em bovinos no Brasil indicam que essa espécie é suscetível à infecção, mas apresenta relativa resistência à doença clínica, sendo capaz de eliminar o parasito ou reduzi-lo a níveis indetectáveis em algumas semanas. No entanto, há dificuldades significativas para o isolamento do parasito a partir da carne ou do leite desses animais (Costa *et al*., 2011; Rocha *et al*., 2015; Dubey; Jones, 2008; Gomes *et al*., 2020; Millar *et al*., 2008; Razooqi *et al*., 2022).

A maioria das pesquisas relacionadas à infecção por *T. gondii* em bovinos no Brasil é restrita a estudos de soroprevalência, sendo a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) o método diagnóstico sorológico mais utilizado. Essa limitação metodológica dificulta a compreensão mais aprofundada da epidemiologia do parasito em bovinos e de suas implicações para a saúde humana (Gomes *et al.*, 2020).

O leite não pasteurizado ou processado inadequadamente, bem como seus subprodutos, constitui importante fonte alimentar em áreas rurais e

urbanas, sendo frequentemente comercializado de forma informal ou clandestina (Badini *et al.*,1996).

Estudos demonstram que o leite contaminado com taquizoítos pode causar toxoplasmose em humanos, uma vez que essas formas são capazes de manter a infectividade em fluido gástrico simulado sob diferentes níveis de acidez, sobrevivendo por 90 minutos a pH 5,0 e 6,0, apesar de serem sensíveis ao pH ácido do estômago (Koethe *et al.*, 2017).

Além da presença de taquizoítos no leite, também pode ocorrer a excreção de cistos teciduais durante o período pré-lactação. As células mamárias podem abrigar cistos de *T. gondii* , os quais podem ser secretados por exocitose, revestidos por membranas de células hospedeiras, possibilitando a contaminação do leite no interior da glândula mamária. Devido à baixa concentração de enzimas proteolíticas no intestino de crianças e animais lactentes, o parasito pode permanecer viável e ser transmitido por essa via (Boughattas, 2015).

Em crianças em fase de amamentação, especialmente quando a mãe adquire a infecção e em áreas rurais, a transmissão de *T. gondii* pelo leite tem sido atribuída à presença de taquizoítos e, possivelmente, à excreção de cistos teciduais pela glândula mamária, evidenciando o potencial do leite como via de transmissão do parasito (Boughattas, 2015).

Na China, Liu *et al.* (2022) analisaram 894 amostras de leite cru bovino por ELISA para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* , observando soropositividade de 6,38% (57/894). No Egito, Fereig *et al.* (2022), utilizando o mesmo método de diagnóstico, realizaram um estudo em que foram colhidas 126 amostras de leite cru de bovinos, obtendo soropositividade de 2,4% (3/126).

No Paquistão, 50 amostras de leite cru de vacas foram testadas pela PCR convencional para detectar a presença do DNA de *T. gondii* , tendo-se obtido 10/50 (20%) amostras positivas (Khan *et al.*, 2023). No Irã, foram coletadas 55 amostras de leite de gado leiteiro, também usando o mesmo método diagnóstico, obtendo-se 2/55 (3,63%) amostras positivas (Asiyabi Aghdam *et al.*, 2022).

Embora a investigação de *T. gondii* em leite *in natura* seja mais frequente na espécie caprina, na qual já foram demonstrados o potencial de transmissão do parasito e os impactos produtivos, ainda são escassos os dados referentes à presença do parasito no leite cru bovino (Deljavan *et al.*, 2022; Fatmawati *et al.*, 2022).

O primeiro surto de toxoplasmose humana relatado foi associado à transmissão por oocistos, ocorrido em 1977 nos Estados Unidos, envolvendo cerca de 37 pessoas que frequentavam um centro de equitação com gatos presentes. Após descartarem a transmissão por carne contaminada, os autores identificaram intensa contaminação ambiental por fezes felinas contendo oocistos, que, misturados à poeira do solo, foram inalados ou ingeridos acidentalmente, evidenciando a importância da via ambiental na transmissão da infecção (Teutsch *et al*., 1979).

No Brasil, o primeiro surto de que se tem registro ocorreu em Santa Isabel do Ivaí, Paraná, entre 2001 e 2002, onde afetou 155 indivíduos com sintomas clínicos, sendo a principal via de transmissão a água contaminada com oocistos de *T. gondii* , proveniente de um reservatório que não era devidamente protegido nem filtrado. Os pacientes apresentaram sintomas típicos como febre, linfadenopatia, cefaleia e mialgia. Além disso, houve complicações oculares em parte dos infectados, incluindo retinite, com lesões que em alguns casos persistiram ou surgiram posteriormente. O surto também impactou mulheres gestantes com a ocorrência de transmissão congênita, abortos e recém-nascidos infectados, alguns com sequelas neurológicas e oculares a longo prazo (Dubey *et al.*, 2021).

Outro surto ocorreu em Montes Claros, em Goiás, onde foi epidemiologicamente associado ao consumo de queijo artesanal feito com leite cru, porém, como as condições da propriedade eram insalubres, a produção acabou sendo interditada pelas autoridades. No entanto, sugere-se que a contaminação não veio diretamente do leite em si, mas sim do uso de água contaminada com oocistos durante a produção dos subprodutos (Dubey *et al.*, 2021). Porém, não há relatos de surtos que estejam comprovadamente relacionados diretamente ao consumo de leite contaminado.

A toxoplasmose tem grande importância sanitária, pois está diretamente relacionada à gravidade das manifestações clínicas em grupos populacionais vulneráveis. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção costuma ser assintomática ou apresentar sinais inespecíficos. Entretanto, pode causar manifestações clínicas graves em indivíduos imunossuprimidos, gestantes, fetos e neonatos, levando a quadros clínicos variados em diferentes espécies e, em casos severos, à morte (Elsheikha *et al.,* 2020; Montoya; Liesenfeld, 2004).

2.5. Sintomatologia em bovinos e humanos

Os bovinos, de modo geral, apresentam infecção assintomática por *T. gondii* . Entretanto, estudos experimentais realizados em bezerros de 3 anos de idade inoculados por via oral com oocistos e cistos teciduais demonstraram a ocorrência de sinais clínicos como febre, dificuldade respiratória, secreção nasal e hiperemia das conjuntivas (Costa *et al.*, 1977). Além disso, há relatos isolados de toxoplasmose em bovino naturalmente infectado, em que foram encontradas lesões graves no mesentério intestinal e nos linfonodos mesentéricos, lesões inflamatórias no fígado com os hepatócitos repletos de taquizoítos e cistos teciduais no parênquima, pneumonite e nefrite focais, e taquizoítos nos bronquíolos, glomérulos renais e túbulos renais (Dubey; Julian, 2025).

Em indivíduos imunocompetentes e mulheres não grávidas, a infecção é assintomática, variando conforme fatores como idade, hábitos alimentares, padrões culturais e procedência urbana ou rural. Quando assintomática, pode manifestar-se por quadros gripais, como febre, dores de cabeça e musculares, que se curam espontaneamente em um curto espaço de tempo, linfoadenopatia e, em casos mais graves, o parasito pode acometer órgãos vitais como pulmão, coração e fígado, além da forma ocular caracterizada por coriorretinite aguda ou crônica (Silva *et al.*, 2006; Wesołowski *et al.,* 2023).

Em indivíduos imunossuprimidos, como pessoas vivendo com HIV/AIDS ou em quimioterapia, como pacientes transplantados ou portadores de doenças debilitantes, a toxoplasmose pode evoluir para quadros graves incluindo cegueira, hepatite, pneumonite e lesões cerebrais, com o risco de óbito,

elevando significativamente a morbidade e a mortalidade associadas à doença (Garweg *et al*., 2022; Silva *et al*., 2006; Wesołowski *et al.,* 2023).

A infecção congênita pode ocorrer quando a fêmea gestante é primoinfectada ou pela reagudização da infecção durante a gestação em situações de imunossupressão. Durante a parasitemia, *T. gondii* atravessa a placenta e invade os tecidos fetais em desenvolvimento (Dubey, 1994). O risco de transmissão aumenta com a idade gestacional, variando de 10-25% no primeiro trimestre, 30-45% no segundo trimestre, 60-65% no terceiro trimestre e podendo chegar a 80% próximo do parto. Apesar disso, a gravidade da infecção fetal é maior quando a transmissão ocorre no início da gestação (Rodrigues *et al*., 2022).

A infecção no primeiro trimestre pode resultar em abortamentos; no segundo trimestre, também podem ocorrer abortos ou nascimentos prematuros sem anormalidades ou com anomalias graves; no terceiro trimestre, o bebê pode nascer normal e manifestar a doença após alguns dias, semanas ou meses. A toxoplasmose congênita ocorre principalmente quando a infecção é adquirida durante a gestação, sendo rara em infecções anteriores, exceto em gestantes gravemente imunossuprimidas ou reinfectadas por cepas mais virulentas. Dada a gravidade da doença, a toxoplasmose gestacional é de notificação compulsória no Brasil (Brasil, 2018; Neves *et al*., 2004; Rodrigues *et al*., 2022).

2.6. Diagnóstico

Para o diagnóstico da toxoplasmose, *T. gondii* pode ser isolado durante a fase aguda da infecção ou em episódios de reativação, a partir de diferentes tipos de amostras biológicas, como sangue, líquido cefalorraquidiano, leite, saliva, medula óssea, fragmentos de placenta, além de materiais procedentes de infiltrados cutâneos, baço, fígado, músculos e linfonodos (Sampaio *et al.*, 2015).

O diagnóstico da infecção pode ser realizado por métodos biológicos, sorológicos, histológicos ou por combinações entre essas abordagens, de

acordo com a fase da infecção, a espécie hospedeira e a finalidade do diagnóstico (Dubey, 2022).

Os métodos sorológicos são amplamente utilizados para detecção de anticorpos contra *T. gondii* , podendo empregar amostras de sangue total, plasma, soro, leite, fluidos corporais e suco de carne. Dentre os principais testes sorológicos destacam-se o Sabin–Feldman Dye Test (DT), Teste de Hemaglutinação Indireta (IHA), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), Teste de Aglutinação em Látex (LAT), Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Alguns desses métodos, como RIFI, ELISA e MAT, foram modificados para permitir a detecção de anticorpos da classe IgM, associados à infecção recente (Dubey, 2022).

A detecção de DNA de *T. gondii* pode ser realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e Nested PCR, utilizando diferentes marcadores genéticos. A PCR tem se mostrado como um método simples, reprodutível e de custo relativamente baixo, podendo ser aplicada tanto em animais quanto em humanos. Diversos estudos demonstram sua elevada sensibilidade, especificidade e precisão quando comparada aos métodos tradicionais, representando um avanço significativo no diagnóstico da toxoplasmose (Dehkordi *et al.*, 2013; Dubey, 2022; Su *et al.*, 2010).

Apesar dos avanços nas técnicas diagnósticas, a principal ferramenta para o diagnóstico da toxoplasmose ainda é a detecção de anticorpos no soro sanguíneo, que apresenta concentração elevada e estável de IgG. No entanto, já foram descritas limitações importantes, como a ausência de correlação entre a resposta sorológica positiva e a presença de cistos viáveis de *T. gondii* no tecido muscular, o que pode dificultar a interpretação dos resultados diagnósticos (Burrells *et al.*, 2018; Sampaio *et al.*, 2015).

2.7. Prevenção e controle

Em seres humanos, a prevenção da toxoplasmose baseia-se principalmente em medidas higiênico-sanitárias. Recomenda-se a lavagem das mãos com água e sabão após o manuseio das carnes cruas, bem como a

higienização adequada de tábuas de corte, pias, facas e demais utensílios que tenham entrado em contato com carne crua (Dubey, 2022; Neves, 2004).

A caixa de areia dos gatos deve ser esvaziada diariamente, preferencialmente com o uso de luvas, e higienizada com água quente. O uso de luvas durante atividades de jardinagem ou manuseio do solo é indicado, assim como a lavagem cuidadosa de frutas, verduras e legumes antes do consumo. A ingestão de água potável filtrada ou engarrafada também é recomendada. Para gestantes, é fundamental a realização do acompanhamento pré-natal, independentemente de histórico prévio de linfadenite ou abortamento (Dubey, 2022; Neves, 2004).

Toda carne destinada ao consumo humano ou animal deve ser completamente cozida, atingindo temperatura interna mínima de 66 °C. Deve-se evitar provar carnes cruas durante o preparo ou o tempero. O congelamento da carne a temperaturas iguais ou inferiores a −12 °C pode inativar cistos teciduais do parasito. Gestantes devem evitar o contato com solo potencialmente contaminado e com carnes cruas ou malcozidas (Dubey, 2022; Neves, 2004).

Em locais de criação leiteira devem ser adotadas medidas que incluam práticas de higiene e o uso de tecnologias que garantam a produção de alimentos seguros. O leite cru, antes de ser consumido, deve passar por adequada pasteurização (Manzini *et al.*, 2024) para a produção de derivados (queijo, manteiga) para comercialização, tendo em vista que pequenos produtores de agricultura familiar comercializam estes produtos como uma fonte de renda adicional (Barcellos *et al.,* 2019).

Em relação aos gatos, para evitar contaminação ambiental, as medidas profiláticas incluem alimentar gatos exclusivamente com ração seca, enlatada ou alimentos cozidos, evitando assim o fornecimento de carne crua ou malcozida, vísceras ou ossos. Recomenda-se manter os gatos restritos ao ambiente domiciliar, a fim de prevenir a caça de presas potencialmente infectadas. As lixeiras devem permanecer devidamente fechadas para impedir o acesso dos animais a restos alimentares. O controle populacional de gatos, por meio da castração, também é uma estratégia importante para reduzir a disseminação do parasito no ambiente (Dubey, 2022).

Para animais de produção, a prevenção da toxoplasmose envolve a remoção imediata de carcaças ou outros animais mortos, evitando a necrofagia por gatos. Fetos abortados devem ser manuseados com o uso de equipamentos de proteção individual, como luvas, e descartados adequadamente por meio de enterramento ou incineração. Deve-se impedir o acesso de gatos e outras espécies animais a instalações onde se encontram os bovinos, bem como manter alimentos, como grãos e rações, armazenados de forma adequada e protegidos da contaminação por oocistos (Dubey, 2022). Além disso, manter diariamente equipamentos e sala de ordenha limpos e higienizados.

2.8. *Toxoplasma gondii* e sua relevância em saúde pública

A toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais amplamente distribuídas no mundo e representa um importante problema de saúde pública global. Estima-se que aproximadamente 30% da população mundial esteja infectada por *T. gondii* , com taxas de prevalência que variam de acordo com fatores geográficos, climáticos, socioeconômicos e culturais, podendo alcançar índices superiores a 60% em determinadas regiões, como em países da Europa Ocidental e da América Latina. Apesar da maioria das infecções ocorrer de forma assintomática, a elevada prevalência e a ampla dispersão do parasito conferem à toxoplasmose um impacto epidemiológico significativo, frequentemente subestimado, caracterizando-a como uma doença negligenciada do ponto de vista da saúde pública (Dubey, 2022; Hajj *et al.*, 2021; Rostami *et al.*, 2020; Rouatbi *et al.*, 2017).

Nesse cenário, a toxoplasmose deve ser compreendida sob a perspectiva do conceito de Saúde Única (*One Health*), que reconhece a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental. Estratégias de controle e prevenção da infecção por *T. gondii* demandam ações integradas, incluindo a adoção de boas práticas agropecuárias, o controle da população de felinos, a melhoria das condições de saneamento básico, a educação sanitária de produtores e consumidores e o fortalecimento da vigilância epidemiológica (Aguirre *et al.*, 2019; Dubey, 2022; Hajj *et al.*, 2021).

Dessa forma, estudos que investigam a presença de *T. gondii* em alimentos, como o leite bovino, possuem grande relevância em saúde pública, pois contribuem para a identificação de riscos emergentes, subsidiam políticas de segurança alimentar e auxiliam na implementação de medidas preventivas eficazes. A detecção do parasito no leite reforça a necessidade de pasteurização e do cumprimento rigoroso das normas higiênico-sanitárias, visando à proteção da saúde coletiva e à redução da transmissão da toxoplasmose por via alimentar.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a presença de *Toxoplasma gondii* em leite cru de vacas em lactação, procedentes de assentamentos rurais da região Noroeste do Estado de São Paulo.

3.2. Objetivos específicos

- Utilizar técnicas moleculares para detecção de *Toxoplasma gondii* a partir de amostras de leite de tetos de vacas em lactação;
- Realizar o sequenciamento genético das amostras positivas;
- Realizar análise estatística dos testes utilizados;
- Proceder à análise espacial dos assentamentos rurais com animais positivos;
- Criação de folder educativo para ser entregue aos proprietários dos assentamentos e à população residente na região.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Comitê de Ética

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética – CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP sob o número 000.206/2024 (**Anexo 1**).

4.2. Local de realização dos exames

O procedimento molecular de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR foi realizado junto ao Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia no Diagnóstico de Tuberculose e Doenças de Importância em Saúde Única, Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva – FMVZ – UNESP, Botucatu. As reações de sequenciamento foram realizadas em laboratório particular.

4.3. Seleção dos animais e propriedades leiteiras

No estado de São Paulo estão cadastrados 11.278.984 bovinos, sendo 399.121 nos sete municípios onde foram realizadas as coletas (IBGE, 2024).

O tamanho amostral foi calculado com base na estimativa de proporção populacional, utilizando a seguinte fórmula:

$$n = \left(\frac{z_{\frac{\alpha}{2}} \sqrt{p(1-p)}}{\varepsilon} \right)^2$$

em que:

- n : número mínimo de amostras;
- $Z_{\alpha/2}$: valor crítico da distribuição normal correspondente ao nível de confiança adotado;

- p: prevalência estimada da infecção;
- ε : margem de erro admitida.

O nível de confiança adotado foi de 95% (Z=1,96), margem de erro de 5% (ε=0,05) e prevalência estimada de 89,1% para *Toxoplasma gondii* , conforme descrito por Gomes *et al.* (2020). Substituindo-se os valores na fórmula:

$$n = \left(\frac{1{,}96\sqrt{0{,}891(1-0{,}89)}}{0{,}05} \right)^2$$

obteve-se tamanho amostral mínimo de 150 amostras. O cálculo foi realizado assumindo amostragem aleatória simples e distribuição normal aproximada para a proporção.

Inicialmente os produtores assentados foram contactados pelos técnicos da Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo (ITESP) e informados dos objetivos do estudo. Aqueles que consentiram a autorização para que amostras de leite do seu rebanho fossem coletadas foram incluídos no estudo. Em cada propriedade, foram amostradas vacas em lactação disponíveis no momento da visita. A escolha dos animais foi realizada por conveniência, considerando a disponibilidade de animais aptos para a coleta e a indicação do produtor, não sendo adotado procedimento de seleção aleatória pelo pesquisador.

A área estudada foi a região Noroeste do Estado de São Paulo, tendo sido coletado um total de 160 amostras de leite bovino. Sete (07) municípios (**Figura 2**) foram avaliados, totalizando 29 propriedades dentro de 20 assentamentos rurais (**Figura 3**), os quais apresentavam no máximo 20 animais em cada um, realizando-se a amostragem de oito (08) animais por propriedade, quando apenas foi visitada uma propriedade por assentamento. Em casos em que foram visitadas duas propriedades por assentamento, foram coletadas quatro amostras de cada, totalizando oito (08) animais. A distribuição do número de assentamentos por município pode ser visualizada na **Figura 4**.

Figura 2. Mapa do Estado de São Paulo com destaque para os municípios com animais amostrados no estudo.

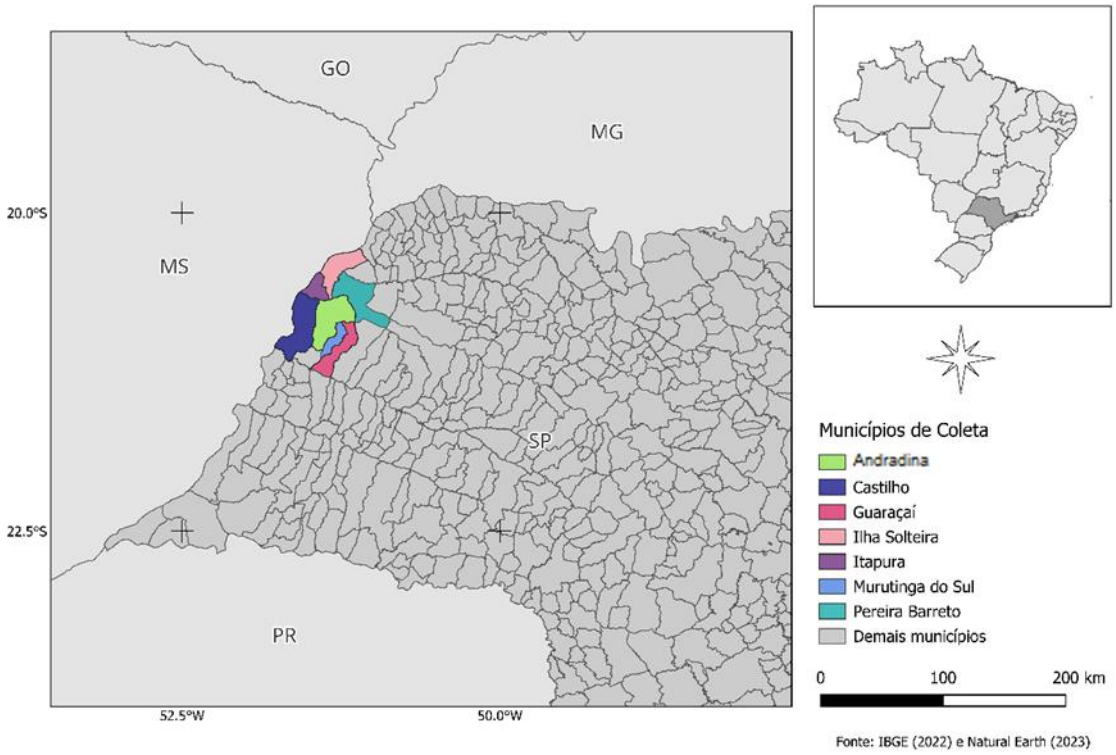


Figura 3. Mapa do Estado de São Paulo com a distribuição dos assentamentos utilizados no estudo em seus respectivos municípios.

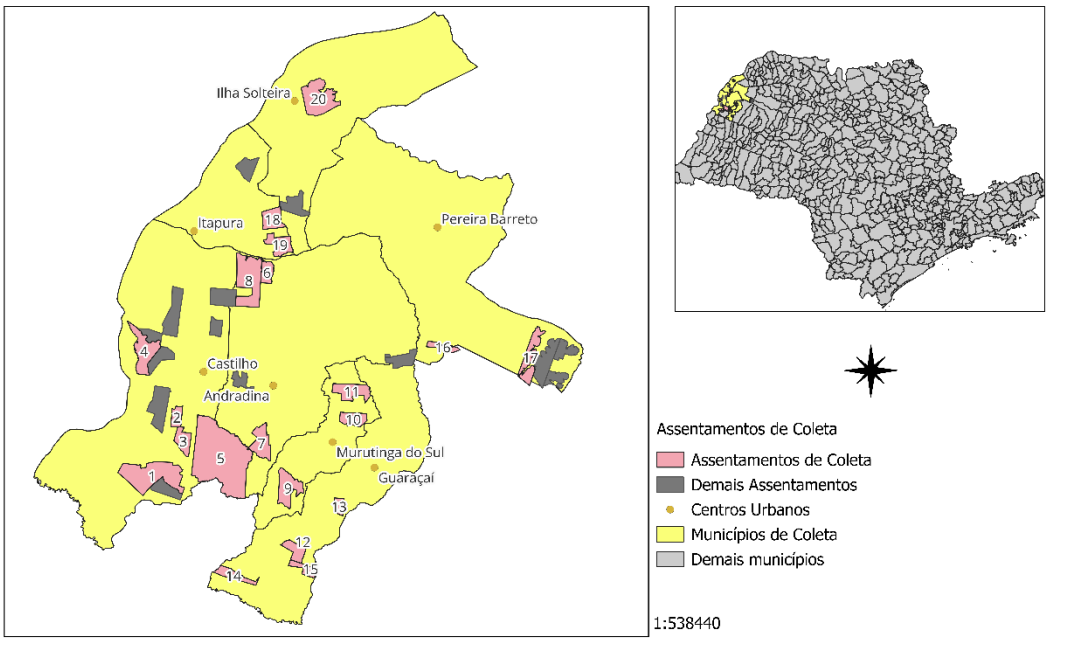
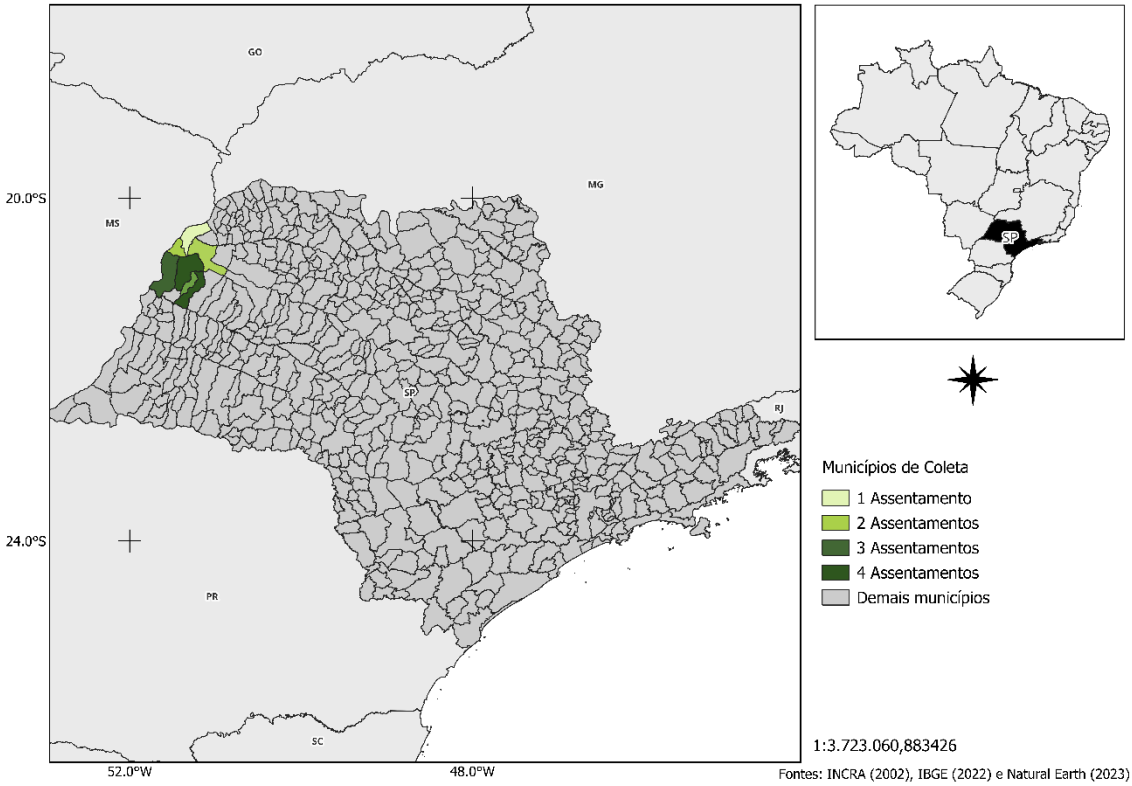


Figura 4. Mapa do Estado de São Paulo com destaque para o número de assentamentos dentro de cada município amostrado no estudo.



No **Quadro 2**, podemos visualizar o número de animais e propriedades rurais por 20 assentamentos amostrados e distribuídos em sete municípios da região Noroeste do estado de São Paulo: Andradina, Castilho, Guaraçaí, Ilha Solteira, Itapura, Murutinga do Sul e Pereira Barreto.

Quadro 2. Número de animais e propriedades rurais por assentamentos amostrados e distribuídos em sete municípios da região Noroeste do estado de São Paulo, para coleta de leite de vacas em lactação, para pesquisa de *Toxoplasma gondii* .

Município	Assentamento	Nº de propriedades	Número total de amostras coletadas
Andradina	Primavera	2	32
	Fazenda São Sebastião	2	
	Timboré	2	
	Josué de Castro	1	
Castilho	Rio Paraná	2	32
	Pendengo	1	
	N. S. Aparecida II	1	
	Terra Livre	1	
Guaraçaí	Nova Vila	1	32
	Moinho	1	
	São José	1	
	Aroeira	1	
Ilha Solteira	Estrela da Ilha	2	8
Itapura	Roseli Nunes	1	16
	Zumbi dos Palmares	1	
Murutinga do Sul	Orlando Molina	2	24
	Santa Cristina	2	
	Dois Irmãos	2	
Pereira Barreto	Esmeralda	2	16
	Terra é Vida	1	
Total	20	29	160

4.4. Coleta do leite

As amostras de leite foram coletadas a partir dos quatro tetos de vacas em lactação, com o auxílio de tubo Falcon estéril de 15 mL, sendo o *pool* dos

quatro tetos considerado uma amostra. As amostras foram imediatamente armazenadas sob refrigeração até a chegada ao laboratório e armazenadas em freezer a –20 °C até o processo de extração de DNA.

4.5. Extração do DNA a partir das amostras de leite para pesquisa de *Toxoplasma gondii*

Para as amostras de leite, foi utilizado o Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (Cytiva®), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante e modificações de Cunha *et al.* (2006) (**Anexo 2**).

4.6. Análise de pureza

Após a extração, as amostras de DNA foram submetidas à análise de pureza e quantificação de ácidos nucleicos utilizando o equipamento NanoDrop (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, Thermo Fisher), no Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP Botucatu. As leituras foram realizadas em duplicata utilizando 2 µL de cada amostra e como branco, 2 µL de água livre de nuclease (**Anexo 3**).

4.7. Exames moleculares

4.7.1. Controle Endógeno de Extração

Após a extração, todas as amostras foram testadas para um controle endógeno de extração, que corresponde a um gene constitutivo presente em cada amostra testada (Livak; Schmittgen, 2001).

Como controle endógeno, foi utilizado um fragmento conservado da β-hemoglobina de vertebrados, e para sua amplificação foi utilizado o par de *primers* β-1 e β-2 (Guiraldi *et al.*, 2022), com respectivas sequências descritas abaixo:

β-1 – 5’ (ACCACCAACTTCATCCACGTTCAC) 3’

β-2 – 5’ (CTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC) 3’

A reação foi realizada em termociclador em Eco Healthcare – Swift MaxPro Thermal Cycle, com volume final de 12 µL.

O ciclo de amplificação foi um período de desnaturação por 50 minutos a 95 °C, período de anelamento com 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos em 72 °C. Ciclo de extensão final por 5 minutos a 72 °C. Após isso, a mistura será refrigerada a 4 °C.

4.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) – *primers* TOX4/TOX5

A PCR foi realizada nas seguintes condições: cada tubo de reação de 0,2 mL recebeu tampão de PCR (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl), 1,6 mM de MgCl2, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0,2 µM de cada primer, 1 µL da amostra testada e 8,3 µL de água ultrapura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo apresentou 11 µL do MIX-PCR e 1 µL do produto de extração do DNA, totalizando 12 µL. Foi realizada uma cPCR para amplificação do fragmento repetitivo de 529 pb, que consiste em 200-300 cópias no genoma de *T. gondii* , para garantir a qualidade de amplificação do DNA extraído com a utilização dos *primers* TOX4 e TOX5, de acordo com Homan *et al.* (2000), com modificações.

Abaixo estão descritos os *primers* utilizados e as condições de amplificação em termociclador Eco Healthcare – Swift MaxPro Thermal Cycle, com volume final de 12 µL:

TOX4 – 5’ (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) 3’

TOX5 – 5’ (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) 3’

O ciclo de amplificação foi um período de desnaturação por 7 minutos a 94 °C, período de anelamento com 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55

°C e 1 minuto a 72 °C. Ciclo de extensão final por 5 minutos a 72 °C. Após isso, a mistura foi refrigerada a 4 °C.

4.7.3. Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – *primers* TgNP1/TgNP2

Para a detecção do DNA de *T. gondii* pela Nested PCR, foram utilizados os *primers* externos NN1/NN2 que hibridizam a região ITS1 comum a *T. gondii* e *Neospora caninum* (Hurtado *et al.*, 2001) e *primers* internos TgNP1/TgNP2 que amplificam um fragmento de 227 pb da região ITS1 de *T. gondii* . Cada tubo de reação de 0,2 mL recebeu tampão de PCR (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl), 1,6 mM de MgCl2, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0,2 µM de cada primer, 1 µL da amostra testada e 8,3 µL de água ultrapura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo apresentou 11 µL do MIX-PCR e 1 µL do produto de extração do DNA, totalizando 12 µL.

Abaixo estão descritos os *primers* utilizados e as condições de amplificação em termociclador Eco Healthcare – Swift MaxPro Thermal Cycle, com volume final de 12 µL:

NN1 - 5’ (CCTTTGAATCCCAAGCAAAACATGAG) 3’

NN2 – 5’ (GCGAGCCAAGACATCCATTGCTGA) 3’

TgNP1 – 5’ (GTGATAGTATCGAAAGGTAT) 3’

TgNP2 – 5’ (ACTCTCTCTCAAATGTTCCT) 3’

O DNA foi amplificado a 3 min de desnaturação a 94 °C, seguido por 15 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os *primers* internos foram amplificados a 94 °C por 3 min, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 20 s, 53 °C por 30 s, 72 °C por 30 s e uma extensão final de 72 °C por 5 min (Hurtado *et al.*, 2001 com modificações).

4.7.4. Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – *primers* Tg18s48F/Tg18s359R - Filo Apicomplexa.

O DNA de *T. gondii* foi detectado pela Nested PCR pelo gene do DNA ribossômico 18S (rDNA) do Filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae (*Eimeria* spp., *Hammondia* spp., *Isospora* spp., *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp. e *T. gondii*). A mistura de amplificação consistiu em 0,5 µL de cada primer a 2 µM, 6,25 µL de GoTaqGreen Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 2,75 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA em um volume final de 12 µL. A primeira reação de PCR foi realizada utilizando os *primers* externos Tg18s48F e Tg18s359R. Para a segunda reação, os *primers* internos utilizados foram Tg18s58F e Tg18s348R, que amplificam 300 pb (Oliveira *et al.*, 2021; Melo *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2010).

Abaixo estão descritos os *primers* utilizados e as condições de amplificação em termociclador Eco Healthcare – Swift MaxPro Thermal Cycle:

Tg18s48F - 5' (CCATGCATGTCTAAGTATAAGC) 3'

Tg18s359R - 5' (GTTACCCGTCACTGCCAC) 3'

Tg18s58F - 5' (CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC) 3'

Tg18s348R - 5' (TGCCACGGTAGTCCAATAC) 3'

Para os *primers* externos houve um período de desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 57 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s e uma extensão final a 72 °C por 1 min. Para os *primers* internos, utilizou-se o mesmo perfil térmico da primeira reação, porém foram realizados 35 ciclos na fase de anelamento.

4.7.5. Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 8 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de tampão de corrida (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água ultrapura) e submetidas à eletroforese em cuba horizontal

(Major Science) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A identificação dos produtos amplificados foi feita em eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Sybr Safe® (Invitrogen) 0,1 µL/mL.

A voltagem utilizada foi de 120 V, 90 A por 60 minutos (1 h). Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger 100 bp DNA Ladder (Norgen) e o tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado visualmente com os padrões de peso molecular das cepas padrão utilizadas como controles positivos. Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador (Bio-Rad UV Transilluminator 2000).

4.7.6. Controles

Como controles positivos foram utilizadas cepas RH de *T. gondii* , cedidas pelo Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP - Botucatu. Água ultrapura estéril foi o controle negativo.

4.8. Sequenciamento

As amostras de Nested PCR foram avaliadas em gel de agarose 2% corado com GelRed e visualizadas sob luz UV. Para realização do sequenciamento foram utilizados os *primers* NN1/NN2 e TgNP1/TgNP2. A Reação de Sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) e reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. Foi realizado o sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Após o sequenciamento, foi realizada a análise dos eletroferogramas utilizando os programas Geneious 4.8.3. e Chromas Lite, na forma de eletroferograma alinhados pelo programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 10.0 (Kumar *et al*., 2018). Posteriormente, foram

submetidos ao BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e comparados com as sequências depositadas nos bancos de dados.

4.9. Análise espacial

Utilizando uma base de dados digital, a análise espacial foi realizada a partir do mapeamento das amostras positivas pelas técnicas moleculares utilizadas, visando compreender espacialmente a distribuição dos casos positivos e negativos nas áreas de estudo. Para isso, foi utilizado o software QGis (QGis Development Team, 2023) para a construção do banco de dados e elaboração de produtos cartográficos.

4.10. Análise estatística

Como análise estatística, foi feito o Teste Q de Cochran para testar se três ou mais conjuntos combinados de frequências ou proporções diferem significativamente entre si. Neste caso, possibilitou testar se os três *primers* utilizados diferem para as 160 amostras testadas (Santos; Cunha, 2013). Adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 2

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características dos rebanhos e das propriedades visitadas

De acordo com as informações fornecidas pelos produtores durante as visitas às propriedades, a maior parte do leite produzido era destinada a laticínios da região, geralmente por intermédio de cooperativas de produtores assentados, como a Cooperativa de Produção Agropecuária dos Assentados e Pequenos Produtores da Região Noroeste do Estado de São Paulo (COAPAR). Uma menor parcela era utilizada para consumo próprio das famílias, seja na forma de leite *in natura* ou na produção artesanal de queijos e manteiga. A assistência técnica ocorria de forma eventual, sendo prestada principalmente por médicos veterinários da Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo (ITESP).

No decorrer das visitas às propriedades rurais, observaram-se possíveis fatores associados ao risco de contaminação do leite bovino e do ambiente, tais como a convivência de múltiplas espécies animais, especialmente gatos (**Figura 5A**) e galinhas (**Figura 5B**), além de cães e suínos, e a presença de entulhos e áreas de depósito de lixo, próximas ao local de ordenha das vacas.

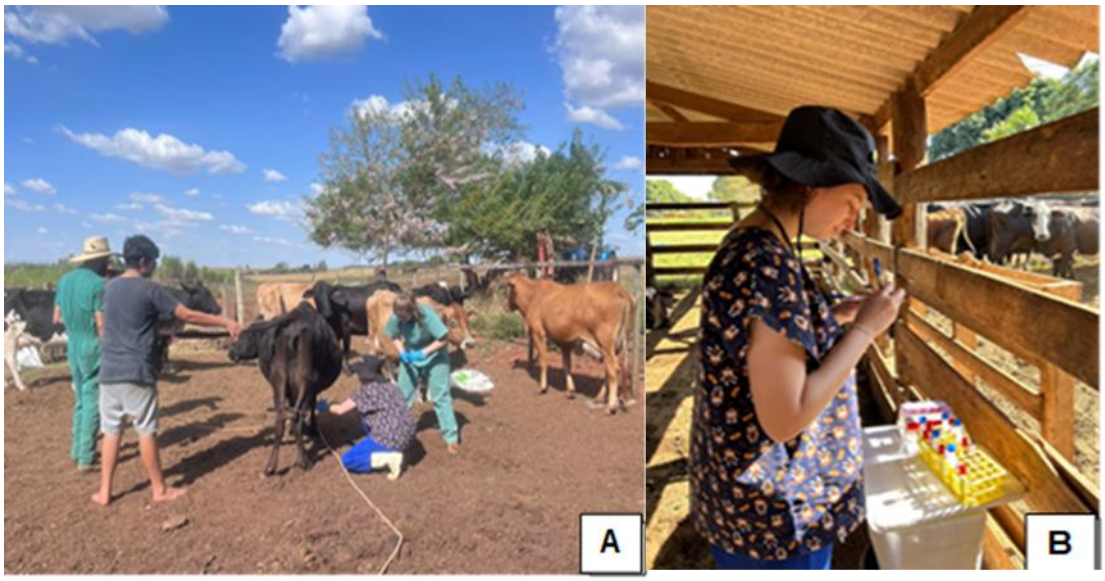
Figura 5. (A) Presença de felino próximo a sala de ordenha de assentamento rural; (B) Galinha (seta vermelha) próxima ao tanque de refrigeração de sala de ordenha do assentamento rural.



Fonte: (Silva, 2024; Valim *et al.*, 2023).

Após avaliação dos animais amostrados, verificou-se predominância de bovinos mestiços com prevalência de características fenotípicas zebuínas em fase de lactação (**Figura 6A**), criados em sistema extensivo, em regime de pastejo contínuo, sem suplementação alimentar e com fornecimento de água oriunda de poço artesiano. A adoção de silagem de milho no período de inverno, caracterizado por condições de seca e limitada disponibilidade de pastagem, foi verificada em número reduzido de propriedades.

Figura 6. (A) Realização da ordenha em propriedade rural no município de Castilho; (B) Identificação das amostras, após a retirada do leite.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.2. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) – *primers* TOX4/TOX5

Um total de 160 amostras foram submetidas à técnica de PCR convencional (cPCR) para os *primers* TOX4 e TOX5. Como resultado, 21/160 (13,12%) amostras foram positivas à cPCR para os *primers* TOX4 e TOX5; os resultados por município podem ser vistos abaixo (**Quadro 3**). Os resultados gerais por assentamento podem ser vistos no **Anexo 4**.

Quadro 3. Distribuição do número e percentual de amostras positivas para *Toxoplasma gondii* em leite bovino, de acordo com o município de origem, detectadas por PCR convencional com os *primers* TOX4 e TOX5.

Município	Total de amostras	Amostras positivas	%
Andradina	32	3	9,37
Castilho	32	1	3,12
Guaraçaí	32	0	0
Ilha Solteira	8	1	12,50
Itapura	16	9	56,25
Murutinga do Sul	24	6	25
Pereira Barreto	16	1	6,25
Total	160	21	13,12

Na **Figura 7**, está representada a eletroforese em gel de agarose a 2% da amostra procedente do assentamento Rio Paraná, do município de Castilho, para os *primers* TOX4 e TOX5 para *Toxoplasma gondii* .

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* TOX4 e TOX5 (529 pb) para *Toxoplasma gondii* . Marcador de peso molecular 100 pb; coluna 15 (circulado em vermelho) – amostra procedente do assentamento Rio Paraná do município de Castilho; colunas 18 e 19 – controles positivos; 20 – controle negativo (água ultrapura).



Fonte: Arquivo pessoal.

5.3. Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – *primers* TgNP1/TgNP2

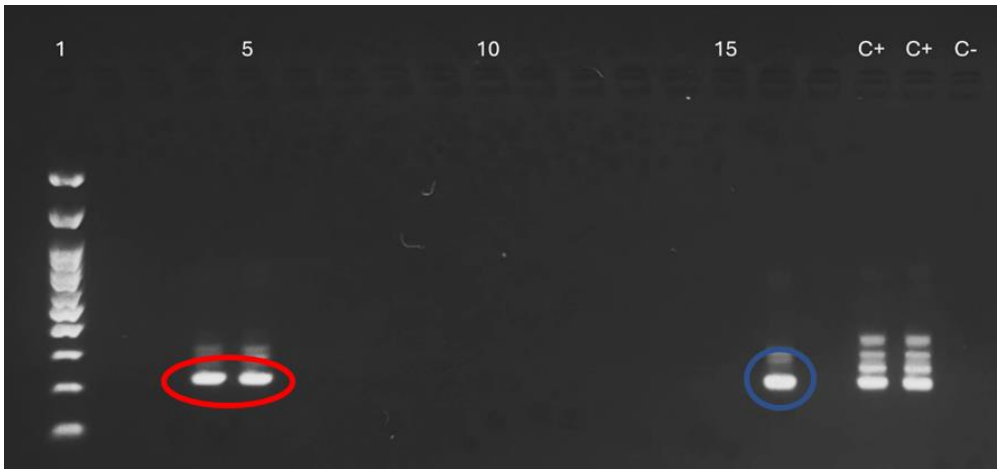
Um total de 160 amostras foram submetidas à técnica de Nested PCR para os *primers* NN1 e NN2 seguidos pelo TgNP1 e TgNP2. Como resultado, 42/160 (26,25%) amostras amplificaram. Os resultados por município podem ser vistos abaixo (**Quadro 4**). Os resultados gerais por assentamento podem ser vistos no **Anexo 4**.

Quadro 4. Distribuição do número e percentual de amostras positivas para *Toxoplasma gondii* em leite bovino, de acordo com o município de origem, detectadas por Nested PCR com os *primers* NN1/ NN2 e TgNP1/TgNP2.

Município	Total de Amostras	Amostras Positivas	%
Andradina	32	11	34,37
Castilho	32	7	21,87
Guaraçaí	32	6	18,75
Ilha Solteira	8	4	50
Itapura	16	5	31,25
Murutinga do Sul	24	9	37,50
Pereira Barreto	16	0	0
Total	160	42	26,25

Na Figura 8, está representada a eletroforese em gel de agarose a 2% de duas amostras procedentes do assentamento Timboré do município de Andradina; e uma amostra procedente do assentamento Rio Paraná do município de Castilho para os *primers* TgNP1/TgNP2 para *Toxoplasma gondii* .

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* TgNP1/TgNP2 (227 pb) que amplificam um fragmento da região ITS1 de *Toxoplasma gondii* . Marcador de peso molecular 100 pb; colunas 4 e 5 (circuladas em vermelho) – amostra procedente do assentamento Timboré do município de Andradina; coluna 16 (circulada em azul) – amostra procedente do assentamento Rio Paraná do município de Castilho; colunas 18 e 19 – controles positivos; 20 – controle negativo (água ultrapura).



Fonte: Arquivo pessoal.

5.4. Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – Filo Apicomplexa

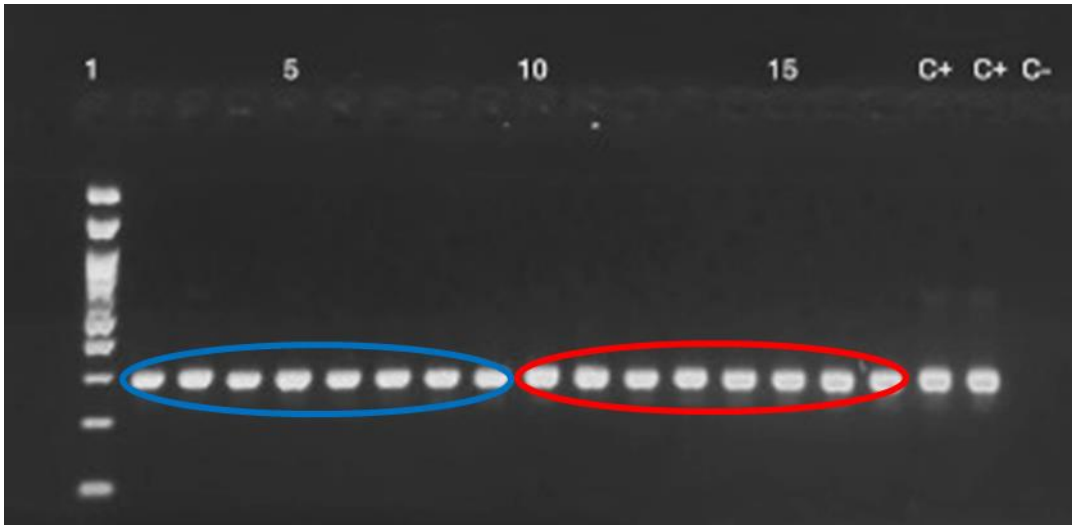
Um total de 160 amostras à técnica de Nested PCR para os *primers* Tg18s48F e Tg18s359R seguidos pelo Tg18s58F e Tg18s348R. Como resultado, todas as amostras foram positivas 160/160 (100%) (**Quadro 5**); os resultados por assentamento podem ser vistos no **Anexo 4**.

Quadro 5. Distribuição do número e percentual de amostras positivas para *Toxoplasma gondii* em leite bovino, de acordo com o município de origem, detectadas por Nested PCR com os *primers* Tg18s48F/Tg18s359R e Tg18s58F/Tg18s348R.

Município	Total de amostras	Amostras Positivas	%
Andradina	32	32	100
Castilho	32	32	100
Guaraçaí	32	32	100
Ilha Solteira	8	8	100
Itapura	16	16	100
Murutinga do Sul	24	24	100
Pereira Barreto	16	16	100
Total	160	160	100

Na Figura 9, apresenta-se a eletroforese em gel de agarose a 2% de oito (08) amostras procedentes do assentamento Primavera do município de Andradina e oito (08) amostras procedentes do assentamento Fazenda São Sebastião do município de Andradina para os *primers* Tg18s48F/Tg18s359R e Tg18s58F/Tg18s348R para o Filo Apicomplexa.

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* Tg18s48F/Tg18s359R (300 pb) do gene do DNA ribossômico 18S (rDNA) do Filo Apicomplexa. Marcador de peso molecular 100 pb; colunas 2 a 9 (circulado em azul) – amostras procedentes do assentamento Primavera do município de Andradina; colunas 10 a 17 (circulado em vermelho) – amostra procedente do assentamento Fazenda São Sebastião do município de Andradina; colunas 18 e 19 – controles positivos; 20 – controle negativo (água ultrapura).



Fonte: Arquivo pessoal.

No que se refere ao diagnóstico, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem demonstrado maior acurácia, sensibilidade e especificidade em comparação a métodos tradicionais. Além de possibilitar a detecção de pequenas quantidades de DNA-alvo, a PCR apresenta a vantagem de fornecer resultados em curto intervalo de tempo, configurando-se como uma ferramenta diagnóstica eficiente e confiável (Dehkordi *et al.*, 2013; Sah *et al.*, 2018).

Os *primers* TOX4 e TOX5 são amplamente descritos na literatura e comumente utilizados na detecção de *T. gondii* por PCR convencional, apresentando boa especificidade e sensibilidade. Em estudos prévios foi relatada a identificação do parasito em amostras de leite caprino e ovino utilizando esses *primers*, reforçando a PCR como método eficiente para a detecção de *T. gondii* em diferentes matrizes lácteas (Bezerra *et al.*, 2015; Ossani *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2015).

Entretanto, a aplicação da Nested PCR, utilizando inicialmente os *primers* NN1/NN2 seguidos por TgNP1/TgNP2, direcionados à amplificação da região ITS1 do rRNA de *T. gondii* , tem demonstrado maior sensibilidade e especificidade quando comparada à PCR convencional com os *primers* TOX4 e TOX5. Esse desempenho superior está relacionado ao elevado número de cópias e à variabilidade interespecífica da região ITS1, características que favorecem a detecção do parasito mesmo em amostras com baixa carga parasitária (Hurtado *et al.*, 2001; Rouatbi *et al.*, 2017).

A técnica da Nested PCR utilizando os *primers* NN1/NN2 seguidos por TgNP1/TgNP2 apresentou um maior número de amostras detectadas pela PCR convencional, com 42/160 (26,25%) amostras de leite positivas, enquanto para a PCR convencional (TOX4/TOX5) foram detectadas 21/106 (13,12%) amostras.

De forma complementar, a Nested PCR direcionada à região 18S rDNA do Filo Apicomplexa também apresenta alta confiabilidade e sensibilidade, permitindo a diferenciação de *T. gondii* de outros protozoários filogeneticamente relacionados, o que reforça a superioridade dessa técnica em relação à PCR convencional (Su *et al.*, 2010).

Foi possível observar que para a Nested PCR – Filo Apicomplexa obteve-se 100% das amostras de leite positivas; porém, com a utilização de outros *primers,* algumas amostras não amplificaram, sugerindo-se a possível detecção de outros protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae, tais como *Eimeria* spp., *Hammondia* spp., *Isospora* spp., *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. (**Quadro 6**).

Quadro 6. Amostras de leite bovino e percentual de positividade para *Toxoplasma gondii* segundo os *primers* utilizados em cada amostra.

Município	Nº amostras	***Primers* TOX 4/ TOX 5**	%	***Primers* TGNP1/ TGNP2**	%	***Primers* Tg18s48F/ Tg18s359R**	%
Andradina	32	3	9,37	11	34,37	32	100
Castilho	32	1	3,12	7	21,87	32	100
Guaraçaí	32	0	0	6	18,75	32	100
Ilha Solteira	8	1	12,50	4	50	8	100
Itapura	16	9	56,25	5	31,25	16	100
Murutinga do Sul	24	6	25	9	37,50	24	100
Pereira Barreto	16	1	6,25	0	0	16	100
Total	160	21	13,12	42	26,25	160	100

A PCR permite a detecção do DNA de taquizoítos de *T. gondii* no leite, estágio parasitário característico da fase aguda da infecção. A presença desse DNA em fluidos corporais ocorre, em média, entre 12 e 15 dias após a infecção, período em que os taquizoítos circulam na corrente sanguínea. Posteriormente, ocorre o encistamento nos tecidos, com a diferenciação em bradizoítos, o que reduz a possibilidade de detecção do parasito no leite (Silva *et al.*, 2015). Neste estudo, foi possível detectar o DNA de *T. gondii* durante este período de 12 e 15 dias após a infecção; porém, existe a probabilidade de as vacas leiteiras com amostras de leite negativas já terem se infectado anteriormente, contendo assim cistos em seus tecidos.

A detecção de *T. gondii* no leite bovino reforça a importância da adoção de boas práticas de higiene nas propriedades rurais e da utilização de tecnologias que assegurem a produção de alimentos seguros. Considerando que muitos fatores de risco são de origem ambiental e são de difícil controle, o investimento em ações de educação em saúde mostra-se essencial para o controle e a prevenção da infecção por esse protozoário (Silva *et al.*, 2015).

Fonseca *et al.* (2023) realizaram um estudo em 106 amostras de leite de vacas no sul do Brasil e utilizaram como método diagnóstico a nested PCR, com os *primers* TgNP1/TgNP2, sendo detectados 2,8% (3/106) de amostras positivas para *T. gondii* . Em oito municípios da região Centro-Oeste paulista, Manzini *et*

al. (2024) utilizaram a técnica molecular PCR convencional (cPCR), com os *primers* TOX4/TOX5, e Nested PCR, com os *primers* TgNP1/TgNP2 e *primers* Tg18s48F/Tg18s359R, para detectar a presença de *T. gondii* em amostras de leite bovino em 102 tanques de resfriamento em pequenas propriedades de agricultura familiar, tendo-se detectado o DNA do parasito em 5/102 (4,90 %), 13/102 (12,74 %) e 3/102 (2,94%) respectivamente. Ao comparar com este estudo foram obtidos 21/160 (13,12%), 42/160 (26,25%) e 160/160 (100%), respectivamente, mostrando que esses métodos são sensíveis para detectar o DNA do *T. gondii* no leite.

Por meio deste estudo foi evidenciada a necessidade de intensificar a disseminação de informações por parte das autoridades sanitárias, com o objetivo de orientar produtores de leite e derivados artesanais sobre a importância da fervura ou pasteurização do leite como medidas fundamentais para a redução do risco de transmissão de *T. gondii* . Além disso, destaca-se a relevância da realização de novos estudos que avaliem a carga parasitária e a viabilidade do parasito eliminado no leite, bem como investigações conduzidas em condições de infecção natural do protozoário, especialmente em propriedades onde há o consumo habitual de leite cru bovino para compreender melhor a epidemiologia do parasito nestas regiões.

O consumo de leite cru bovino e de seus derivados não pasteurizados representa um potencial risco à saúde pública, uma vez que formas infectantes do parasito, como os taquizoítos, podem estar presentes nesse alimento. Nesse contexto, o conhecimento dos pontos críticos e dos fatores de risco associados à produção e ao consumo do leite é essencial para a prevenção de infecções transmitidas por alimentos. A segurança e a qualidade do leite estão diretamente relacionadas à saúde humana, considerando que esse alimento pode atuar como veículo de diversos patógenos zoonóticos, além de *T. gondii* (Cisak *et al.*, 2017; Gharekhani *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram a presença de *Toxoplasma gondii* em leite bovino procedente de propriedades rurais, indicando que o consumo de leite não pasteurizado e de seus derivados, assim como o processamento inadequado desses produtos, pode representar uma via

potencial de transmissão desse patógeno. Desse modo, o leite bovino assume relevância epidemiológica como possível fonte de infecção humana por *T. gondii*. Dado o elevado consumo de leite bovino, torna-se essencial a condução de estudos epidemiológicos que permitam aprofundar o conhecimento sobre a prevalência da toxoplasmose relacionada a essa via, sobretudo frente à escassez de investigações nessa espécie quando comparada à caprina e à ovina.

A divulgação de informações sobre os riscos relacionados à toxoplasmose, através de materiais didáticos, como um folder educativo elaborado com linguagem clara, objetiva e acessível, pode ser considerada uma importante estratégia de retorno social da pesquisa. O material tem o intuito de ampliar o conhecimento da população sobre a doença, suas formas de transmissão e medidas de prevenção, contribuindo para a conscientização e para a promoção de práticas de cuidado no contexto da Saúde Única.

5.5. Sequenciamento

Foram selecionadas amostras com qualidade de DNA suficiente para a realização do sequenciamento. Desta forma, foram encaminhadas três (03) amostras positivas para *T. gondii* pela Nested PCR com *primers* NN1/NN2 e TgNP1/TgNP2; uma amostra do assentamento Roseli Nunes (amostra 102); uma amostra do assentamento Zumbi dos Palmares (amostra 107), localizada no município de Itapura, e uma amostra do assentamento Orlando Molina (amostra 116), pertencente ao município de Murutinga do Sul.

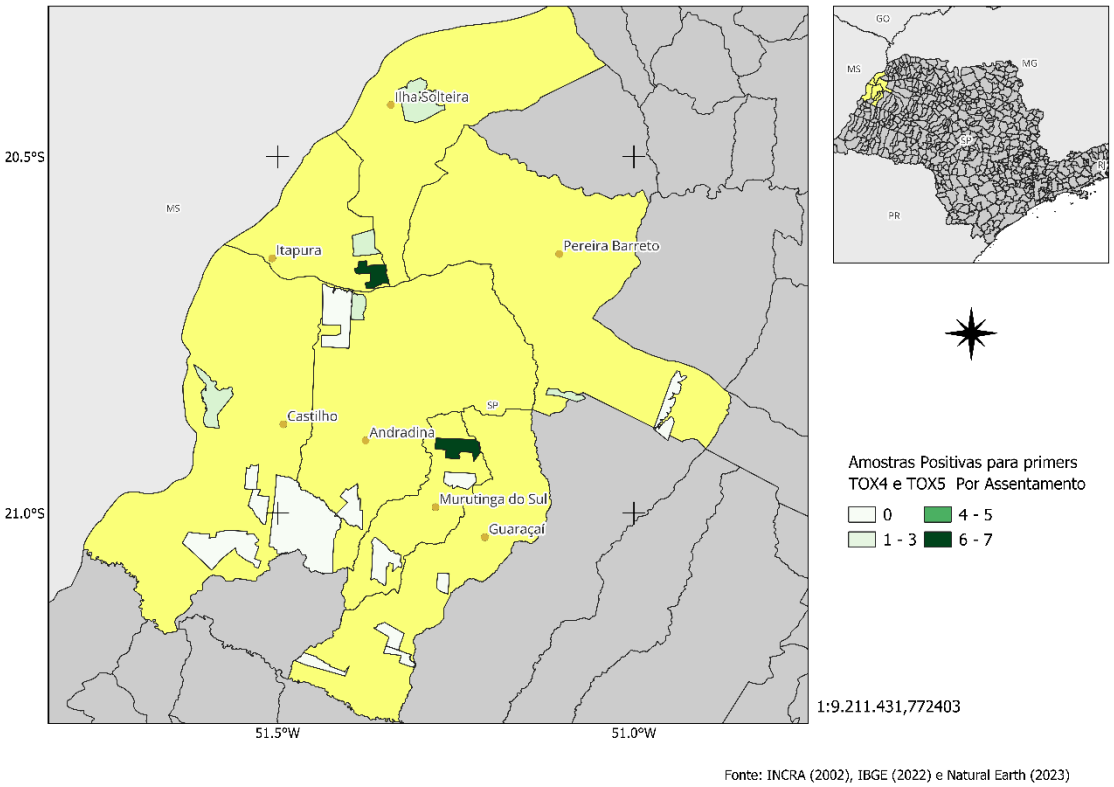
Os *amplicons* foram visualizados, pelo software Chromas 2.6.6, na forma de eletroferograma (**Anexo 5**). As três (03) amostras apresentaram similaridade ao *T. gondii* com os *primers* NN1/NN2 e TgNP1/TgNP2, sendo: a amostra 102 obteve 99,45% (chave de acesso: ON072251.1) de similaridade, a amostra 107 obteve 100,00% (chave de acesso: ON337182.1) de similaridade e a amostra 116 obteve 100,00% de similaridade (chave de acesso: ON337182.1).

5.6. Análise espacial

Foi realizada a análise espacial dos municípios procedentes das propriedades leiteiras dos assentamentos, nas quais foi possível detectar *T. gondii* no leite, com os *primers* TOX4/TOX5 – cPCR e TgNP1/TgNP2 – Nested PCR.

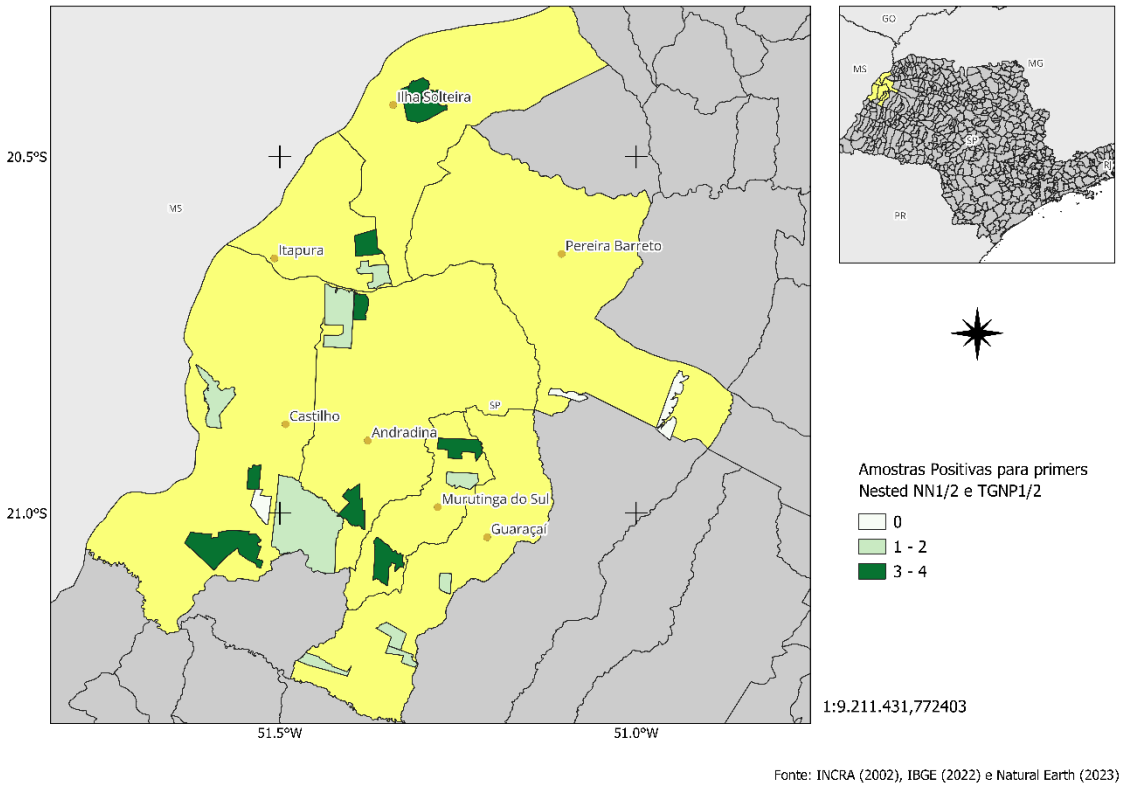
5.6.1. Assentamentos com amostras de leite bovino positivas para *T. gondii* com os *primers* TOX4/TOX5.

Figura 10. Distribuição espacial do número de amostras de leite bovino positivas na PCR convencional para *Toxoplasma gondii* , utilizando os *primers* TOX4 e TOX5, nos assentamentos rurais avaliados no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.



5.6.2. Assentamentos com amostras de leite bovino positivas para *T. gondii* com os *primers* NN1/NN2 e TgNP1/TgNP2.

Figura 11. Distribuição espacial do número de amostras de leite bovino positivas na Nested PCR para *Toxoplasma gondii* , utilizando os *primers* NN1/NN2 e TgNP1/TgNP2, nos assentamentos rurais avaliados no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.



5.7. Análise estatística

Como análise estatística, foi feito o Teste Q de Cochran para testar se três ou mais conjuntos combinados de frequências ou proporções diferem significativamente entre si (Santos; Cunha, 2013), adotando-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Das 160 amostras analisadas, o par de *primers* TOX4/TOX5 apresentou 21 (13,13%) amostras positivas, enquanto o par NN1/NN2 – TGP1/TGP2 detectou 42 (26,25%) amostras positivas. O par de *primers* Tg18s48F/Tg18s359R apresentou amplificação em todas as amostras analisadas (100%).

O Teste Q de Cochran demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os três conjuntos de *primers* avaliados ($Q = 48,1091$; $gl = 2$; $p < 0,0001$), indicando que os ensaios moleculares apresentaram diferentes frequências de detecção nas amostras analisadas.

6. CONFECÇÃO DE FOLDER EDUCATIVO

Como ação complementar de extensão universitária e de retorno social dos resultados obtidos, foi proposta a elaboração de um folder educativo destinado aos produtores e à população residente nas áreas de coleta das amostras (**Anexo 6**). O material tem como finalidade disseminar informações sobre a toxoplasmose, contribuindo para a conscientização da comunidade acerca dessa importante zoonose.

Um folder educativo foi desenvolvido em linguagem clara e acessível, associada a recursos visuais e abordagem didática, com o intuito de facilitar a compreensão por públicos de diferentes faixas etárias e níveis de escolaridade. Seu conteúdo tem o propósito de orientar sobre o que é a toxoplasmose, as vias de transmissão do parasito, as formas de prevenção que podem ser adotadas para reduzir o risco de infecção em animais e seres humanos e quais são os grupos de risco da doença.

A elaboração do material fundamentou-se nos princípios da Saúde Única, destacando a integração entre a saúde humana, animal e ambiental. Dessa forma, busca incentivar a adoção de medidas preventivas que auxiliem na diminuição da circulação do *T. gondii* no ambiente e, consequentemente, na redução do risco de transmissão da doença.

O folder será distribuído à população local, com ênfase nos produtores rurais dos assentamentos participantes do estudo, constituindo uma forma de devolutiva dos resultados da pesquisa e de estímulo ao envolvimento da comunidade nas ações de educação e vigilância em saúde.

7. CONCLUSÕES

- A detecção do DNA de *Toxoplasma gondii* foi possível em amostras de leite bovino provenientes de assentamentos rurais da região Noroeste do Estado de São Paulo;
- Por meio de técnicas moleculares de PCR convencional e Nested PCR foi possível a detecção do parasito em amostras de leite bovino *in natura*;
- Pelo sequenciamento genético foi comprovada a detecção de *Toxoplasma gondii* nas amostras de leite positivas às provas moleculares;
- Análise estatística demonstrou que os ensaios moleculares apresentaram diferentes frequências de detecção nas amostras analisadas.
- A distribuição geográfica dos municípios nos quais foi detectado *Toxoplasma gondii* sugere a circulação do parasito na região estudada, uma vez que eles se encontram geograficamente próximos entre si.
- A elaboração de folder educativo permite o retorno aos produtores rurais acerca da toxoplasmose, com o propósito da educação em saúde.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, A. A.; LONGCORE, T.; BARBIERI, M.; DABRITZ, H.; HILL, D.; KLEIN, P. N.; LEPCZYK, C.; LILLY, E. L.; MCLEOD, R.; MILCARSKY, J.; MURPHY, C. E.; SU, C.; VANWORMER, E.; YOLKEN, R.; SIZEMORE, G. C. The one health approach to toxoplasmosis: epidemiology, control, and prevention strategies. *EcoHealth*, New York, v. 16, n. 2, p. 378–390, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s10393-019-01405-7. Acesso em: 2 mar. 2026.

ALBUQUERQUE, G. R.; MUNHOZ, A. D.; TEIXEIRA, M.; FLAUSINO, W.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. G. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in dairy cattle, state of Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 31, n. 4, p. 287-290, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000400003. Disponível em: https://www.scielo.br/j/pvb/a/bs7QsbL5BkwpBvFnfGBNyRF/?lang=en. Acesso em: 31 mar. 2026.

ARAÚJO, F. R.; CARVALHO, C. M. E.; BALBUENA, C. B. Levantamento sorológico para *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 5, p. 201-203, 1998.

ASIYABI AGHDAM, S.; HAJIPOUR, N.; MOOSAVY, M. H. Use of PCR to determine *Toxoplasma gondii* in milk samples from camels (*Camelus dromedarius*), cattle (*Bos taurus*) and buffalos (*Bubalus bubalis*) in east Azarbaijan province, Iran. *Veterinary Medicine and Science*, Oxford, v. 9, p. 400–404, 2023. DOI: https://doi.org/10.1002/vms3.1047. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/vms3.1047. Acesso em: 2 mar. 2026.

BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; GERMANO, P. M. L. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 549-552, 1996. DOI: https://doi.org/10.1590/S0034-89101996000600009. Disponível em:

https://www.scielo.br/j/rsp/a/qhgrpVffXYtYMgL5FxSczSm/abstract/?lang=pt. Acesso em: 22 mar. 2026.

BARCELLOS, R.R., JAMAS, L.T., MENOZZI, B.D., LANGONI.H. Agricultura Familiar e Sanidade Animal. *Veterinária e Zootecnia*, v. 26, p. 1–9, 2019. DOI: https://doi.org/10.35172/rvz.2019.v26.365. Disponível em: https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/365. Acesso em: 24 ago. 2026.

BARROS, L. D.; GARCIA, J. L.; BRESCIANI, K. D. S.; CARDIM, S. T., STORTE, V. S.; HEADLEY, S. A. A review of Toxoplasmosis and Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Frontiers in Veterinary Science*, Lausanne, v. 7, p. 455, 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00455. Disponível em: https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2020.00455/full. Acesso em: 2 mar. 2026.

BEZERRA, M. J. G.; KIM, P. C. P.; MORAES, E. P. B. X.; AS, S. G.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; SILVA, J. G.; ALVES, B. H. L. S.; MOTA, R. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, Berlin, v. 62, n. 4, p. 421–424, 2015. DOI: https://doi.org/10.1111/tbed.12160. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.12160. Acesso em: 2 mar. 2026.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000. DOI: https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/mmbr.64.3.607-623.2000. Acesso em: 2 mar. 2026.

BOUGHATTAS, S. Toxoplasma infection and milk consumption: meta-analysis of assumptions and evidences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Philadelphia, v. 57, n. 13, p. 2924-2933, 2015. DOI: https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1084993. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2015.1084993. Acessado em: 2 mar. 2026.

BRACCINI, G. L.; CHAPLIN, E. L.; STOBBE, N. S.; ARAÚJO, F. A. P.; SANTOS, N. R. Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de Protozoologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, nos anos 1986 a 1990. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, v. 20, p. 134-149, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Protocolo de notificação e investigação*: toxoplasmose gestacional e congênita Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: https://drive.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/MS_protocolo_notificacao_investigacao_toxoplasmose_gestacional_congenita.pdf. Acesso em: 22 fev. 2026.

BURRELLS, A.; TARODA, A.; OPSTEEGH, M.; SCHARES, G.; BENAVIDES, J.; DAM-DEISZ, C.; BARTLEY, P. M.; CHIANINI, F.; VILLENA, I.; VAN DER GIESSEN, J.; INNES, E. A.; KATZER, F. Detection and dissemination of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected calves, a single test does not tell the whole story. *Parasites & Vectors*, London, v. 11, n. 1, p. 45, 2018. DOI: https://doi.org/10.1186/s13071-018-2632-z. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1186/s13071-018-2632-z. Acesso em: 2 mar. 2026.

CARMO, E. L.; MORAIS, R. A. P. B.; LIMA, M. S.; MORAES, C. C. G.; ALBUQUERQUE, G. R.; SILVA, A. V. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in beef cattle slaughtered in the metropolitan region of Belém, Brazilian Amazon. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 226-230, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612017012. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbpv/a/3HZh6XkhtDPWGGT9SMXXXSr/?lang=en. Acesso em: 31 mar. 2026.

CHAPLIN, E. L.; SILVA, N. R. S.; SEBBEN, J. C.; ARAÚJO, F. A. P.; MENDEZ, L. D. V. Cadeia epidemiológica da toxoplasmose em Guaporé/RS, relacionando humanos e seus animais domésticos. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, v. 12, p. 25-34, 1984.

CISAK, E.; ZAJĄC, V.; SROKA, J.; SAWCZYN, A.; KLOC, A.; DUTKIEWICZ, J.; WÓJCIK-FATLA, A. Presence of pathogenic rickettsiae and protozoan in samples of raw milk from cows, goats, and sheep. *Foodborne Pathogens and Disease*, Larchmont, v. 14, n. 4, p. 189-194, 2017. DOI: https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2203. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1089/fpd.2016.2203. Acesso em: 2 mar. 2026.

COSTA, A. J.; ARAUJO, F. G.; COSTA, J. O.; LIMA, J. D.; NASCIMENTO, E. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii* . *Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 63, n. 2, p. 212-218, 1977. DOI: https://doi.org/10.2307/3280042. Disponível em: https://www.jstor.org/stable/3280042?origin=crossref. Acesso em: 2 mar. 2026.

COSTA, A. J.; ÁVILA, F. A.; KASAI, N.; PAULILLO, A. C.; SILVA, M. B.; GALESCO, H. Anticorpos anti- *Toxoplasma* em soros de bovinos do município de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 299-301, 1978.

COSTA, A. J.; COSTA, E. P. Frequência de bovinos reagentes à reação de imunofluorescência indireta para *Toxoplasma gondii* em Poços de Caldas, MG, Brasil. *Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG*, Belo Horizonte, v. 30, p. 47-51, 1978.

COSTA, D. G. C.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. S. A.; SANTANA, S. C.; MAGALHÃES, F. J. R.; LIMA, C. D. F. FO. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 98, n. 3, p. 679-680, Jun. 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.1645/GE-2910.1. Disponível em: https://bioone.org/journals/journal-of-parasitology/volume-98/issue-3/GE-2910.1/Seroprevalence-of-Toxoplasma-gondii-in-Domestic-and-Wild-Animals-From/10.1645/GE-2910.1.short. Acesso em: 31 mar. 2026.

COSTA, G. H. N.; COSTA, A. J.; LOPES, W. D.; BRESCIANI, K. D.; SANTOS, T. R.; ESPER, C. R.; SANTANA, A. E. *Toxoplasma gondii*: infection natural

congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. *Experimental Parasitology,* Orlando, v. 127, n. 1, p. 277-281, 2011. DOI: https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.005. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489410002705?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 70–74, 2006. DOI: https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100013. Disponível em: https://www.scielo.br/j/bjm/a/DLGgyBmbSjQBf8hWqwNcwMx/?lang=en. Acesso em: 2 mar. 2026.

DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; VIRMOND, M. P.; HAMANN, W.; AMENDOEIRA, M. R. R. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1133-1137, 2004. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000400026. Disponível em: https://www.scielo.br/j/cr/a/nzwXbXmkvM4ngPVbLW6Cvsc/?lang=pt. Acesso em: 31 mar. 2026.

DEHKORDI, F. S.; BORUJENI, M. R.; RAHIMI, E.; ABDIZADEH, R. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. *Foodborne Pathogens and Disease*, Thousand Oaks, v. 10, n. 2, p. 120–125, 2013. DOI: https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1311. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1089/fpd.2012.1311. Acesso em: 2 mar. 2026.

DELJAVAN, N.; MOOSAVY, M.; HAJIPOUR, N. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* DNA in goats (*Capra hircus*), sheep (*Ovis aries*), and donkey (*Equus asinus*) milk using PCR in east Azerbaijan province, Iran. *Research in Veterinary Science*, London, v. 152, p. 58-60, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.07.020. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528822002235?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 22, n. 3-4, p. 177-202, 1986. DOI: https://doi.org/10.1016/0304-4017(86)90106-8. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304401786901068?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

DUBEY, J. P. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. *Parasites Vectors*, London, v. 14, n. 1, p. 263, 2021. DOI: https://doi.org/10.1186/s13071-021-04769-4. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1186/s13071-021-04769-4. Acesso em: 23 mar. 2026

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii . In*: BARON. S. (ed.). *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Chap. 84. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7752/?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: 25 fev. 2026.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2022. DOI: https://doi.org/10.1201/9781003199373. Disponível em: https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781003199373/toxoplasmosis-animals-humans-dubey. Acesso em: 2 mar. 2026.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 189, n. 2, p. 166-170, 1994. DOI: https://doi.org/10.2460/javma.1994.205.11.1593. Disponível em: https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/205/11/javma.1994.205.11.1593.xml. Acesso em: 2 mar. 2026.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* Infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 38, p. 1257–1278, 2008. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751908001100?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

DUBEY, J. P.; JULIAN, A. F. First report of acute, visceral, fatal toxoplasmosis in a naturally infected calf (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 334, p. 110373, 2025. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110373. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39662132/. Acesso em: 23 mar. 2026.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *The Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 132, n. 4, p. 636-62, 1970. DOI: https://doi.org/10.1084/jem.132.4.636. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4927658/. Acesso em: 2 mar. 2026.

ELSHEIKHA, H. M.; MARRA, C. M.; ZHU, X. Q. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and management of cerebral toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 34, n. 1, e00115-19, 2020. DOI: https://doi.org/10.1128/CMR.00115-19. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7690944/. Acesso em: 24 mar. 2026.

FAJARDO, H. V.; D'ÁVILA, S.; BASTOS, R. R.; CYRINO, C. D.; DETONI, M. L.; GARCIA, J. L. Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil. *Parasites & Vectors*, London, v. 6, p. 191, 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-191. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1186/1756-3305-6-191. Acesso em: 31 mar. 2026.

FARHAB, M.; AZIZ, M. W.; SHAUKAT, A.; CAO, M.; HOU, Z.; HUANG, S.; LI, L.; YUAN, Y. Review of toxoplasmosis: what we still need to do. *Veterinary Sciences*, Basel, v. 12, n. 8, p. 772, 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/vetsci12080772. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40872723/. Acesso em: 10 mar. 2026.

FATMAWATI, M.; SUWANTI, L. T.; MUFASIRIN. Review: potential transmission of toxoplasmosis through consumption of raw goat's milk. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, Burnley, v. 10, n. 8, p. 1687-1692, 2022. DOI:

https://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2022/10.8.1687.1692. Disponível em: https://researcherslinks.com/current-issues/Review-Potential-Transmission-Toxoplasmosis-through-Consumption/33/8/5156/html. Acesso em: 2 mar. 2026.

FEREIG, R. M.; ABDELBAKY, H. H.; MAZEED, A. M.; EL-ALFY, E.-S.; SALEH, S.; OMAR, M. A.; ALSAYEQH, A. F.; FREY, C. F. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Antibodies and DNA in raw milk of various ruminants in Egypt. *Pathogens*, Basel, v. 11, n.11, p. 1305, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/pathogens11111305. Disponível em: https://www.mdpi.com/2076-0817/11/11/1305. Acesso em: 24 mar. 2026.

FERRARONI, J. J.; REED, S. G.; SPEER, C. A. Prevalence of *Toxoplasma* antibodies in humans and various animals in the Amazon. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, Lawrence, v. 47, n. 1, p. 148-150, 1980.

FLORES, B. J. E.; KNOLL, L. J. *Toxoplasma gondii* at the host interface: immune modulation and translational strategies for infection control. *Vaccines*, Basel, v. 13, n. 8, p. 819, 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/vaccines13080819. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40872907/. Acesso em: 10 mar. 2026.

FONSECA, F. M.; SATO, A. P.; BECKER, A. P. B. B.; PINTO, G. O. P. A.; SOUZA, G. S.; PEROTTA, J. H.; BARROS FILHO, I. R.; RODRIGUEZ, M. C.; DITTRICH, R. L. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in milk of dairy cows from southern Brazil. *Parasitology International*, Amsterdam, v. 95, e102750, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.parint.2023.102750. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576923000272?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F. C. R. Anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs in a highly endemic area for human toxoplasmosis in Brazil. *Journal of Parasitology*, New York, v. 97, n. 1, p. 44-47, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1645/GE-2457.1. Disponível em: https://bioone.org/journals/journal-of-parasitology/volume-97/issue-1/GE-

2457.1/AntiToxoplasma-gondii-Antibodies-in-Cattle-and-Pigs-in-a-Highly/10.1645/GE-2457.1.short. Acesso em: 31 mar. 2026.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, Washington, v. 167, n. 3919, p. 893–896, 1970. DOI: https://doi.org/10.1126/science.167.3919.893. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4903651/. Acesso em: 24 mar. 2026.

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 do norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781999000100017. Disponível em: https://www.scielo.br/j/cr/a/LNd3F8PVybmLxC4jzf98ZPm/?lang=pt#. Acesso em: 31 mar. 2026.

GARWEG, J. G.; KIEFFER, F.; MANDELBROT, L.; PEYRON, F.; WALLON, M. Long-term outcomes in children with congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Pathogens*, Basel, v. 11, n. 10, p. 1187, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/pathogens11101187. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9610672/#:~:text=Introdu%C3%A7%C3%A3o-,Mesmo%20na%20aus%C3%AAncia%20de%20manifesta%C3%A7%C3%B5es%20ao%20nascimento%2C%20crian%C3%A7as%20com%20toxoplasmose,manifesta%C3%A7%C3%A3o%20mais%20frequente%20da%20TC. Acesso em: 23 mar. 2026.

GHAREKHANI, J.; YAKHCHALI, M.; AFSHARI, A.; ADABI, M. Herd-level contamination of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii,* and *Brucella*. *Food Microbiology*, Cambridge, v. 100, 103873, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103873. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002021001386?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

GOMES, D. F. C.; KRAWCZAK, F. D. S.; OLIVEIRA, C. H. S.; FERREIRA JÚNIOR, Á.; FERNANDES, É. K. K.; LOPES, W. D. Z.; SEVÁ, A. D. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in cattle in Brazil: a review. Brazilian *Journal of Veterinary Parasitology*, Jaboticabal, v. 29, n. 1, e015719, 2020. DOI: https://doi.org/10.1590/S1984-29612019106. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbpv/a/xyzFknMXt4nr38W5zfXjfLC/?lang=en. Acesso em: 2 mar. 2026.

GONDIM, L. F. P.; BARBOSA JUNIOR, H. V.; RIBEIRO FILHO, C. H.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 82, n. 4, p. 273-276, 1999. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00033-3. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401799000333?via%3Dihub. Acesso em: 31 mar. 2026.

GROOT, E. Segmentos de preferências na aquisição da carne bovina. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Brasília, v. 59, n. 2, e213487, 2021. DOI: https://doi.org/10.1590/1806-9479.2021.213487. Disponível em: https://www.scielo.br/j/resr/a/q9khtZfdD4sqm7P99fRbN3h/?lang=pt. Acesso em: 24 mar. 2026.

GUERRA, N. R.; ALVES, B. H. L. S.; FARIAS, M. P. O.; MOTA, R. A.; ALVES, L. C. Frequency of *Toxoplasma gondii* antibodies in bovines in the state of Pernambuco, Brazil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 417-419, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014056. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbpv/a/9s9WYVW7FD7xmBLYtPRjmrC/?lang=en. Acesso em: 31 mar. 2026.

GUIRALDI, L. M.; SANTOS, W. J.; MANZINI, S.; TAHA, N. E. H. A.; AIRES, I. N.; RIBEIRO, E.; TOKUDA, M.; MEDEIROS, M. I. M.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B. Identification of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in captive primates from a zoo in Brazil. *American Journal of Primatology*, New York, v. 84, n. 4-5, p. 1-7, 2022. DOI:

https://doi.org/10.1002/ajp.23376. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35384010/. Acesso em: 24 mar. 2026.

HAJJ, R. E.; TAWK, L.; ITANI, S.; HAMIE, M.; EZZEDDINE, J.; EL SABBAN, M.; EL HAJJ, H. Toxoplasmosis: current and emerging parasite druggable targets. *Microorganisms*, Basel, v. 9, n. 12, p. 2531, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms9122531. Disponível em: https://www.mdpi.com/2076-2607/9/12/2531. Acesso em: 2 mar. 2026.

HARTMANN, K.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. *Toxoplasma gondii* infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, London, v. 15, n. 7, p. 631–637, 2013. DOI: https://doi.org/10.1177/1098612X13489228. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1098612X13489228. Acesso em: 2 mar. 2026.

HATAM-NAHAVANDI, K.; CALERO-BERNAL, R.; RAHIMI, M.T.; PAGHEH, A. S.; ZAREAN, M.; DEZHKAM, A; AHMADPOUR, E. *Toxoplasma gondii* infection in domestic and wild felids as public health concerns: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, London, v. 11, n. 1, p. 9509, 2021. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-021-89031-8. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-021-89031-8?utm_source=chatgpt.com#citeas. Acesso em: 24 mar. 2026.

HILL, D. E.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. Reston (VA): USGS National Wildlife Health Center, 2014. (Circular, 1389). DOI: https://doi.org/10.3133/cir1389. Disponível em: https://pubs.usgs.gov/publication/cir1389. Acesso em: 2 mar. 2026.

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, Oxford, v. 30, n. 1, p. 69–75, 2000. DOI: https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00170-8. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751999001708?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; BARANDIKA, J.; GARCÍA-PÉREZ, A. L. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 102, n. 1–2, p. 17–27, 2001. DOI: https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00526-x Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170100526X?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

HUTCHISON, W. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature,* London, v. 206, p. 961–962, 1965. DOI: https://doi.org/10.1038/206961a0. Disponível em: https://www.nature.com/articles/206961a0. Acesso em: 2 mar. 2026.

HUTCHISON, W. M.; DUNACHIE, J. F.; SIIM, J. C.; WORK, K. Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *British Medical Journal*, London, v. 1, n. 5689, p. 142–144, 1970. DOI: https://doi.org/10.1136/bmj.1.5689.142. Disponível em: https://www.bmj.com/content/1/5689/142. Acesso em: 2 mar. 2026.

HUTCHISON, W. M.; DUNACHIE, J. F.; WORK, K.; SIIM, J. C. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Oxford, v. 65, n. 3, p. 380-398, 1971. DOI: https://doi.org/10.1016/0035-9203(71)90018-6. Disponível em: https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/65/3/380/1932172?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 2 mar. 2026.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção Agropecuária*: rebanho de bovinos (bois e vacas). Rio de Janeiro: IBGE, 2024. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/sp. Acesso em: 23 fev. 26.

JEWELL, M. L.; FRENKEL, J. K.; JOHNSON, K. M.; REED, V.; RUIZ, A. Development of Toxoplasma oocysts in neotropical felidae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Northbrook, v. 21, n. 5, p. 512-517, 1972. DOI: https://doi.org/10.4269/ajtmh.1972.21.512. Disponível em: https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/21/5/article-p512.xml. Acesso em: 2 mar. 2026.

KHAN, S.; RAFIQ, K.; KHABIR, M. N.; KHAN, M. B.; KHAN, S. N.; KHATTAK, A.; ATTAULLAH, S. *Toxoplasma gondii* in lactating animals: potential risk to milk consuming population in Khyber Pakhtunkhwa. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 83, e267369, 2023. DOI: https://doi.org/10.1590/1519-6984.267369. Disponível em: https://chooser.crossref.org/?doi=10.18502%2Fijpa.v16i4.7873. Acesso em: 2 mar. 2026.

KOETHE, M.; SCHADE, C.; FEHLHABER, K.; LUDEWIG, M. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simulated gastric fluid and cow's milk. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 15, n. 233, p. 111-114, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401716305118?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, New York, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018. DOI: https://doi.org/10.1093/molbev/msy096. Disponível em: https://academic.oup.com/mbe/article/35/6/1547/4990887. Acesso em: 2 mar. 2026.

LIU, Y. M.; ZHANG, Y. Y.; WANG, L.; WANG, H. Y.; LI, C. H.; JIANG, Y. H.; SUN, W.-W. *Toxoplasma gondii* antibodies in raw milk and sera of cows in China. *Pathogens*, Basel, v. 11, p. 1079, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/pathogens11101079. Disponível em: https://www.mdpi.com/2076-0817/11/10/1079. Acesso em: 2 mar. 2026.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. *Methods*, Duluth, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. DOI: https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

LUCIANO, D. M.; MENEZES, R. C.; FERREIRA, L. C.; NICOLAU, J. L.; NEVES, L. B.; LUCIANO, R. M.; DAHROUG, M. A. A.; AMENDOEIRA, M. R. R. Occurrence of anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária,* Jaboticabal*,* v. 20, n. 4, p. 351-353, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000400018. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbpv/a/BHNNchV93pMNDk9TmSqFHVB/?lang=en. Acesso em: 31 mar. 2026.

LÜDER; C. G. K. IFNs in host defence and parasite immune evasion during *Toxoplasma gondii* infections. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 15, n. 1356216, 2024. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1356216. Disponível em: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1356216/full. Acesso em: 2 mar. 2026.

MACEDO, M. F. S. B.; MACEDO, C. A. B.; BARROS, L. D.; MARTINS, G. F.; SANDESKI, L. M.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A. L.; TARODA, A.; CARDIM, S. T.; GARCIA, J. L. Ocorrência sorológica de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em vacas leiteiras abatidas para consumo humano em abatedouro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 42, n. 6, p. 1065-1069, 2012. DOI: https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000600019. Disponível em: https://www.scielo.br/j/cr/a/5jzw3yfnQbbgCkwhk8TYNYJ/abstract/?lang=pt. Acesso em: 31 mar. 2026.

MAGALHÃES, F. J. R.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; ALCÂNTARA, A. M.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; SENA, M. J.; PORTO, W. J. N. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle from Fernando de Noronha

Island, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 511-515, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612016051. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbpv/a/9xL4pY34YNhw4WQ6NkZxfbc/?lang=en. Acesso em: 31 mar. 2026.

MANZINI, S.; BERTOZZO, T. V.; AIRES, I. N.; RODRIGUES, N. J. L.; BERTOLINI, A. B.; ALEXANDRINO, M.; STEINLE, J. S.; MELO, R. P. B.; MOTA, R. A.; MEDEIROS, M. I. M.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; CURCI, V. C. L. M.; LUCHEIS, S. B. Comparison of molecular techniques for the detection of *Toxoplasma gondii* in raw bovine milk from small rural properties in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 409, p. 110466, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110466. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160523003835?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

MARANA, E. R. M.; VENTURINI, A. C. H.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em rebanhos de bovinos de leite do norte do Paraná – Brasil. *Semina:* Ciências Agrárias, Londrina, v. 16, n. 1, p. 40-42, 1995. DOI: https://doi.org/10.5433/1679-0359.1995v16n1p40. Disponível em: https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/4301. Acesso em: 31 mar. 2026.

MARQUES, J. M.; ISBRECHT, F. B.; LUCAS, T. M.; GUERRA, I. M. P.; DALMOLIN, A.; SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SILVA, A. V. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de uma comunidade rural do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Semina:* Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 4, p. 889-898, 2009. DOI: https://doi.org/10.5433/1679-0359.2009v30n4p889. Disponível em: https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/4084. Acesso em: 31 mar. 2026.

MEIRELES, L. R.; GALISTEO JUNIOR, A.; ANDRADE JUNIOR, H. F. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo,

v. 40, n. 4, p. 267-271, 2003. DOI: https://doi.org/10.1590/S1413-95962003000400005. Disponível em: https://www.scielo.br/j/bjvras/a/5YFLVmrRcSvZMgfLRkPX84j/?lang=en. Acesso em: 31 mar. 2026.

MELO, R. P. B.; OLIVEIRA, P. R. F.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; BARRETTO, M. L. M.; MOURA, G. H. F.; OLIVEIRA, A. A. F.; MOTA, R. A. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in heart tissue from common marmoset (*Callithrix jacchus*) monitored for yellow fever and rabies in Pernambuco State, northeastern of Brazil. *Veterinary Parasitology:* Regional Studies and Reports, Amsterdam, v. 21, p. 100447, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100447. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405939020302288?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

MILLAR, P. R.; SOBREIRO, L. G.; BONNA, I. C. F.; AMENDOEIRA, M. R. R. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. *Semina*: Ciências Agrárias, Londrina, v. 29, n. 3, p. 693-706, 2008. DOI: https://doi.org/10.5433/1679-0359.2008v29n3p693. Disponível em: https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2802. Acessado em: 2 mar. 2026.

MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with toxoplasma cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 58, n. 5, p. 928–937, 1972. DOI: https://doi.org/10.2307/3286588. Disponível em: https://www.jstor.org/stable/3286588?origin=crossref. Acesso em: 2 mar. 2026.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, London, v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, 2004. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X. Disponível em: https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(04)16412-X/fulltext. Acesso em: 2 mar. 2026.

MOURA, A. B.; OSAKI, S. C.; ZULPO, D. L.; GARCIA, J. L.; TEIXEIRA, E. B. Detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte abatidos em Guarapuava, PR, Brasil. *Archives of Veterinary Science*, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 94-99, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.5380/avs.v15i2.14779. Disponível em: https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/14779. Acesso em: 31 mar. 2026.

NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 312-316, 2005. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000300006. Disponível em: https://www.scielo.br/j/abmvz/a/9QRSs5vgPjmXYdXyn7cT64w/?lang=en. Acesso em: 31 mar. 2026.

OLIVEIRA, J. F.; CASSEB, A. R.; RAMOS, A. S.; ROLIM, S. T. F.; NOGUEIRA, H. L.; PINHO, R. O.; PEREIRA, W. L. Risk factors associated with the epidemiology of *Toxoplasma gondii* in cattle and buffaloes in the state of Pará, Brazil. *Semina:* Ciências Agrárias, Londrina, v. 39, n. 5, p. 2029-2038, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n5p2029. Disponível em: https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/30652. Acesso em: 31 mar. 2026.

OLIVEIRA, P. R. F.; MELO, R. P. B.; SIERRA, T. A. O.; SILVA, R. A.; SILVA DE OLIVEIRA, J. E.; ALMEIDA, B. G.; MOTA, R. A. Investigation of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocyst in urban public environment, in Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Exeter, v. 79, p. 101715, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101715. Disponível em:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957121001077?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

OLSEN, A.; BERG, R.; TAGEL, M.; MUST, K.; DEKSNE, G.; ENEMARK, H. L.; ALBAN, L.; JOHANSEN, M. V.; NIELSEN, H. V.; SANDBERG, M.; LUNDÉN, A.;

STENSVOLD, C. R.; PIRES, S. M.; JOKELAINEN, P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs, sheep, cattle, wild boars, and moose in the Nordic-Baltic region: a systematic review and meta-analysis. *Parasite Epidemiology and Control,* Amsterdam, v. *5,* e00100, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00100. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405673119300157?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

OSSANI, R. A.; BORGES, H. A. T.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; MILETTI, L. C.; FEDERLE, M.; MOURA, A. B. *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on West mesoregion of Santa Catarina state, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 69, n. 5, p. 1294-1300, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9177. Disponível em: https://www.scielo.br/j/abmvz/a/Xx4SqFg8syvMGJqgMcmLbFQ/?lang=en. Acesso em: 2 mar. 2026.

PASSOS, L. M. F. *Determinação da infecção por Toxoplasma gondii em bovinos e suínos abatidos em Belo horizonte (mg) através da frequência de anticorpos e tentativa de isolamento a partir de músculos de bovinos*. 1984. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1984.

RAZOOQI, M. A.; GHARBAN, H. A. J.; AL-KAABI, M. A.F. Molecular and seroprevalence of toxoplasmosis in goats' blood and milk in Iraq. *Archives of Razi Institute*, Karaj, v. 77, n. 5, p. 1749-1755, 2022. DOI: https://doi.org/10.22092/ARI.2022.357809.2106. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10133598/. Acesso em: 2 mar. 2026.

ROCHA, D. S.; MOURA, R. L. S.; MACIEL, B. M.; GUIMARÃES, L. A.; O'DWYER, H. N.; MUNHOZ, A. D.; ALBUQUERQUE, G. R. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected sheep's milk. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 8658-8662, 2015. DOI: https://doi.org/10.4238/2015.July.31.14. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26345797/. Acesso em: 2 mar. 2026.

RODRIGUES, N. J. L.; MANZINI, S.; KOELER FONSECA PEREIRA, J.; CRUZ, T. S.; BERTOZZO, T. V.; MORAES, G. N.; ABBADE, J. F.; LANGONI, H. Atualizações e padrões da toxoplasmose humana e animal: revisão de literatura. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v. 29, p. 1–15, 2022. DOI: https://doi.org/10.35172/rvz.2022.v29.704. Disponível em: https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/704. Acesso em: 2 mar. 2026.

ROSTAMI, A.; RIAHI, S. M.; GAMBLE, H. R.; FAKHRI, Y.; NOUROLLAHPOUR SHIADEH, M.; DANESH, M.; BEHNIAFAR, H.; PAKTINAT, S.; FOROUTAN, M.; MOKDAD, A. H.; HOTEZ, P. J.; GASSER, R. B. Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, London, v. 26, n. 6, p. 673–683, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.01.008. Disponível em: https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.org/article/S1198-743X(20)30033-1/fulltext. Acesso em: 2 mar. 2026.

ROUATBI, M.; AMDOUNI, Y.; AMAIRIA, S.; RJEIBI, M. R.; SAMMOUDI, A.; REKIK, M.; GHARBI, M. Molecular detection and phylogenetic analyses of *Toxoplasma gondii* from naturally infected sheep in Northern and Central Tunisia. *Veterinary Medicine and Science*, Oxford, v. 3, p. 22–31, 2017. DOI: https://doi.org/10.1002/vms3.53.Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/vms3.53. Acesso em: 2 mar. 2026.

SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. *Science*, New York, v. 85, p. 336-338, 1937. DOI: https://doi.org/10.1126/science.85.2205.336. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.85.2205.336. Acesso em: 2 mar. 2026.

SAH, R. P.; TALUKDER, M. H.; RAHMAN, A. K. M. A.; ALAM, M. Z.; WARD, M. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in ruminants in selected districts in Bangladesh. *Veterinary Parasitology:* Regional Studies and Reports, Amsterdam, v. 11, p. 1–5, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.10.008. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405939017301260?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

SAMPAIO, B. F. C.; MEIRELES, L. R.; ANDRADE JÚNIOR, H. F. Padronização da metodologia dot-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em saliva. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 310–319, 2016. DOI: https://doi.org/10.53393/rial.2015.v74.33485. Disponível em: https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/33485. Acesso em: 2 mar. 2026.

SANTIN, A. P. I.; JULIANO, R. S.; SILVA, A. C.; OLIVEIRA, V. S. F.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; BRITO, W. M. E. D. Soroepidemiologia de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos da raça Curraleiro. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 18, e44649, 2017. DOI: https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-44649. Disponível em: https://www.scielo.br/j/cab/a/6sBtzvvSyp6s9gHhWvpvpGm/?format=html&lang=pt. Acesso em: 31 mar. 2026.

SANTOS, E. J. F.; CUNHA, M. Interpretação crítica dos resultados estatísticos de uma meta-análise: estratégias metodológicas. *Millennium - Journal of Education, Technologies and Health*, Viseu, n. 44, p. 85–98, 2013. Disponível em: https://revistas.rcaap.pt/millenium/article/view/8169. Acesso em: 2 mar. 2026.

SANTOS, L. F.; DAMÉ, M.; CADEMARTORI, B.; CUNHA NETO, F.; FARIAS, N. R.; RUAS, J. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in water buffaloes and meat cattle in Rio Grande do Sul State, southern Brazil. *Acta Parasitologica*, Cham, v. 58, n. 3, p. 334-336, 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.2478/s11686-013-0148-4. Disponível em: https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.2478/s11686-013-0148-4/html. Acesso em: 31 mar. 2026.

SANTOS, S. L.; COSTA, K. S.; GONDIM, L. Q.; SILVA, M. S. A.; UZÊDA, R. S.; ABE-SANDES, K. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil.

Parasitology Research, Berlin, v. 106, n. 2, p. 457-461, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1686-4. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-009-1686-4. Acesso em: 31 mar. 2026.

SANTOS, T. R.; COSTA, A. J.; TONIOLLO, G. H.; LUVIZOTTO, M. C. R.; BENETTI, A. H.; SANTOS, R. R. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 161, n. 3-4, p. 324-326, 2009. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709000454?via%3Dihub. Acesso em: 31 mar. 2026.

SILVA, F. W. S.; ALVES, N. D.; AMÓRA, S. S. A.; TEXEIRA, F. H. V.; ACCIOLY, M. P.; CARVALHO, C. G.; NÓBREGA, R. M.; FILGUEIRA, K. D.; FEIJÓ, F. M. C. Toxoplasmose: uma revisão. *Ciência Animal*, Fortaleza, v. 16, n. 2, p. 71-77, 2006. Disponível em: https://www.cemevcursos.com/uploads/5/0/2/1/5021635/toxoplasmose.pdf. Acesso em: 25 fev. 2026.

SILVA, J. B.; CASTRO, G. N. S.; SANTOS, P. N.; FONSECA, A. H.; LIMA, D. H. S.; BOMJARDIM, H. A.; REIS, A. S. B.; SOARES, S. O.; BARBOSA, J. D**.** Detection of a high prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cattle in Northern and Midwestern Brazil. *Revista de Salud Anima*l, La Habana, v. 37, n. 1, p. 52-56, 2015. Disponível em: https://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/538. Acesso em: 31 mar. 2026.

SILVA, J. B.; NICOLINO, R. R.; FAGUNDES, G. M.; BOMJARDIM, H. A.; REIS, A. S. B.; LIMA, D. H. S.; OLIVEIRA, C. M. C.; BARBOSA, J. D.; FONSECA, A. H. Serological survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle (*Bos indicus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in ten provinces of Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Exeter, v. 52, p. 30-35, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2017.05.005. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957117300383?via%3Dihub. Acesso em: 31 mar. 2026.

SILVA, J. G.; ALVES, B. H. L. S.; MELO, R. P. B.; KIM, P. C. P.; SOUZA NETO, O. L.; BEZERRA, M. J. G.; SÁ, S. G.; MOTA, R. A. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep and goats of local breeds reared in Northeastern Brazil. *Acta Tropica*, Basel, v. 142, p. 145–148, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.011. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X14003805?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

SILVA, N. R. S.; CHAPLIN, E. L.; ARAÚJO, F. A. P.; MENDEZ, L. D. V. Frequência de anticorpos de *Toxoplasma gondii* em soros de bovinos de leite da Grande Porto Alegre, RS. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, v. 10-11, p. 81-84, 1983.

SOUZA, J. B. R.; SOARES, V. E.; MAIA, M. O.; PEREIRA, C. M.; FERRAUDO, A. S.; CRUZ, B. C.; PIRES, W. F. T.; FELIPPELLI, G.; MACIEL, W. G.; GONÇALVES, W. A.; COSTA, A. J.; LOPES, W. D. Z. Spatial distribution and risk factors for *Toxoplasma gondii* seropositivity in cattle slaughtered for human consumption in Rondônia, North region, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 226, p. 145-149, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401716302758. Acesso em: 31 mar. 2026.

SPAGNOL, F. H.; PARANHOS, E. B.; OLIVEIRA, L. L. S.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. G.; ALBUQUERQUE, G. R. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos em matadouros do estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária,* Jaboticabal, v. 18, n. 2, p. 42-45, 2009. DOI: http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01802009. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbpv/a/MYF9kjH35BG9fjJKXDfNPMD/?lang=pt. Acesso em: 31 mar. 2026.

STELZER, S.; BASSO, W.; BENAVIDES SILVÁN, J.; ORTEGA-MORA, L. M.; MAKSIMOV, P.; GETHMANN, J.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: risk factors and economic impact. *Food And Waterborne Parasitology*, Amsterdam, v. 15, e00037, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405676618300441?via%3Dihub. Acesso em: 2 mar. 2026.

SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, London, v. 137, n. 1, p. 1–11, 2010. DOI: https://doi.org/10.1017/S0031182009991065. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/moving-towards-an-integrated-approach-to-molecular-detection-and-identification-of-toxoplasma-gondii/A6324E1CF398DEC28857B8B63374DC27. Acesso em: 2 mar. 2026.

TEUTSCH, S. M.; JURANEK, D. D.; SULZER, A.; DUBEY, J. P.; SIKES, R. K. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *The New England Journal of Medicine*, London, v. 300, n. 13, p. 695-699, 1979. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJM197903293001302. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197903293001302. Acesso em: 2 mar. 2026.

VAZ, R. S.; RAULI, P.; MELLO, R. G.; CARDOSO, M. A. Toxoplasmose congênita: uma doença negligenciada? Atual política de saúde pública brasileira. *Field Actions Science Reports,* Paris, n. esp. 3, 2011. Disponível em: http://journals.openedition.org/factsreports/1107. Acesso em: 25 fev. 2026.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A.H. Toxoplasmosis in man and swine—An investigation of the possible relationship. *Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 161, n. 3, p. 229–232, 1956. DOI: https://doi.org/10.1001/jama.1956.62970030012010. Disponível em: https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/319080. Acesso em: 2 mar. 2026.

WESOŁOWSKI, R.; PAWŁOWSKA, M.; SMOGUŁA, M.; SZEWCZYK-GOLEC, K. Advances and challenges in diagnostics of toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Pathogens*, Basel, v. 12, n. 1, p. 110, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/pathogens12010110. Disponível em: https://www.mdpi.com/2076-0817/12/1/110. Acesso em: 2 mar. 2026.

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science*, New York, v. 89, n. 2306, p. 226-7, 1939. DOI: https://doi.org/10.1126/science.89.2306.226. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.89.2306.226. Acesso em: 2 mar. 2026.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*, London, v. 7, p. 299-316, 1993. DOI: https://doi.org/10.1097/00002030-199303000-00001. Disponível em: https://journals.lww.com/aidsonline/citation/1993/03000/biology_of_toxoplasma_gondii.1.aspx. Acesso em: 2 mar. 2026.

CAPÍTULO 3

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado à revista científica Veterinary Research Communications.

Normas para publicação na revista: https://link.springer.com/journal/11259/submission-guidelines

Fator de impacto: 2.2

Molecular evidence of *Toxoplasma gondii* in raw bovine milk from rural settlements

Abstract

Toxoplasmosis is a zoonosis with a wide global distribution. Felines can be both definitive and intermediate hosts, while birds and mammals, including humans and cattle, act as intermediates. Although cattle are considered inefficient in maintaining the life cycle of this parasite, the infection has sanitary and zoonotic relevance, mainly due to the consumption of raw milk and implications in family farming systems. We investigated the presence of *T. gondii* in raw milk from 160 lactating cows from 20 rural settlements in seven municipalities in northwestern São Paulo state. Pooled samples from all four teats were subjected to conventional PCR (TOX4/TOX5), Nested PCR (TgNP1/TgNP2), and Phylum Apicomplexa (Tg18s48F/Tg18s359R). A positivity rate of 13.12% (21/160) was detected by conventional PCR; 26.25% (42/160) by Nested PCR and 100% (160/160) for the phylum Apicomplexa, with a statistically significant difference between the three primer sets evaluated ($Q = 48.1091$; $df = 2$; $p < 0.0001$). Three Nested PCR-positive samples were sequenced, one with 99.45% similarity and two with 100% similarity for *T. gondii*, confirming the identity of the protozoan. By our findings, raw milk can represent a potential source of infection, reinforcing the need for sanitary control, guidance for producers, and caution regarding the consumption and marketing of unpasteurized foods.

Keywords: Diagnosis; Milk; Toxoplasmosis; Cows; Family farming

Introduction

The obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) has a cosmopolitan geographic distribution and infects a wide variety of domestic and wild mammals and birds, including felids and humans, demonstrating its high zoonotic potential (Dubey, 2022; Hatam-Nahavandi *et al.*, 2021).

Among the various transmission routes described, horizontal transmission occurs predominantly by oral route, through the ingestion of tissue cysts present in the tissues of intermediate hosts or by accidental ingestion of oocysts present in the environment and in contaminated food (Dubey, 1994). Congenital infection can occur when the pregnant female is primarily infected or by reactivation of the infection during gestation in situations of immunosuppression. During parasitemia, *T. gondii crosses* the placenta and invades developing fetal tissues (Rojas-Pirela *et al.*, 2021).

Infection by the protozoan is largely asymptomatic in immunocompetent individuals; however, it can cause severe clinical manifestations in immunosuppressed individuals, pregnant women, fetuses, and neonates, leading to varied clinical presentations in different species and, in severe cases, death (Dubey *et al.*, 2020).

Cattle act as intermediate hosts in the biological cycle of *T. gondii*, with the main route of infection being the ingestion of pastures contaminated with oocysts, mainly in extensive farming systems. Although there are few reports of infection in cattle in Brazil, studies have shown that these animals are susceptible to infection, but relatively resistant to the development of clinical disease, being able to eliminate the parasite or reduce it to undetectable levels in a few weeks (Millar *et al.*, 2008; Dubey; Jones, 2008; Costa *et al.*, 2011).

The consumption of animal products, such as raw bovine milk, has increased due to cultural, sensory, and nutritional aspects. However, this habit can increase the transmission of zoonotic pathogens, including *T. gondii* (Cisak *et al.*, 2017). Although investigations of *T. gondii* in raw milk are more frequent in goats, where the potential for parasite transmission and

productive impacts, such as fetal death, births of debilitated animals, mummification, and even abortions, have already been demonstrated, data regarding the presence of the parasite in raw bovine milk are still scarce (Deljavan *et al.*, 2022; Fatmawati *et al.*, 2022).

Given the epidemiological importance of toxoplasmosis, the diversity of transmission routes described, and the scarcity of information on the role of raw bovine milk in *T. gondii* infection, we aimed to investigate, using molecular techniques, the presence of *T. gondii* in cow's milk samples from small farms in rural settlements and spatial analysis of positive locations.

Material and methods

Ethics Committee

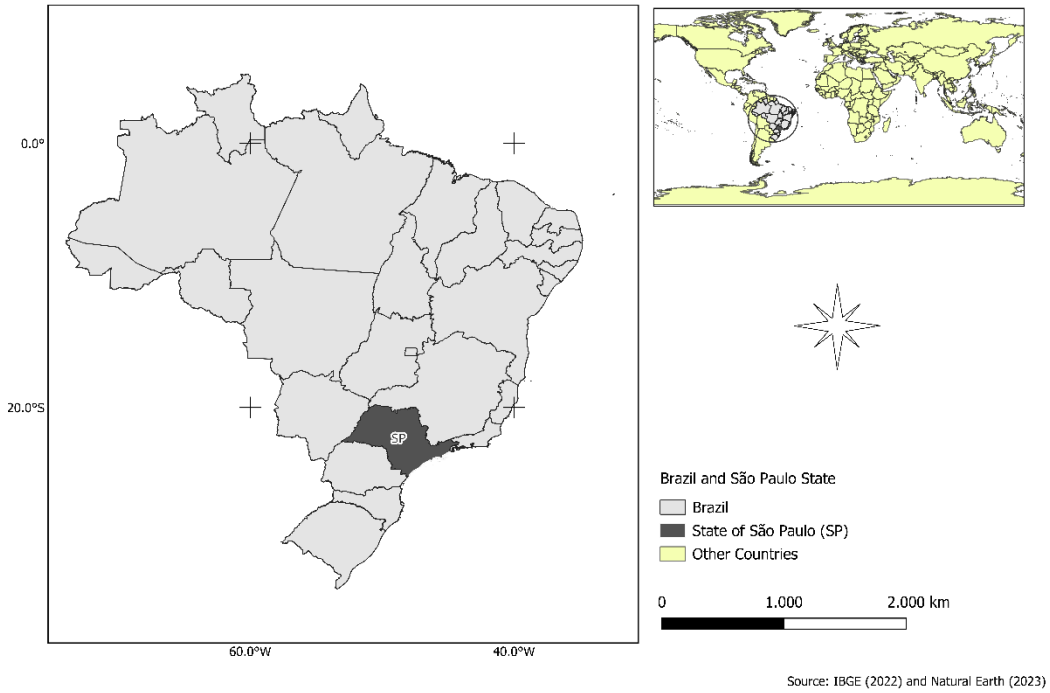
This research project was approved by the Ethics Committee – CEUA of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science – FMVZ – UNESP under number 000.206/2024.

Study area

The present study was carried out in rural settlements of the northwestern region of the State of São Paulo, Brazil, covering seven municipalities (Andradina, Castilho, Guaraçaí, Ilha Solteira, Itapura, Murutinga do Sul, and Pereira Barreto). This region has a tropical climate, characterized by the presence of a hot and rainy season and a cooler and dry season, with an average annual rainfall of 1,500 mm and temperatures ranging from 18ºC to 27ºC.

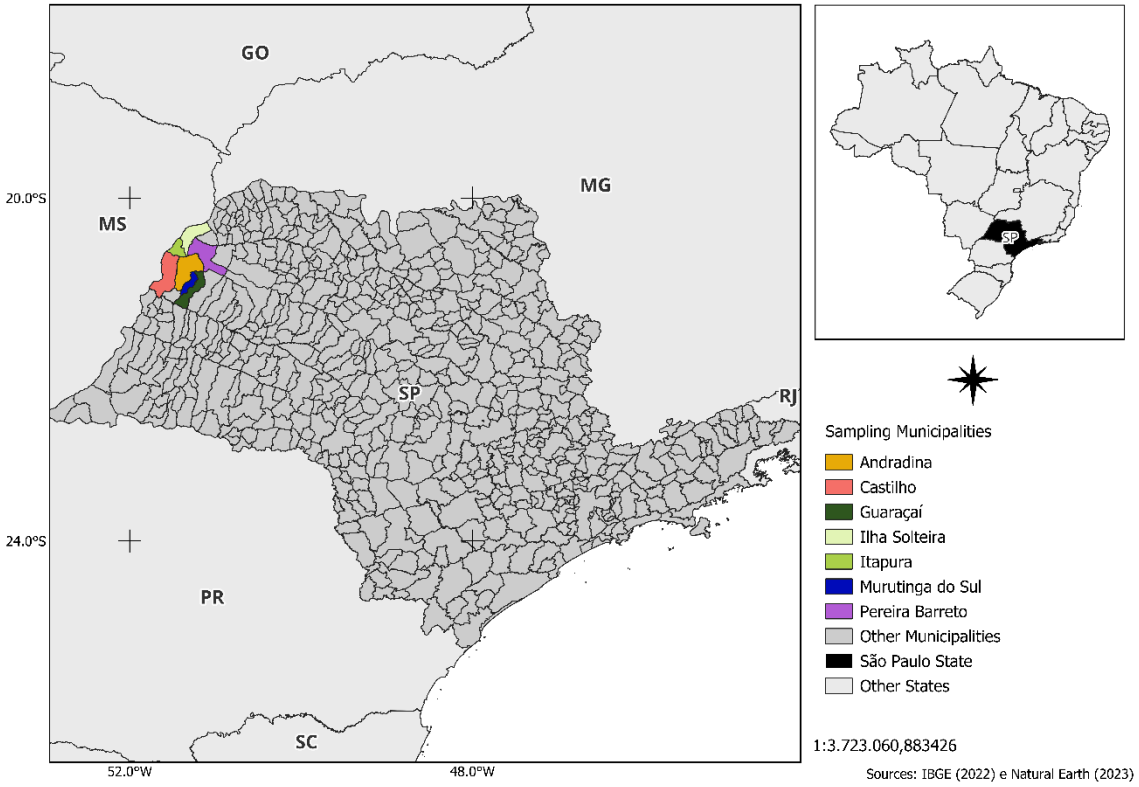
72

73 **Fig. 1** Map identifying South America, Brazil, and the State of São Paulo



74 **Fig. 2** Map of the State of São Paulo highlighting the municipalities where the animals

75 included in the study were sampled



Animals and samples

The herds evaluated were predominantly composed of crossbred animals, with a prevalence of zebu phenotypic characteristics raised in an extensive system, under continuous grazing, without feed supplementation, and with water supplied from an artesian well. The adoption of corn silage during the winter period, characterized by drought conditions and limited pasture availability, was verified in a small number of properties.

Milk samples were conveniently collected from a total of 160 dairy cows, from 29 properties in 20 settlements, covering seven municipalities, sampling eight (08) animals per property when only one property per settlement was visited. In cases where two properties per settlement were visited, four samples were collected from each, totaling eight (08) animals (Table 1). Milk samples were collected by manual milking of the four teats, directly into a 15 mL centrifuge tube. The samples were immediately refrigerated until they reached the laboratory. At the laboratory, the milk was frozen at - 20ºC until the DNA extraction process.

Table 1. Number of animals and rural properties per settlement sampled and distributed across seven municipalities in the Northwest region of the state of São Paulo, for the collection of milk from lactating cows for *Toxoplasma gondii* research.

Municipality	Settlement	Number of properties	Total
Andradina	Primavera	2	32
	Fazenda São Sebastião	2	
	Timboré	2	
	Josué de Castro	1	
Castilho	Rio Paraná	2	32
	Pendengo	1	

	N. S. Aparecida II	1	
	Terra Livre	1	
Guaraçaí	Nova Vila	1	32
	Moinho	1	
	São José	1	
	Aroeira	1	
Ilha Solteira	Estrela da Ilha	2	8
Itapura	Roseli Nunes	1	16
	Zumbi dos Palmares	1	
Murutinga do Sul	Orlando Molina	2	32
	Dois Irmãos	2	
	Santa Cristina	2	
	Dois Irmãos	2	
Pereira Barreto	Esmeralda	2	16
	Terra é Vida	1	
Total	20	29	160

DNA extraction

For the milk samples, the commercial Illustra Blood GenomicPrep Kit (Cytiva®) was used, according to the protocol indicated by the manufacturer and modifications by Cunha *et al.* (2006).

Endogenous extraction control

Following the extraction process, all samples were subjected to an endogenous extraction control corresponding to a constitutive gene present in each sample tested. A conserved fragment of vertebrate β-hemoglobin was 100 utilized as an endogenous control, and the β-1

(5'ACCACCAACTTCATCCACGTTCAC3') and β-2 (5'CTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC3') *primers* were used for its amplification (Livak; Schmittgen, 2001).

The reaction was carried out in a thermocycler at Eco Healthcare – Swift MaxPro Thermal Cycle, with a final volume of 12 µL.

The amplification cycle consisted of a denaturation period of 50 minutes at 95°C, an annealing period of 30 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C. Final extension cycle of 5 minutes at 72°C. After that, the mixture will be refrigerated to 4ºC.

Conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) – TOX4/TOX5 *primers*

cPCR was performed under the following conditions: each 0.2 mL reaction tube received PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl), 1.6 mM MgCl2, 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0.2 µM of each primer, 1 µL of the tested sample, and 8.3 µL of ultrapure water (PCR mix). Thus, each tube contains 11 µL of the PCR mix and 1 µL of the DNA extraction product, totaling 12 µL. A cPCR was performed to amplify the 529 bp repetitive fragment, consisting of 200-300 copies in the *T. gondii* genome, to ensure the amplification quality of the extracted DNA using the TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) and TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) *primers*, according to Homan *et al.* (2000), with modifications. The amplification conditions were performed in an Eco Healthcare – Swift MaxPro Thermal Cycle thermocycler, with a final volume of 12µL

The amplification cycle consisted of a denaturation period of 7 minutes at 94 ºC, an annealing period of 40 cycles of 1 minute at 94 ºC, 1 minute at 55 ºC, and 1 minute at 72 ºC. A final extension cycle of 5 minutes at 72 ºC followed. After this, the mixture was cooled to 4 ºC.

Nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR) – TgNP1/TgNP2 *primers*

For the detection of *T. gondii* DNA by Nested PCR, the external *primers* NN1 (CCTTTGAATCCCAAGCAAAACATGAG) and NN2(GCGAGCCAAGACATCCATTGCTGA), which hybridize to the ITS1 region common to *T. gondii* and *Neospora caninum* (Hurtado *et al.*, 2001), and the internal *primers* TgNP1 (GTGATAGTATCGAAAGGTAT) and TgNP2 (ACTCTCTCTCAAATGTTCCT), which amplify a 227 bp fragment of the ITS1 region of *T. gondii*, were used. Each 0.2 mL reaction tube received PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl), 1.6 mM MgCl2, 0.2 mM dNTPs, 1U Taq polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0.2 µM of each primer, 1 µL of the tested sample, and 8.3 µL of ultrapure water (PCR-MIX). Thus, each tube contains 11 µL of PCR-MIX and 1 µL of the DNA extraction product, totaling 12 µL. The amplification conditions in an Eco Healthcare – Swift MaxPro Thermal Cycle thermocycler, with a final volume of 12 µL.

The DNA was amplified with 3 min of denaturation at 94 ºC, followed by 15 cycles of 94 ºC for 30 s, 65 ºC for 45 s, 72 ºC for 1 min, and a final extension at 72 ºC for 5 min. The internal *primers* were amplified at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 20 s, 53°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 5 min (Hurtado *et al.*, 2001, with modifications).

Nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR) – *primers* Tg18s48F/Tg18s359R - Phylum Apicomplexa.

T. gondii DNA was detected by Nested PCR using the 18S ribosomal DNA (rDNA) gene of the phylum Apicomplexa, family Sarcocystidae (*Eimeria* spp., *Hammondia* spp., *Isospora* spp., *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp., and *T. gondii*). The amplification mixture consisted of 0.5 µL of each primer at 2 µM, 6.25 µL of GoTaqGreen Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 2.75 µL of ultrapure water, and 1 µL of DNA in a final volume of 12 µL. The first PCR reaction was performed using the external *primers* Tg18s48F (CCATGCATGTCTAAGTATAAGC) and Tg18s359R (GTTACCCGTCACTGCCAC). For the second reaction, the internal *primers* used were Tg18s58F (CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC) and Tg18s348R (TGCCACGGTAGTCCAATAC), which amplify 300 bp (Su *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2020;

Oliveira *et al.*, 2021). The amplification conditions in an Eco Healthcare – Swift MaxPro Thermal Cycle thermocycler, with a final volume of 12 µL.

For the external *primers,* there was an initial denaturation period at 94 ºC for 2 min, 30 denaturation cycles at 94 ºC for 30 s, annealing at 57 ºC for 30 s, extension at 72 ºC for 30 s, and a final extension at 72 ºC for 1 min. For the internal *primers*, the same thermal profile as the first reaction was used, but 35 cycles were performed in the annealing phase.

Electrophoresis

To visualize amplification, 8 µL aliquots of the amplified samples were homogenized with 2 µL of running buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol, 70% ultrapure water) and subjected to electrophoresis in a horizontal tank (Major Science) containing 1X TBE (0.1M Tris, 0.09M boric acid, and 0.001M EDTA). The identification of the amplified products was performed by electrophoresis on a 2% agarose gel, stained with Sybr® Safe (Invitrogen) at 0.1 µL/mL.

The voltage used will be 120V, 90A for 60 minutes (1 h). For the molecular weight standard, the LowRanger 100 bp DNA Ladder (Norgen) was used, and the size of the amplified fragments was visually compared with the molecular weight standards of the standard strains used as positive controls. The amplified products were visualized using a transilluminator (Bio-Rad UV Transilluminator 2000).

Controls

As positive controls, RH strains of *T. gondii*, provided by the Zoonosis Diagnostic Laboratory of FMVZ – UNESP - Botucatu, were used. Sterile ultrapure water was the negative control.

Sequencing

Nested PCR samples were evaluated on 2% agarose gel stained with GelRed and visualized under UV light. For sequencing, the *primers* NN1/NN2 and TgNP1/TgNP2 were used.

The BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) and Ethanol/EDTA/Sodium Acetate precipitation reaction were performed according to the protocol suggested by the manufacturer. Automated sequencing was performed by capillary electrophoresis on the ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

After sequencing, electropherogram analysis was performed using Geneious 4.8.3 and Chromas Lite programs, in the form of electropherograms aligned by the MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 10.0 program (Kumar *et al.*, 2018). Subsequently, they were submitted to BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and compared with sequences deposited in the databases.

Spatial analysis

Using a digital database, spatial analysis was performed by mapping the samples that tested positive using the molecular techniques employed, with the aim of spatially assessing the distribution of positive and negative cases across the study areas. For this purpose, QGIS software (QGIS Development Team, 2023) was used to construct the database and produce cartographic products.

Statistical analysis

Statistical analysis involved performing Cochran's Q test to determine whether three or more combined sets of frequencies or proportions differed significantly from one another. In this instance, the test made it possible to assess whether the three *primers* used differed in their performance across the 160 samples tested (Santos & Cunha, 2013). A significance level of 5% ($p < 0.05$) was adopted.

Results

Conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) – TOX4/TOX5 *primers*

All 160 samples were analyzed by conventional PCR (cPCR) using the TOX4 and TOX5 *primers*. Of these, 21/160 (13.12%) tested positive. Positive samples were distributed as follows:

3/32 (9,37%) from Josué De Castro settlement Andradina; 1/32 (3.12%) from the Rio Paraná settlement Castilho; 1/8 (12.50%) from Estrela da Ilha settlement Ilha Solteira; 9/16 (56.25%) from Itapura, including 7 from Roseli Nunes and 2 from Zumbi dos Palmares; 6/24 (25%) from Orlando Molina settlement Murutinga do Sul; and 1/16 (6.25%) from Terra é Vida settlement Pereira Barreto.

Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) – TgNP1/TgNP2 *primers*

All 160 samples were analyzed by Nested PCR using the external *primers* NN1/NN2, followed by the internal *primers* TgNP1/TgNP2. A total of 42/160 (26.25%) samples showed amplification. Positive samples were distributed as follows: 11/32 (34,37%) from Andradina, including 2 from Primavera, 3 from Fazenda São Sebastião, 2 from Timboré, and 4 from Josué De Castro; 7/32 (21.87%) from Castilho, comprising 1 from Rio Paraná, 3 from Pendengo, and 3 from Terra Livre; 6/32 (18.75%) from Guaraçaí, including 2 from Nova Vila, 2 from Moinho, 1 from São José 2, and 1 from Aroeira; 4/8 (50.00%) from Estrela da Ilha (Ilha Solteira); 5/16 (31.25%) from Itapura, with 2 from Roseli Nunes and 3 from Zumbi dos Palmares; and 9/24 (37.50%) from Murutinga do Sul, including 3 from Orlando Molina, 2 from Santa Cristina, and 4 from Dois Irmãos.

Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) – Phylum Apicomplexa

All 160 samples were subjected to the Nested PCR technique using the *primers* Tg18s48F and Tg18s359R, followed by Tg18s58F and Tg18s348R. As a result, all samples were positive 160/160 (100%).

Sequencing

Samples with sufficient DNA quality for sequencing were selected. Accordingly, three samples testing positive for *T. gondii* via nested PCR (using *primers* NN1/NN2 and TgNP1/TgNP2) were submitted: one sample from the Roseli Nunes settlement (sample 102); one sample from the Zumbi dos Palmares settlement (sample 107), located in the municipality of

Itapura; and one sample from the Orlando Molina settlement (sample 116), in the municipality of Murutinga do Sul.

The amplicons were visualized using Chromas 2.6.6 software in the form of an electropherogram. The three (03) samples showed similarity to *T. gondii* with the TGNP1 and TGNP2 *primers*, being: sample 102 obtained 99.45% (access key: ON072251.1) similarity, sample 107 obtained 100.00% (access key: ON337182.1) similarity, and sample 116 obtained 100.00% similarity (access key: ON337182.1).

Spatial analysis

A spatial analysis was conducted of the municipalities where the evaluated dairy farms were located and where *T. gondii* was detected in the milk using the TOX4/TOX5 (cPCR) and TgNP1/TgNP2 (nested PCR) primer sets.

Fig. 3 Spatial distribution of the number of bovine milk samples positive in conventional PCR for *Toxoplasma gondii*, using the TOX4 and TOX5 *primers*, in the rural settlements evaluated in the Northwest of the State of São Paulo, Brazil

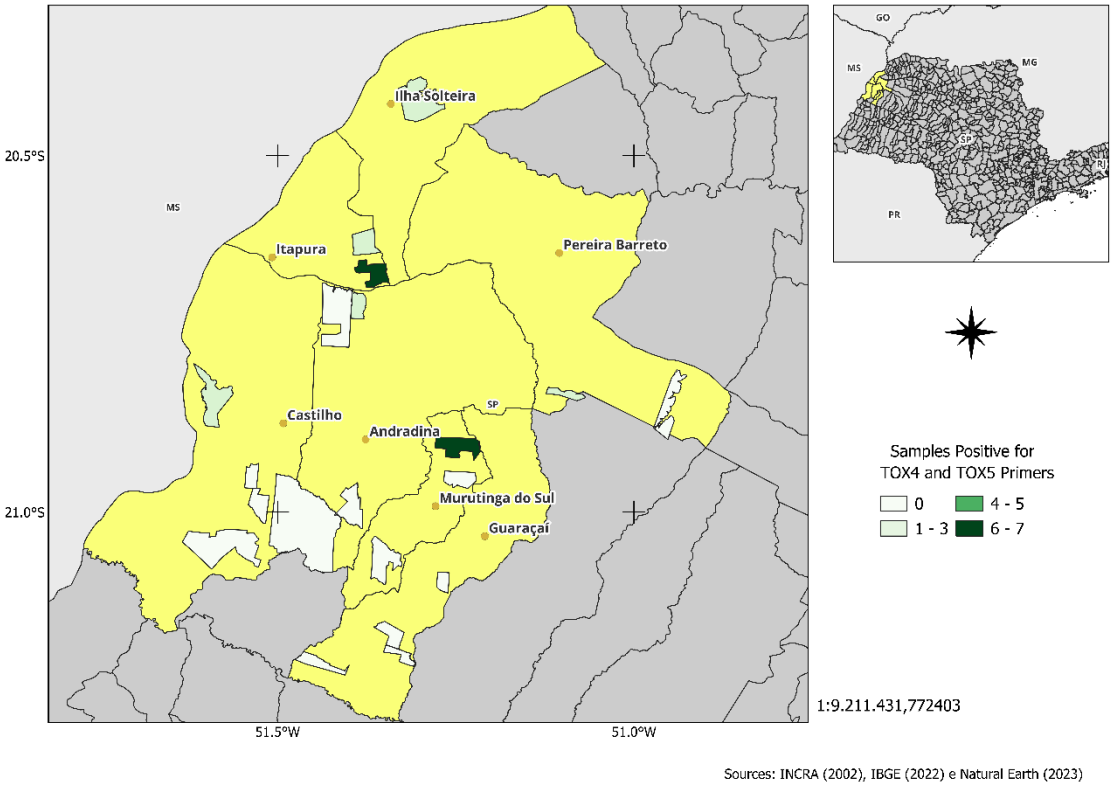
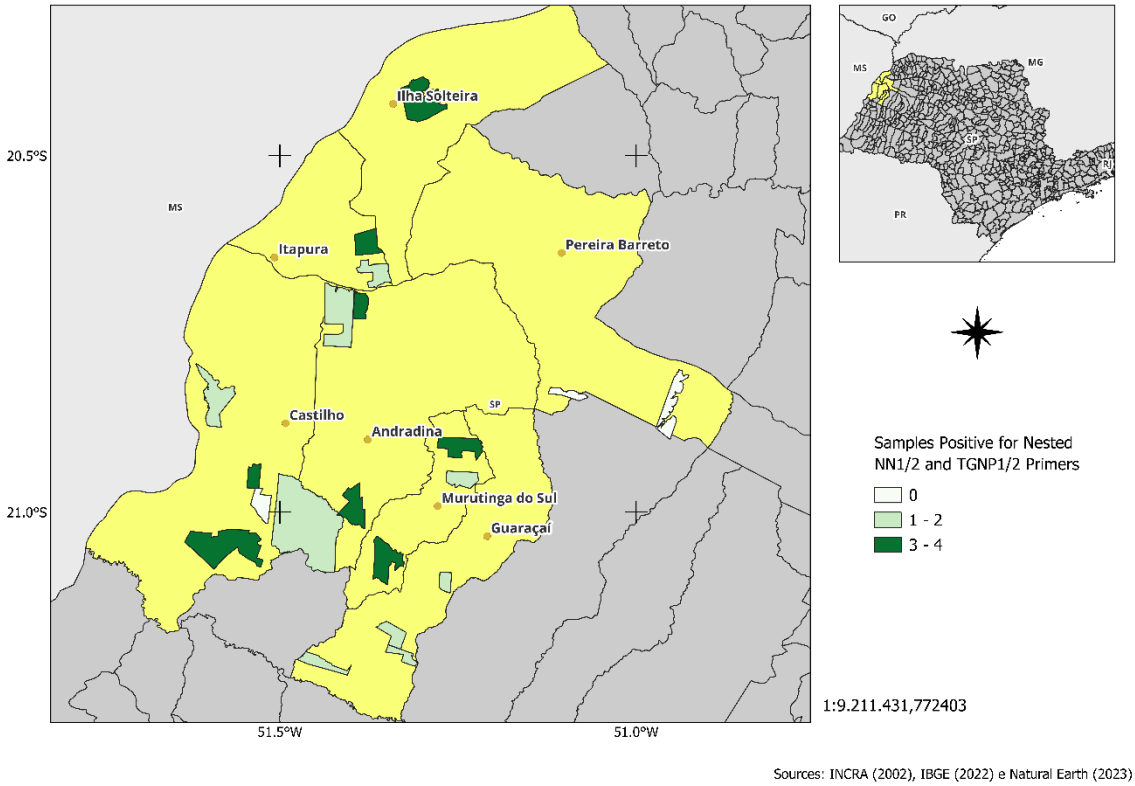


Fig 4 Spatial distribution of the number of bovine milk samples testing positive by nested PCR for *Toxoplasma gondii*, using *primers* NN1/NN2 and TgNP1/TgNP2, in the rural settlements evaluated in the northwest of São Paulo State, Brazil



Statistical Analysis

For the statistical analysis, Cochran's Q test was performed to assess whether three or more related sets of frequencies or proportions differed significantly from one another (Santos & Cunha, 2013), adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$).

Among the 160 samples analyzed, the TOX4/TOX5 primer pair detected 21 (13.13%) positive samples, whereas the NN1/NN2 –TGP1/TGP2 primer pair detected 42 (26.25%) positive samples. The Tg18s48F/Tg18s359R primer pair produced amplification in all analyzed samples (100%).

Cochran's Q test revealed a statistically significant difference among the three primer sets evaluated ($Q = 48.1091$; $df = 2$; $p < 0.0001$), indicating that the molecular assays exhibited different detection frequencies in the analyzed samples.

Discussion

We demonstrated the presence of *Toxoplasma gondii* DNA in raw bovine milk samples collected from rural settlements in the northwestern region of São Paulo State, Brazil.

The consumption of raw bovine milk and its unpasteurized derivatives represents a potential risk to public health, since infectious forms of the parasite, such as tachyzoites, may be present in this food. In this context, knowledge of the critical points and risk factors associated with milk production and consumption is essential for the prevention of foodborne infections. The safety and quality of milk are directly related to human health, considering that this food can act as a vehicle for various zoonotic pathogens, in addition to *T. gondii* (Gharekhani *et al.*, 2021; Cisak *et al.*, 2017).

The presence of *Toxoplasma gondii* in bovine milk from rural properties indicates that the consumption of unpasteurized milk and its derivatives, as well as the inadequate processing of these products, may represent a potential route of transmission of this pathogen. Therefore, bovine milk assumes epidemiological relevance as a possible source of human infection by *T. gondii*. The importance of conducting epidemiological studies focused on bovine milk is highlighted, considering its high consumption and the need to better understand the prevalence of toxoplasmosis associated with this route, especially given the scarcity of research on this species compared to caprine milk.

The detection of *T. gondii* in bovine milk reinforces the importance of adopting good hygiene practices on rural properties and using technologies that ensure the production of safe food. Considering that many risk factors are of environmental origin and are difficult to control, investment in health education actions is essential for the control and prevention of infection by this protozoan (Silva *et al.*, 2015).

Conventional PCR and Nested PCR successfully detected the parasite, and genetic sequencing confirmed the identity of *T. gondii* in samples that tested positive by molecular assays.

Regarding diagnosis, the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique has demonstrated greater accuracy, sensitivity, and specificity compared to traditional methods. In addition to enabling the detection of small amounts of target DNA, PCR has the advantage of providing results in a short period of time, making it an efficient and reliable diagnostic tool (Dehkordi *et al.*, 2013; Sah *et al.*, 2018).

The TOX4 and TOX5 *primers* are widely described in the literature and commonly used in the detection of *T. gondii* by conventional PCR, showing good specificity and sensitivity. Previous studies have reported the identification of the parasite in goat and sheep milk samples using these *primers*, reinforcing PCR as an efficient method for the detection of *T. gondii* in different dairy matrices (Bezerra *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2015; Ossani *et al.*, 2017).

However, the application of Nested PCR, initially using the NN1/NN2 *primers* followed by TgNP1/TgNP2, targeting the amplification of the ITS1 region of *T. gondii* rRNA, has demonstrated greater sensitivity and specificity when compared to conventional PCR with the TOX4 and TOX5 *primers*. This superior performance is related to the high copy number and interspecific variability of the ITS1 region, characteristics that favor the detection of the parasite even in samples with low parasite load (Hurtado *et al.*, 2001; Rouatbi *et al.*, 2017).

Fonseca *et al.* (2023) conducted a study on 106 cow milk samples in southern Brazil using nested PCR with *primers* TgNP1/TgNP2 as the diagnostic method, detecting 2.8% (3/106) samples positive for *T. gondii*. In eight municipalities in the central-western region of São Paulo state, Manzini *et al.* (2024) used conventional PCR (cPCR) with *primers* TOX4/TOX5, as well as nested PCR with *primers* TgNP1/TgNP2 and Tg18s48F/Tg18s359R, to detect the presence of *T. gondii* in bovine milk samples from 102 cooling tanks on small family farms; parasite DNA was detected in 5/102 (4.90%), 13/102 (12.74%), and 3/102 (2.94%) of the samples, respectively. In comparison, the present study yielded results of 21/160 (13.12%), 42/160 (26.25%), and 160/160 (100%), respectively, demonstrating that these methods are sensitive for detecting *T. gondii* DNA in milk. The use of Nested PCR using NN1/NN2 *primers* followed by

TgNP1/TgNP2, in this research, proved to be more sensitive compared to conventional PCR; so, we can say then that perhaps its use is not ideal for detecting *T. gondii* in bovine milk.

In addition, Nested PCR targeting the 18S rDNA region of the phylum Apicomplexa also shows high reliability and sensitivity, allowing the differentiation of *T. gondii* from other phylogenetically related protozoa, which reinforces the superiority of this technique in relation to conventional PCR (Su *et al.*, 2010). It was observed that for the Nested PCR – Phylum Apicomplexa, 100% of the milk samples were positive compared to the other *primers* used; however, not all samples were positive for *T. gondii*, which could indicate the presence of other protozoa belonging to the phylum Apicomplexa, family Sarcocystidae (*Eimeria* spp., *Hammondia* spp., *Isospora* spp., *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp.) (Table 2).

Table 2. Milk samples and percentage of positivity for *Toxoplasma gondii* according to the *primers* used in each sample.

Municipalities	Number of samples	*Primers* TOX 4/ TOX 5	%	*Primers* TGNP1/TGNP2	%	*Primers* Tg18s48F/ Tg18s359R	%
Andradina	32	3	9,37	11	34,37	32	100
Castilho	32	1	3,12	7	21,87	32	100
Guaraçaí	32	0	0	6	18,75	32	100
Ilha Solteira	8	1	12,50	4	50	8	100
Itapura	16	9	56,25	5	31,25	16	100
Murutinga do Sul	24	6	25	9	37,50	24	100
Pereira Barreto	16	1	6,25	0	0	16	100
Total	160	21	13,12	42	26,25	160	100

PCR allows the detection of *T. gondii* tachyzoite DNA in milk, a parasitic stage characteristic of the acute phase of infection. The presence of this DNA in body fluids occurs, on

average, between 12 and 15 days after infection, a period in which the tachyzoites circulate in the bloodstream. Subsequently, encystment occurs in the tissues, with differentiation into bradyzoites, which reduces the possibility of detecting the parasite in milk (Silva *et al.*, 2015). In this study, it was possible to detect *T. gondii* DNA during the period of 12 to 15 days post-infection; however, there is a possibility that dairy cows with negative milk samples had been previously infected and thus harbored tissue cysts.

The geographical distribution of the municipalities where *Toxoplasma gondii* was detected suggests circulation of the parasite in the study region, given their geographical proximity to one another.

According to information provided by producers during farm visits, most of the milk produced was destined for regional dairy processors, generally through cooperatives of resettled farmers, such as the Cooperativa de Produção Agropecuária dos Assentados e Pequenos Produtores da Região Noroeste do Estado de São Paulo (COAPAR). A smaller portion was used for the families' own consumption, either as raw milk or in the artisanal production of cheese and butter. Technical assistance was provided on an occasional basis, primarily by veterinarians from the Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo (ITESP). During visits to rural properties, possible factors associated with the risk of contamination of bovine milk and the environment were observed, such as the coexistence of multiple animal species, especially cats and chickens, as well as dogs and pigs, and the presence of debris and garbage disposal sites.

During visits to the rural properties, potential factors associated with the risk of contamination of bovine milk and the environment were observed, such as the presence of multiple animal species, particularly cats and chickens, as well as dogs and pigs, and the presence of debris and waste disposal areas near the cow milking site.

The cattle farming system also has a direct influence on the occurrence of toxoplasmosis. Semi-intensive and extensive production systems are associated with higher seropositivity rates

when compared to intensive systems, since they favor greater contact of animals with the soil and with environmental sources potentially contaminated by *T. gondii* oocysts (Barros *et al.*, 2020).

This study highlighted the need to intensify the dissemination of information by health authorities, with the aim of guiding producers of artisanal milk and dairy products on the importance of boiling or pasteurizing milk as fundamental measures to reduce the risk of *T. gondii* transmission. Furthermore, it emphasizes the relevance of conducting further studies that evaluate the parasite load and viability of the parasite eliminated in milk, as well as investigations conducted under conditions of natural infection of the protozoan, especially on farms where raw bovine milk is habitually consumed.

The dissemination of information about the risks related to toxoplasmosis, through teaching materials, such as an educational folder prepared with clear, objective, and accessible language, can be considered an important strategy for the social return of research. The material aims to increase the population's knowledge about the disease, its forms of transmission and prevention measures, contributing to awareness and the promotion of care practices in the context of One Health.

Conclusions

The present study demonstrated the presence of *Toxoplasma gondii* DNA by Conventional PCR and Nested PCR in raw bovine milk samples collected from rural settlements in the northwestern region of São Paulo State, Brazil. The geographical distribution of the municipalities where *Toxoplasma gondii* was detected suggests circulation of the parasite in the study region, given their geographical proximity to one another.

Acknowledgements: This Project received financial support from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) – Grant number 2023/00076-9 and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). Additionally, we extend our profound gratitude to the

Land Institute of the State of São Paulo (ITESP) and to the farmers who kindly consented to the collection of milk from their animals.

Author Contributions: All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection, and analysis were performed by Bruna dos Santos Leite, Amanda Corvino Valim, Laís Pereira da Silva, Marcos Vinícius Rangel, Isabella Neves Aires, Fernando Christiano Gabriel Morelli, and Simone Baldini Lucheis. Writing and review: Bruna dos Santos Leite, Amanda Corvino Valim, Laís Pereira da Silva, Marcos Vinícius Rangel, Isabella Neves Aires, Fernando Christiano Gabriel Morelli, Michel dos Santos Pinto, Katia Denise Saraiva Bresciani, Gismelli Cristiane Angeluci, Noeme Sousa Rocha and Simone Baldini Lucheis. The first draft of the manuscript was written by Bruna dos Santos Leite and Simone Baldini Lucheis, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: *This work was supported by* the São Paulo Research Foundation (FAPESP) – Grant number 2023/00076-9 and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Data availability: The data used to generate the results presented in the article are available via email from the corresponding author.

DECLARATIONS

Ethics approval: This research project was approved by the Ethics Committee – CEUA of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science – FMVZ – UNESP under number 000.206/2024. Research involving animals, using milk samples as biological material.

Competing Interests: The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Consent to participate: This criterion does not apply to this study.

Consent to publish: This criterion does not apply to this study.

404 **References**

405 Barros LD, Garcia JL, Bresciani KDS, Cardim ST, Storte VS, Headley SA (2020) A review of
406 toxoplasmosis and neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*). Front Vet Sci 7:455.
407 https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00455.

408 Bezerra MJG, Kim PCP, Moraes EPBX, Sá SG, Albuquerque PPF, Silva JG, Alves BHLS, Mota
409 RA (2015) Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the
410 Northeast of Brazil. Transbound Emerg Dis 62:421-424.
411 https://doi.org/10.1111/tbed.12160.

412 Cisak E, Zając V, Sroka J, Sawczyn A, Kloc A, Dutkiewicz J, Wójcik-Fatla A (2017) Presence
413 of pathogenic rickettsiae and protozoan in samples of raw milk from cows, goats, and
414 sheep. Foodborne Pathog Dis 14:189-194. https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2203.

415 Costa GHN, da Costa AJ, Lopes WD, Bresciani KDS, dos Santos TR, Esper CR, Santana AE
416 (2011) *Toxoplasma gondii*: Natural congenital infection in cattle and experimental
417 inoculation of gestating cows with oocysts. Exp Parasitol 127:277-281.
418 https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.005.

419 Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Júnior JPA (2006) Detection of enterotoxin genes in
420 coagulase-negative staphylococci isolated from foods. Braz J Microbiol 37:70-74.
421 https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100013.

422 Dehkordi FS, Borujeni MR, Rahimi E, Abdizadeh R (2013) Detection of *Toxoplasma gondii* in
423 raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay,
424 capture ELISA, and PCR methods in Iran. Foodborne Pathog Dis 10:120-125.
425 https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1311.

426 Deljavan N, Moosavy M, Hajipour N (2022) Molecular detection of *Toxoplasma gondii* DNA in
427 goats, sheep, and donkey milk using PCR in East Azerbaijan Province, Iran. Res Vet Sci
428 152:58-60. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.07.020.

Dubey JP (1994) Toxoplasmosis. J Am Vet Med Assoc 205:1593-1598. https://doi.org/10.2460/javma.1994.205.11.1593.

Dubey JP (2022) Toxoplasmosis of animals and humans, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton.

Dubey JP, Jones JL (2008) *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int J Parasitol 38:1257-1278. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007.

Dubey JP, Murata FHA, Cerqueira-Cezar CK, Kwok OCH, Yang Y, Su C (2020) *Toxoplasma gondii* infections in dogs: 2009-2020. Vet Parasitol 287:109223. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109223.

Fatmawati M, Suwanti LT, Mufasirin (2022). Potential transmission of toxoplasmosis through consumption of raw goat's milk. Adv Anim Vet Sci 10:1687-1692. https://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2022/10.8.1687.1692.

Fonseca FM, Sato AP, Becker APBB, Pinto GOPA, Souza GS, Perotta JH, Filho IRB, Rodriguez MC, Dittrich RL (2023) Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in milk of dairy cows from Southern Brazil. Parasitol Int 95:102750. https://doi.org/10.1016/j.parint.2023.102750.

Gharekhani J, Yakhchali M, Afshari A, Adabi M (2021) Herd-level contamination of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, and *Brucella*. Food Microbiol 100:103873. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103873.

Hatam-Nahavandi K, Calero-Bernal R, Rahimi MT, Pagheh AS, Zarean M, Dezhkam A, Ahmadpour E (2021) *Toxoplasma gondii* infection in domestic and wild felids as public health concerns: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep 11:9509. https://doi.org/10.1038/s41598-021-89031-8.

Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H (2000) Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic

452 and quantitative PCR. Int J Parasitol 30:69-75. https://doi.org/10.1016/S0020-
453 7519(99)00170-8.

454 Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, García-Pérez AL (2001) Single tube nested PCR
455 for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. Vet
456 Parasitol 102:17-27. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00526-X.

457 Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018). MEGA X: Molecular evolutionary
458 genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35:1547-1549.
459 https://doi.org/10.1093/molbev/msy096.

460 Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time
461 quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. Methods 25:402-408.
462 https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

463 Manzini S, Bertozzo TV, Aires IN, Rodrigues NJL, Bertolini AB, Alexandrino M, Steinle JS, de
464 Melo RPB, Mota RA, de Medeiros MIM, Richini-Pereira VB, Curci VCLM, Lucheis SB
465 (2024) Comparison of molecular techniques for the detection of *Toxoplasma gondii* in
466 raw bovine milk from small rural properties in Brazil. Int J Food Microbiol 409:110466.
467 https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110466.

468 Melo RPB, Oliveira PRF, Albuquerque PPF, Barretto MLM, Moura GHF, Oliveira AAF, Mota
469 RA (2020) Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in heart tissue from common marmoset
470 (Callithrix jacchus) monitored for yellow fever and rabies in Pernambuco State,
471 northeastern Brazil. Vet Parasitol Reg Stud Reports.
472 https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100447.

473 Millar PR, Sobreiro LG, Bonna ICF, Amendoeira MRR (2008). A importância dos animais de
474 produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. Cienc Agrar 29:693-706.
475 https://doi.org/10.5433/1679-0359.2008v29n3p693.

476 Oliveira PRF, De Melo RPB, Sierra TAO, da Silva RA, da Silva de Oliveira JE, de Almeida BG,
477 Mota RA (2021). Investigation of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in
478 urban public environments in Brazil. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 79:101715.
479 https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101715.

480 Ossani RA, Borges HAT, Souza AP, Sartor AA, Miletti LC, Federle M, Moura AB (2017)
481 *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on West mesoregion of Santa
482 Catarina state, Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec 69:1294-1300.
483 http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9177.

484 Rocha DS, de Sousa Moura RL, Maciel BM, Guimarães LA, O'Dwyer HN, Munhoz AD,
485 Albuquerque GR (2015) Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected
486 sheep's milk. Genet Mol Res 14:8658-8662. https://doi.org/10.4238/2015.July.31.14.

487 Rojas-Pirela M, Medina L, Rojas MV, Liempi AI, Castillo C, Pérez-Pérez E, Guerrero-Muñoz J,
488 Araneda S and Kemmerling U (2021) Congenital Transmission of Apicomplexan
489 Parasites: A Review. Front. Microbiol. 12:751648.
490 https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.751648.

491 Rouatbi M, Amdouni Y, Amairia S, Rjeibi MR, Sammoudi A, Rekik M, Gharbi M (2017)
492 Molecular detection and phylogenetic analyses of *Toxoplasma gondii* from naturally
493 infected sheep in Northern and Central Tunisia. Vet Med Sci 3:22-31.
494 https://doi.org/10.1002/vms3.53.

495 Sah RP, Talukder MH, Rahman AKMA, Alam MZ, Ward MP (2018) Seroprevalence of
496 *Toxoplasma gondii* infection in ruminants in selected districts in Bangladesh. Vet
497 Parasitol Reg Stud Reports 11:1-5. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.10.008.

498 Santos EJF, Cunha M (2013) Interpretação crítica dos resultados estatísticos de uma meta-análise:
499 Estratégias metodológicas. Millennium 44:85-98.
500 https://revistas.rcaap.pt/millenium/article/view/8169.

501 Silva JG, Alves BHLS, Melo RPB, Kim PCP, Neto OLS, Bezerra MJG, Sá SG, Mota RA (2015).
502 Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep
503 and goats of local breeds reared in Northeastern Brazil. Acta Trop 142:145-148.
504 https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.011.

505 Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP (2010) Moving towards an integrated approach to
506 molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. Parasitology 137:1-11.
507 https://doi.org/10.1017/S0031182009991065.

CAPÍTULO 4

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1: Atestado do CEUA.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Avaliação molecular para Toxoplasma gondii em bovinos de leite em assentamentos rurais do estado de São Paulo e análise espacial, registrada com o nº 000.206, sob a responsabilidade de Bruna Dos Santos Leite e do(a) Prof(a). Dr(a) Simone Baldini Lucheis - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea, e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em reunião de 22/10/2024.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	22/10/2024 a 30/07/2026
Espécie/linhagem/raça	Bovino (Mestiços)
Número de animais	100
Sexo	Fêmea
Origem	Externos

Fábio Sossai Possebon
Presidente da CEUA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Botucatu

UNESP
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica

Emitido em: 25/10/2024 11:08

10.2. Anexo 2: Protocolo de extração das amostras de leite com o Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (Cytiva®).

1. Em um microtubo de 1,5 mL, adicionar 900 µL da amostra de leite.
2. Centrifugar a 14.000 g por 2 minutos.
3. Eliminar o sobrenadante por inversão, deixando o pellet. Retirar a gordura da parede do tubo com swab estéril (individual)
4. Adicionar ao pellet 40 µL de tampão de lisozima e misturar imediatamente em vórtex.
5. Adicionar 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e misturar em vórtex.
6. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, agitando-se ocasionalmente.
7. Adicionar 10 µL da proteinase K (20 mg/mL) e agitar em vórtex.
8. Incubar a 56 °C por 15 a 30 minutos, agitando-se ocasionalmente
9. Prossiga com a adição de 400 µL da Lysis Solution no microtubo. Homogeneize bem com vórtex por 15 segundos.
10. Incube o microtubo em temperatura ambiente por 10 minutos com homogeneização intermitente para lise adicional.
11. Centrifugue rapidamente a 5000 g (rcf) por 1 minuto (ou 7000 rpm em 1 minuto) para levar as amostras para baixo.
12. Monte uma minicoluna sobre o tubo de coleta fornecido. Use colunas individuais para amostras individuais. Estas colunas dão descartáveis.
13. Abra a tampa da coluna e transfira o lisado completo (450 µL) para a coluna usando a micropipeta.
14. Feche a tampa da coluna e transfira-a para uma microcentrífuga. Centrifugue a 11.000g por 1 minuto (ou a 10.400 rpm por 1 minuto).
15. Remova o tubo da coleta contendo o líquido cuidadosamente, sem tocar a base da coluna. Descarte esse líquido.
16. Adicione 500 µL da Lysis Solution na coluna e centrifugue a 11.000 g por 1 minuto. Este passo adicional garante a completa lise das células e desnatura qualquer proteína residual.
17. Descarte o líquido.
18. Adicione 500 µL de Wash Buffer à coluna e centrifugue a 11.000 g por 3 minutos.

19. Descarte o tubo de coleta com o líquido.

Importante: não deve sobrar nenhuma solução de lavagem (etanólica) na coluna. Se isso ocorrer, descarte o líquido da coluna e centrifugue por mais 1 minuto. O DNA preso à matriz de sílica está altamente puro e agora pronto para eluição.

20. Transfira a coluna de purificação para um microtubo novo.
21. Adicione 200 µL do Elution buffer (tampão de eluição) pré-aquecido a 70 °C diretamente na coluna.
22. Incube a coluna por 1 minuto em temperatura ambiente.
23. Centrifugue a 11.000 g por 1 minuto para recuperar o DNA.
24. O DNA eluído está pronto para as aplicações seguintes. Armazenar a -20 °C.

10.3. Anexo 3: Resultados da análise de pureza por espectrofotometria

Amostra	Concentração (ng/µL)	260/280	260/230
1	10,68	1,22	0,2
2	11,18	1,06	0,2
3	14,18	0,96	0,2
4	36,10	0,58	0,1
5	12,85	1,37	0,2
6	12,09	1,12	0,2
7	21,79	1,19	0,2
8	14,39	1,11	0,2
9	17,94	1,11	0,2
10	14,81	1,30	0,2
11	30,10	1,42	0,4
12	17,96	0,97	0,2
13	8,56	1,34	0,2
14	14,56	1,10	0,2
15	24,08	1,08	0,2
16	13,84	0,98	0,2
17	11,86	1,05	0,2
18	3,18	0,78	0,1
19	3,81	0,93	0,1
20	18,79	0,74	0,1
21	9,10	0,97	0,1
22	21,01	1,16	0,2
23	48,52	1,57	0,6
24	13,03	1,05	0,2
25	9,69	0,84	0,1
26	5,68	1,25	0,1
27	6,17	0,73	0,1
28	7,40	0,87	0,1
29	9,76	0,99	0,1
30	8,58	1,04	0,1
31	22,52	0,79	0,1
32	18,02	1,16	0,2
33	14,08	0,96	0,1
34	18,30	1,17	0,2
35	12,47	1,27	0,2
36	17,85	1,19	0,3
37	14,67	1,46	0,2

38	14,79	0,97	0,2
39	7,79	1,08	0,2
40	7,17	1,41	0,2
41	7,72	1,07	0,2
42	5,81	0,80	0,1
43	4,63	0,73	0,1
44	6,33	0,69	0,1
45	4,29	0,97	0,1
46	6,62	0,72	0,1
47	6,50	0,67	0,1
48	13,94	0,65	0,1
49	13,52	1,23	0,2
50	52,83	0,98	0,2
51	8,25	1,19	0,2
52	24,07	0,82	0,1
53	14,99	1,32	0,2
54	14,16	1,35	0,2
55	18,70	1,52	0,3
56	16,16	0,96	0,2
57	15,85	1,47	0,3
58	16,56	1,39	0,3
59	20,02	1,26	0,2
60	12,16	1,46	0,2
61	10,59	1,37	0,2
62	11,16	1,43	0,2
63	11,68	1,41	0,2
64	16,09	1,42	0,3
65	8,36	1,05	0,1
66	27,92	1,49	0,4
67	23,55	0,61	0,1
68	14,56	1,11	0,2
69	14,58	1,22	0,2
70	10,47	1,16	0,2
71	13,87	1,20	0,2
72	9,88	1,28	0,2
73	16,01	1,29	0,2
74	9,64	1,32	0,2
75	22,98	1,36	0,3
76	18,40	1,34	0,3
77	15,36	1,41	0,3

78	19,53	1,14	0,2
79	20,89	0,73	0,1
80	14,23	1,67	0,3
81	9,67	1,39	0,2
82	36,52	1,61	0,5
83	12,06	0,94	0,1
84	11,37	1,35	0,2
85	9,87	1,20	0,2
86	21,18	1,11	0,2
87	11,90	0,90	0,1
88	12,61	1,10	0,2
89	15,33	0,89	0,2
90	13,54	1,23	0,2
91	13,53	0,90	0,1
92	9,62	1,23	0,2
93	29,00	1,25	0,3
94	12,43	1,06	0,2
95	15,34	1,32	0,2
96	9,82	1,37	0,2
97	14,61	2,44	0,4
98	13,77	1,99	0,3
99	19,69	1,73	0,3
100	16,05	1,96	0,3
101	14,98	1,76	0,2
102	17,04	1,70	0,3
103	26,15	1,78	0,4
104	19,60	1,84	0,3
105	9,20	1,50	0,2
106	10,68	2,85	0,3
107	18,28	1,58	0,3
108	11,91	2,22	0,3
109	10,00	1,66	0,2
110	9,83	1,60	0,2
111	10,44	1,77	0,2
112	11,62	1,68	0,2
113	8,40	1,69	0,2
114	50,84	2,08	1,2
115	18,29	1,93	0,4
116	20,59	2,05	0,4
117	8,52	1,69	0,2

118	7,32	2,57	0,3
119	5,19	17,79	0,3
120	12,53	1,78	0,4
121	13,95	1,96	0,4
122	12,53	1,48	0,3
123	11,63	1,60	0,3
124	9,43	1,35	0,2
125	22,81	1,15	0,2
126	3,97	1,19	0,1
127	20,65	1,55	0,4
128	7,91	1,66	0,2
129	13,82	1,74	0,4
130	8,18	1,72	0,3
131	8,38	1,75	0,3
132	15,84	1,97	0,5
133	3,81	1,36	0,1
134	5,83	1,34	0,2
135	12,90	1,18	0,2
136	4,74	1,16	0,2
137	5,43	1,34	0,2
138	11,31	1,60	0,4
139	16,01	1,32	0,3
140	3,96	1,23	0,1
141	4,22	0,95	0,1
142	13,63	0,81	0,1
143	6,82	0,61	0,1
144	5,90	0,88	0,1
145	2,84	1,45	0,1
146	3,37	1,36	0,1
147	30,92	1,41	0,4
148	3,53	1,37	0,1
149	9,69	1,66	0,4
150	9,49	1,47	0,3
151	5,37	1,44	0,2
152	3,17	2,41	0,1
153	6,24	2,34	0,2
154	7,32	1,31	0,2
155	2,62	0,95	0,1
156	53,97	0,88	0,2
157	4,25	1,45	0,2

158	9,70	1,32	0,2
159	20,13	1,33	0,3
160	8,20	1,62	0,3

10.4. Anexo 4: Resultados individuais das amostras de leite bovino (n = 160), distribuídas por município e assentamento da região Noroeste do Estado de São Paulo, quanto à detecção de *Toxoplasma gondii* por PCR convencional (*primers* TOX4/TOX5) e Nested PCR (*primers* NN1/NN2 e TgNP1/TgNP2), além da amplificação do gene 18S rRNA (*primers* Tg18s48F/Tg18s359R e Tg18s58F/Tg18s348R).

Animal	Município	Assentamento	*Primers* TOX 4/ TOX 5	*Primers* NN1/NN2 E TgNP1/TgNP2	*Primers* Tg18s48F/ Tg18s359R E Tg18s58F/ Tg18s348R
1	Andradina	Primavera	-	-	+
2	Andradina	Primavera	-	-	+
3	Andradina	Primavera	-	-	+
4	Andradina	Primavera	-	+	+
5	Andradina	Primavera	-	-	+
6	Andradina	Primavera	-	-	+
7	Andradina	Primavera	-	+	+
8	Andradina	Primavera	-	-	+
9	Andradina	Fazenda São Sebastião	-	-	+
10	Andradina	Fazenda São Sebastião	-	-	+
11	Andradina	Fazenda São Sebastião	-	+	+
12	Andradina	Fazenda São Sebastião	-	-	+
13	Andradina	Fazenda São Sebastião	-	+	+
14	Andradina	Fazenda São Sebastião	-	-	+
15	Andradina	Fazenda São Sebastião	-	-	+
16	Andradina	Fazenda São Sebastião	-	+	+
17	Andradina	Timboré	-	-	+
18	Andradina	Timboré	-	-	+
19	Andradina	Timboré	-	+	+
20	Andradina	Timboré	-	+	+
21	Andradina	Timboré	-	-	+
22	Andradina	Timboré	-	-	+
23	Andradina	Timboré	-	-	+

24	Andradina	Timboré	-	-	+
25	Andradina	Josué De Castro	-	-	+
26	Andradina	Josué De Castro	-	+	+
27	Andradina	Josué De Castro	+	-	+
28	Andradina	Josué De Castro	+	+	+
29	Andradina	Josué De Castro	-	-	+
30	Andradina	Josué De Castro	+	-	+
31	Andradina	Josué De Castro	-	+	+
32	Andradina	Josué De Castro	-	+	+
33	Castilho	Rio Paraná	-	-	+
34	Castilho	Rio Paraná	-	-	+
35	Castilho	Rio Paraná	-	-	+
36	Castilho	Rio Paraná	-	-	+
37	Castilho	Rio Paraná	-	-	+
38	Castilho	Rio Paraná	+	-	+
39	Castilho	Rio Paraná	-	+	+
40	Castilho	Rio Paraná	-	-	+
41	Castilho	Pendengo	-	-	+
42	Castilho	Pendengo	-	+	+
43	Castilho	Pendengo	-	+	+
44	Castilho	Pendengo	-	+	+
45	Castilho	Pendengo	-	-	+
46	Castilho	Pendengo	-	-	+
47	Castilho	Pendengo	-	-	+
48	Castilho	Pendengo	-	-	+
49	Castilho	Nossa Senhora Aparecida II	-	-	+
50	Castilho	Nossa Senhora Aparecida II	-	-	+
51	Castilho	Nossa Senhora Aparecida II	-	-	+

52	Castilho	Nossa Senhora Aparecida II	-	-	+
53	Castilho	Nossa Senhora Aparecida II	-	-	+
54	Castilho	Nossa Senhora Aparecida II	-	-	+
55	Castilho	Nossa Senhora Aparecida II	-	-	+
56	Castilho	Nossa Senhora Aparecida II	-	-	+
57	Castilho	Terra Livre	-	-	+
58	Castilho	Terra Livre	-	+	+
59	Castilho	Terra Livre	-	-	+
60	Castilho	Terra Livre	-	-	+
61	Castilho	Terra Livre	-	+	+
62	Castilho	Terra Livre	-	+	+
63	Castilho	Terra Livre	-	-	+
64	Castilho	Terra Livre	-	-	+
65	Guaraçaí	Nova Vila	-	-	+
66	Guaraçaí	Nova Vila	-	-	+
67	Guaraçaí	Nova Vila	-	-	+
68	Guaraçaí	Nova Vila	-	+	+
69	Guaraçaí	Nova Vila	-	+	+
70	Guaraçaí	Nova Vila	-	-	+
71	Guaraçaí	Nova Vila	-	-	+
72	Guaraçaí	Nova Vila	-	-	+
73	Guaraçaí	Moinho	-	-	+
74	Guaraçaí	Moinho	-	+	+
75	Guaraçaí	Moinho	-	-	+
76	Guaraçaí	Moinho	-	-	+
77	Guaraçaí	Moinho	-	-	+
78	Guaraçaí	Moinho	-	-	+
79	Guaraçaí	Moinho	-	-	+
80	Guaraçaí	Moinho	-	+	+
81	Guaraçaí	São José 2	-	-	+
82	Guaraçaí	São José 2	-	-	+

83	Guaraçaí	São José 2	-	-	+
84	Guaraçaí	São José 2	-	-	+
85	Guaraçaí	São José 2	-	-	+
86	Guaraçaí	São José 2	-	-	+
87	Guaraçaí	São José 2	-	+	+
88	Guaraçaí	São José 2	-	-	+
89	Guaraçaí	Aroeira	-	+	+
90	Guaraçaí	Aroeira	-	-	+
91	Guaraçaí	Aroeira	-	-	+
92	Guaraçaí	Aroeira	-	-	+
93	Guaraçaí	Aroeira	-	-	+
94	Guaraçaí	Aroeira	-	-	+
95	Guaraçaí	Aroeira	-	-	+
96	Guaraçaí	Aroeira	-	-	+
97	Ilha Solteira	Estrela Da Ilha	-	+	+
98	Ilha Solteira	Estrela Da Ilha	-	-	+
99	Ilha Solteira	Estrela Da Ilha	-	-	+
100	Ilha Solteira	Estrela Da Ilha	-	+	+
101	Ilha Solteira	Estrela Da Ilha	-	-	+
102	Ilha Solteira	Estrela Da Ilha	-	+	+
103	Ilha Solteira	Estrela Da Ilha	-	+	+
104	Ilha Solteira	Estrela Da Ilha	+	-	+
105	Itapura	Roseli Nunes	-	-	+
106	Itapura	Roseli Nunes	+	-	+
107	Itapura	Roseli Nunes	+	-	+
108	Itapura	Roseli Nunes	+	-	+
109	Itapura	Roseli Nunes	+	-	+
110	Itapura	Roseli Nunes	+	+	+
111	Itapura	Roseli Nunes	+	-	+
112	Itapura	Roseli Nunes	+	+	+
113	Itapura	Zumbi Dos Palmares	-	-	+
114	Itapura	Zumbi Dos Palmares	-	-	+

115	Itapura	Zumbi Dos Palmares	+	+	+
116	Itapura	Zumbi Dos Palmares	-	-	+
117	Itapura	Zumbi Dos Palmares	-	-	+
118	Itapura	Zumbi Dos Palmares	+	+	+
119	Itapura	Zumbi Dos Palmares	-	+	+
120	Itapura	Zumbi Dos Palmares	-	-	+
121	Murutinga Do Sul	Orlando Molina	-	-	+
122	Murutinga Do Sul	Orlando Molina	+	-	+
123	Murutinga Do Sul	Orlando Molina	+	+	+
124	Murutinga Do Sul	Orlando Molina	+	+	+
125	Murutinga Do Sul	Orlando Molina	+	-	+
126	Murutinga Do Sul	Orlando Molina	+	-	+
127	Murutinga Do Sul	Orlando Molina	-	-	+
128	Murutinga Do Sul	Orlando Molina	+	+	+
129	Murutinga Do Sul	Santa Cristina	-	-	+
130	Murutinga Do Sul	Santa Cristina	-	+	+
131	Murutinga Do Sul	Santa Cristina	-	-	+
132	Murutinga Do Sul	Santa Cristina	-	+	+
133	Murutinga Do Sul	Santa Cristina	-	-	+
134	Murutinga Do Sul	Santa Cristina	-	-	+
135	Murutinga Do Sul	Santa Cristina	-	-	+
136	Murutinga Do Sul	Santa Cristina	-	-	+
137	Murutinga Do Sul	Dois Irmãos	-	+	+
138	Murutinga Do Sul	Dois Irmãos	-	-	+

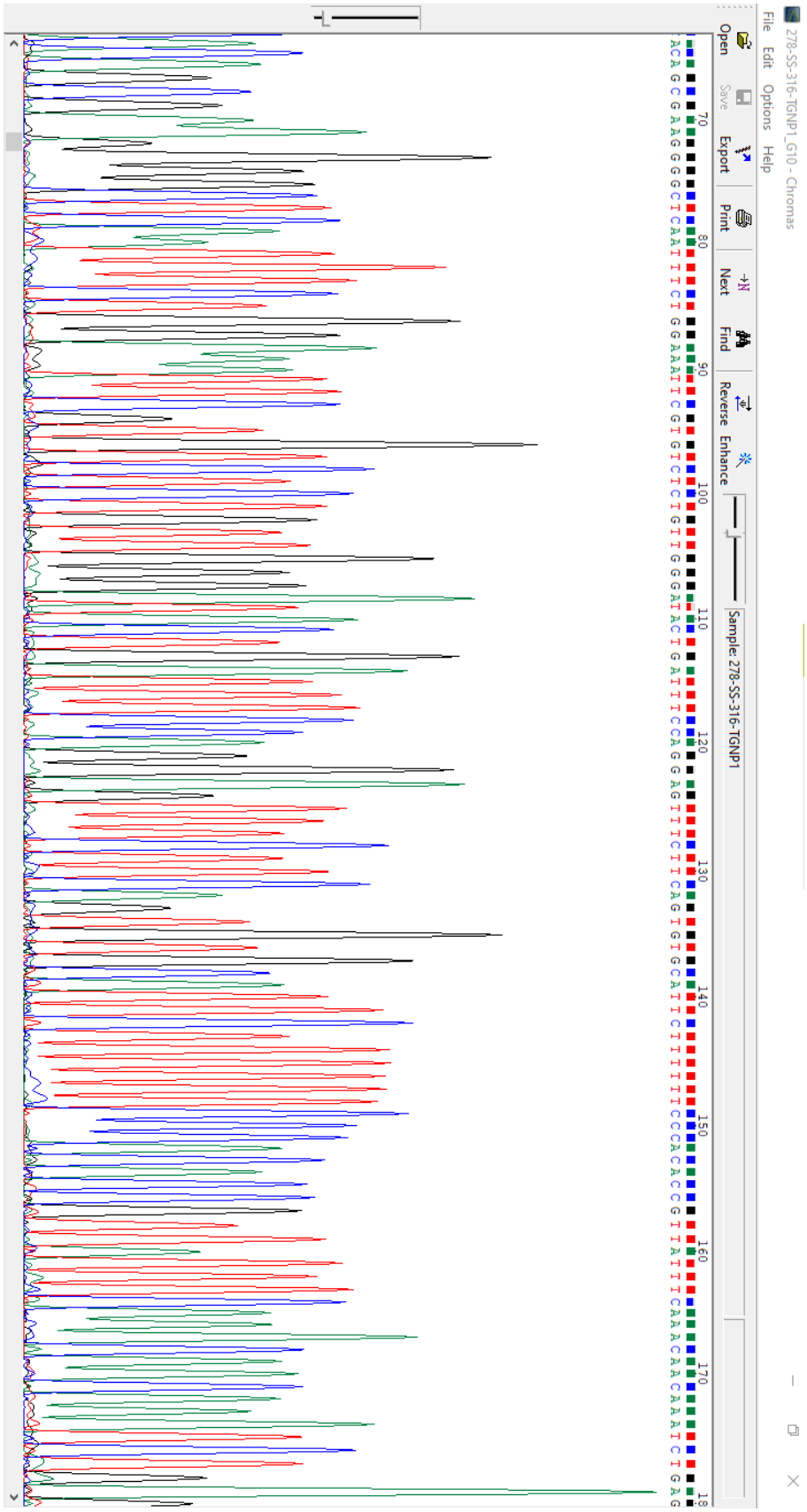
139	Murutinga Do Sul	Dois Irmãos	-	+	+
140	Murutinga Do Sul	Dois Irmãos	-	-	+
141	Murutinga Do Sul	Dois Irmãos	-	-	+
142	Murutinga Do Sul	Dois Irmãos	-	+	+
143	Murutinga Do Sul	Dois Irmãos	-	+	+
144	Murutinga Do Sul	Dois Irmãos	-	-	+
145	Pereira Barreto	Esmeralda	-	-	+
146	Pereira Barreto	Esmeralda	-	-	+
147	Pereira Barreto	Esmeralda	-	-	+
148	Pereira Barreto	Esmeralda	-	-	+
149	Pereira Barreto	Esmeralda	-	-	+
150	Pereira Barreto	Esmeralda	-	-	+
151	Pereira Barreto	Esmeralda	-	-	+
152	Pereira Barreto	Esmeralda	-	-	+
153	Pereira Barreto	Terra É Vida	-	-	+
154	Pereira Barreto	Terra É Vida	-	-	+
155	Pereira Barreto	Terra É Vida	-	-	+
156	Pereira Barreto	Terra É Vida	-	-	+
157	Pereira Barreto	Terra É Vida	-	-	+
158	Pereira Barreto	Terra É Vida	+	-	+
159	Pereira Barreto	Terra É Vida	-	-	+
160	Pereira Barreto	Terra É Vida	-	-	+

Legenda: (+): Positivo; (-): Negativo

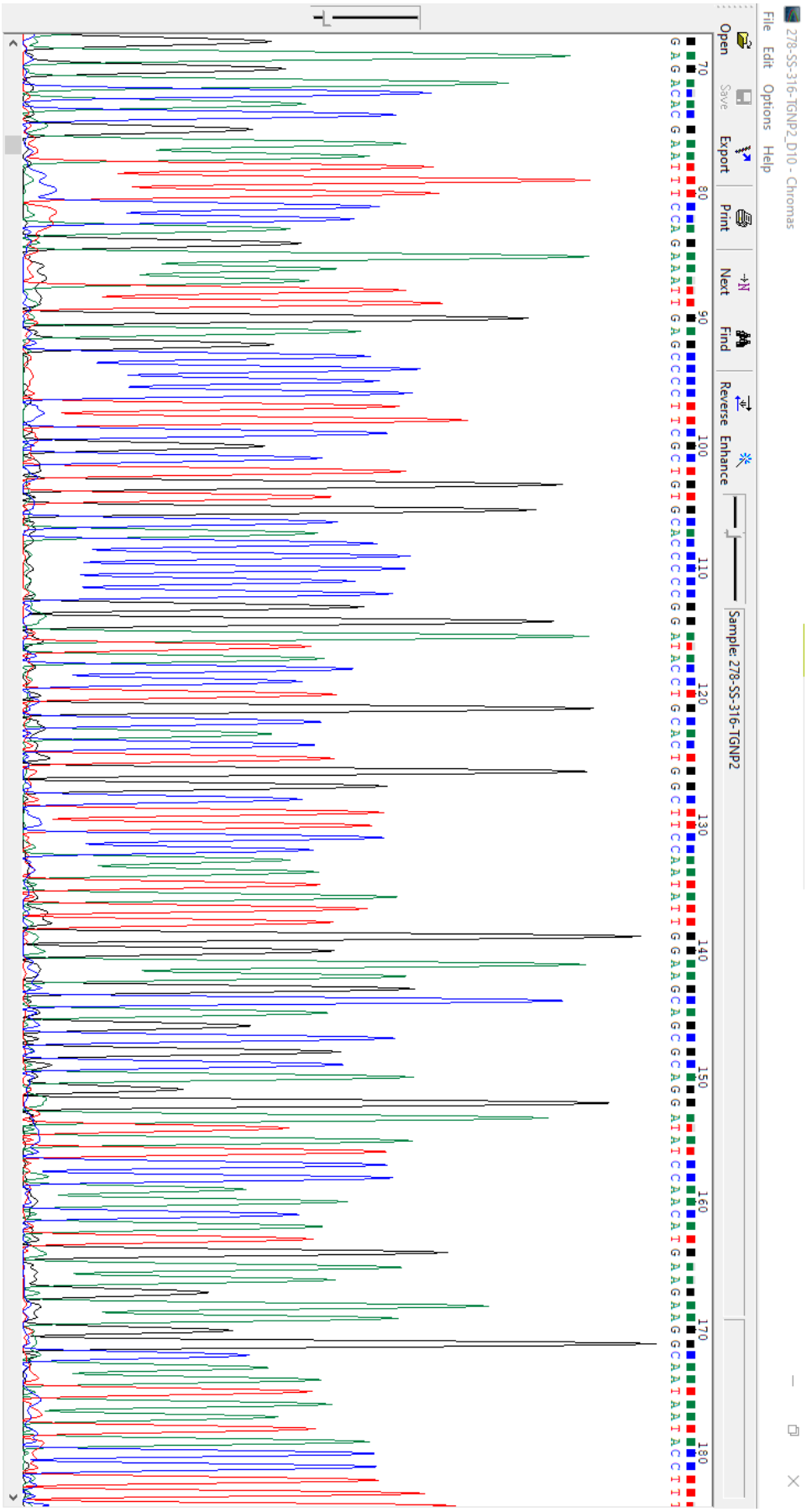
10.5. Anexo 5: Eletroferogramas das amostras sequenciadas

10.5.1. Amostra 102 (*primers* TgNP1 e TgNP2)

TgNP1

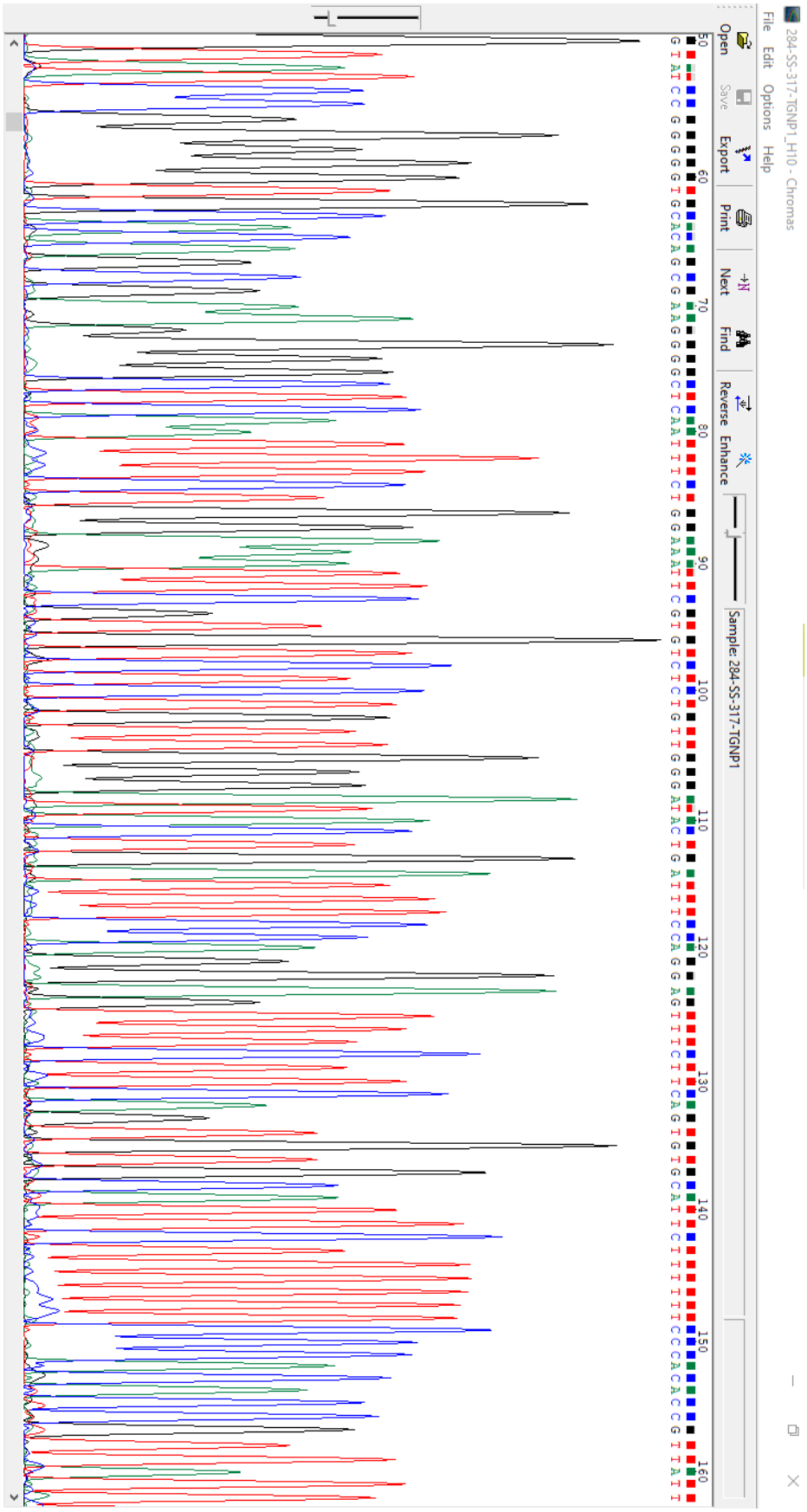


TgNP2

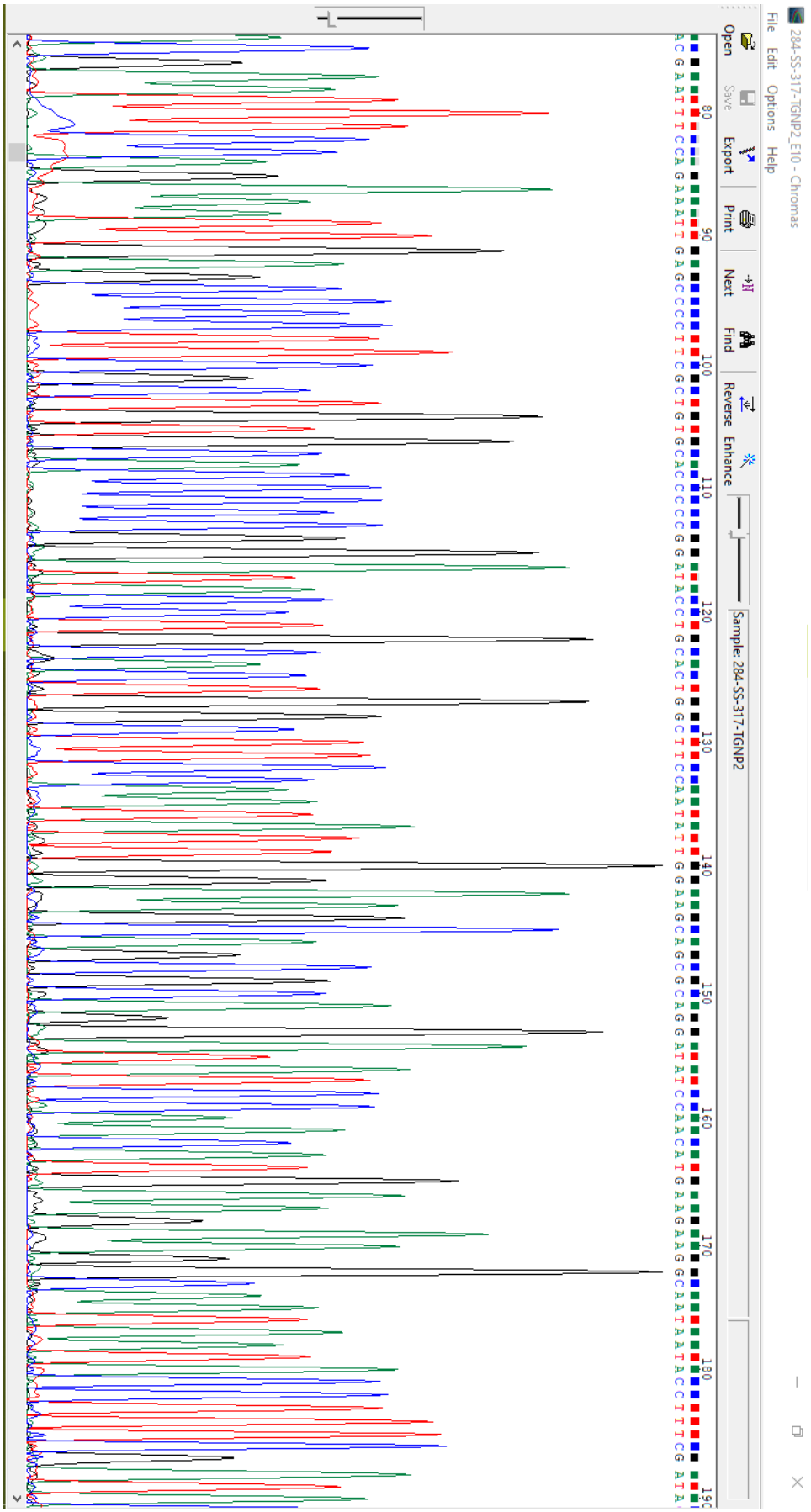

278-SS-316-TGNP2_D10 - Chromas
File Edit Options Help
Open
Save
Export
Print
Next
Find
Reverse
Enhance
Sample: 278-SS-316-TGNP2

10.5.2. Amostra 107 (*primers* TgNP1 e TgNP2)

TgNP1

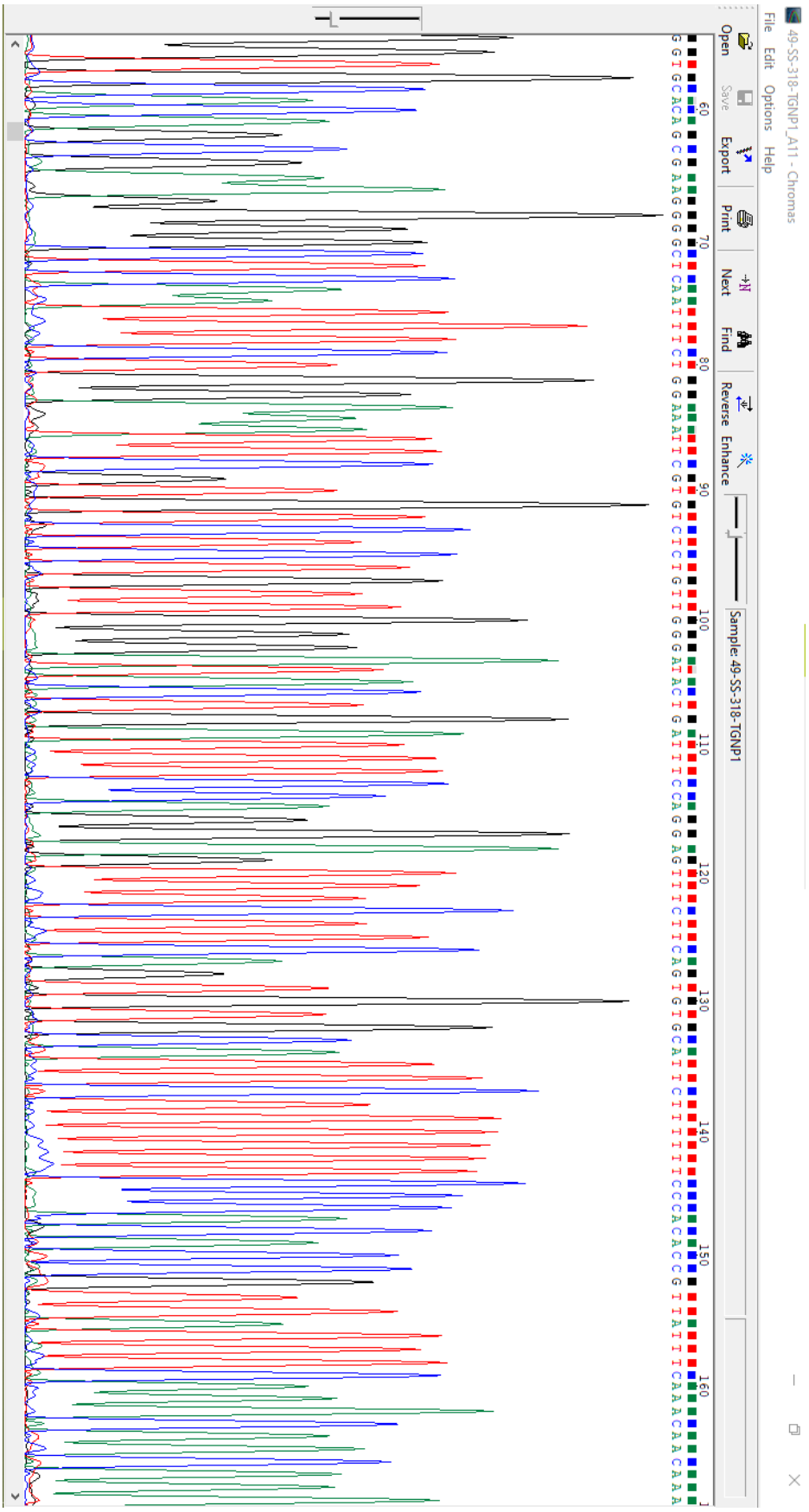


TgNP2

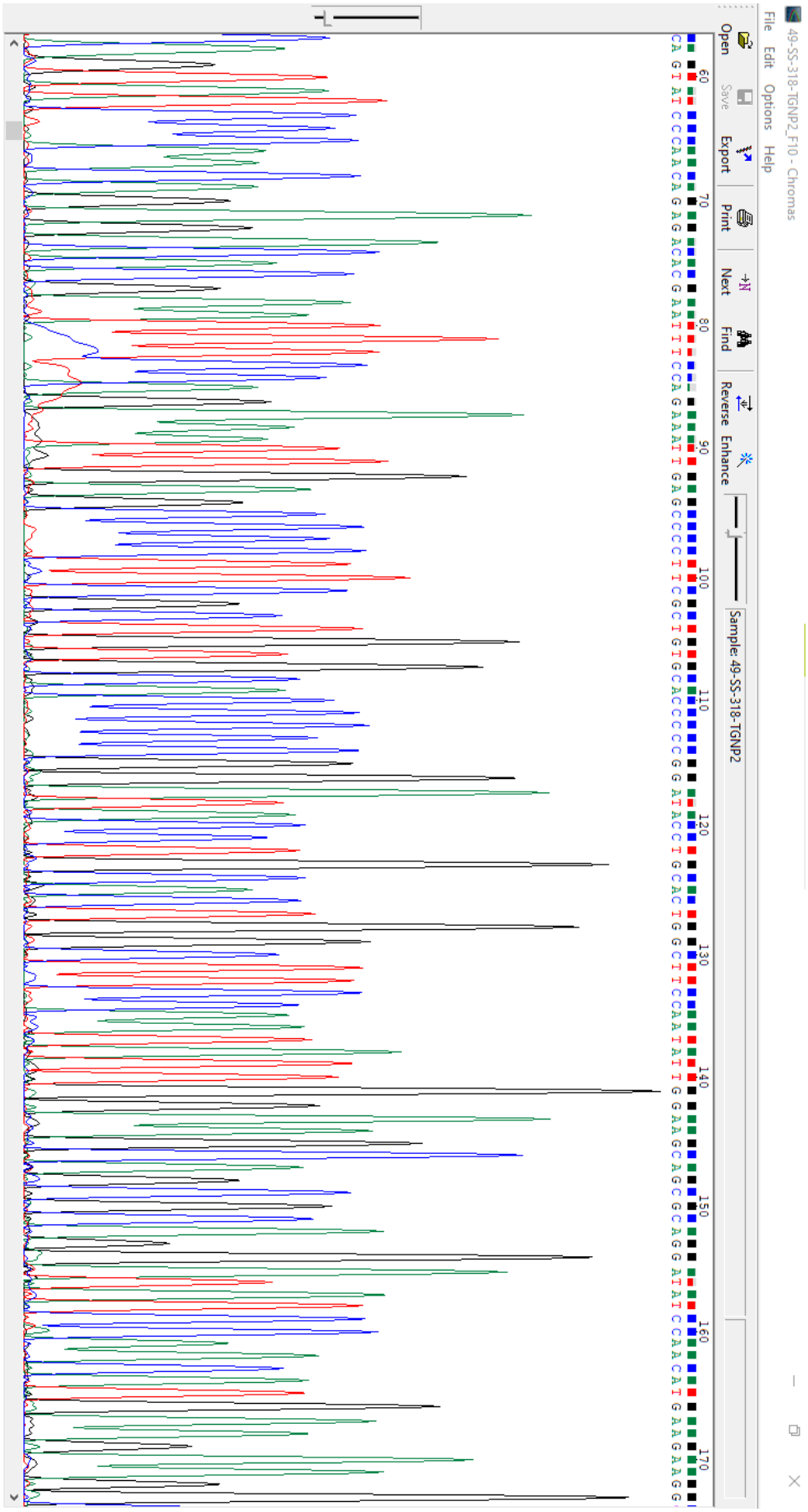

284-SS-317-TGNP2_E10 - Chromas
File Edit Options Help
Open
Save
Export
Print
Next
Find
Reverse
Enhance
Sample: 284-SS-317-TGNP2

10.5.3. Amostra 116 (*primers* TgNP1 e TgNP2)

TgNP1



TgNP2


49-SS-318-TGNP2_F10 - Chromas
File Edit Options Help
Open
Save
Export
Print
Next
Find
Reverse
Enhance
Sample: 49-SS-318-TGNP2

10.6. Anexo 6: Folder educativo



