

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *TOXOPLASMA GONDII* EM QUIBES CRUS
E EM CARNES SUÍNA E BOVINA COMERCIALIZADAS EM BOTUCATU-SP.**

Diego Generoso

Botucatu – SP

Maio

2013

Diego Generoso

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *TOXOPLASMA GONDII* EM QUIBES CRUS
E EM CARNES SUÍNA E BOVINA COMERCIALIZADAS EM BOTUCATU-SP.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Helio Langoni.

Coorientador:

Dr. Rodrigo Costa da Silva.

Botucatu – SP

Maio

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Generoso, Diego.

Avaliação da presença de *Toxoplasma gondii* em quibes crus e em carnes suína e bovina comercializadas em Botucatu-SP / Diego Generoso. – Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2013

Orientador: Helio Langoni

Coorientador: Rodrigo Costa da Silva

Capes: 50502042

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Carne bovina – Contaminação. 4. Suíno – Infecções. 5. Bovino – Infecções. 6. Alimentos – Adulteração e inspeção. 7. Segurança alimentar. 8. Produção animal. 9. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Isolamento; Produtos cárneos; Saúde pública; Segurança alimentar; Técnicas moleculares; *Toxoplasma gondii*.

Nome do Autor: Diego Generoso

Título: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *TOXOPLASMA GONDII* EM QUIBES CRUS E EM CARNES SUÍNA E BOVINA COMERCIALIZADAS EM BOTUCATU-SP.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a. Dr^a. Simone Baldini Lucheis

Membro Titular

Departamento de Descentralização do Desenvolvimento

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA

Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva

Membro Titular

Departamento de Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS/BA

Prof. Dr. Germano Francisco Biondi

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Nádia dos Reis Carvalho

Membro Suplente

Unidade de Pesquisa Clínica - UPECLIN

FMB – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 29 de maio de 2013.

Dedicatória

À minha família por incentivar e ser responsável pela formação do meu caráter e incentivadora do meu desenvolvimento como homem e pesquisador.

Minha namorada amada, tão companheira e dedicada durante todas as árduas etapas para conclusão desse trabalho.

Agradecimentos

Realizar uma pesquisa sempre se tem a ajuda de muitas pessoas, ajuda que é muito importante. Agradecer uma ajuda recebida para mim é uma missão. Todos os envolvidos, direta ou indiretamente, na execução deste projeto de pesquisa merecem respeito, pois mostraram não só a sua amizade, mas também o espírito de colaboração para se criar ciência.

Desde muito cedo, quando iniciamos a vida já temos ao nosso lado pessoas nos ajudando em todos os sentidos. Há muita esperança para este novo cidadão. Este círculo é fundamental para a nossa formação.

Durante nossa caminhada encontramos os amigos de verdade, estes entram em nossa vida para nos guiar, ajudar e se tornam um exemplo para nós.

Agradeço os amigos que encontrei em Botucatu. Principalmente ao meu coorientador Rodrigo Costa da Silva e à pesquisadora Virginia Bodelão Richini Pereira como exemplos de pesquisadores e estímulo nos momentos de dificuldade.

Outra pessoa que foi fundamental à realização desta pesquisa foi o bolsista do CNPq Ênio Yoshinori Hayasaka, que esteve presente em todos os momentos me auxiliando na realização de todas as etapas.

Ao meu orientador, Professor Dr. Helio Langoni, que durante meus quatro anos sob sua orientação, pode me ensinar muito. Devo muito a ele, por me transformar de um simples “menino” a um profissional.

Este projeto de pesquisa de dissertação de mestrado foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por meio do processo nº559471-6. Sem essa importante ajuda, não conseguiria concluir nenhuma das etapas programadas.

Outra fonte de fomento foi a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior, com bolsa para que alunos tenham condições de se aperfeiçoarem.

Sempre admirei servidores públicos comprometidos com seu serviço, destaco o servidor Benedito Donizete Menozzi, que com zelo e esforço colaborou nas atividades de experimentação desenvolvidas.

Estes agradecimentos são merecidos porque todos estão empenhados e comprometidos com a instituição. Sem essas pessoas não seria possível apresentar esse trabalho.

Muito obrigado a todos e um forte abraço!

Lista de Abreviações

<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
rRNA	Acido Ribonucleico Ribossomal
RFLP	Polimorfismos de Fragmentos de Restrição
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PM	Peso molecular
Bp	Pares de Base
<i>S. cruzi</i>	<i>Sarcocystis cruzi</i>
<i>S. hirsuta</i>	<i>Sarcocystis hirsuta</i>
<i>S. hominis</i>	<i>Sarcocystis hominis</i>
qPCR	Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real
p/v	peso/volume
MAT-AF	Prova de aglutinação direta modificada com antígeno inativado pela formalina.
SST	Solução Salina Tamponada
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
KCl	Cloreto de Potássio
BSA	Albumina Sérica Bovina

Lista de tabelas

Tabela 1. Amostras cárneas coletadas por estabelecimento comercial na cidade de Botucatu, SP, 2013.....	27
Tabela 2. Resultado da técnica de PCR a partir de cortes de carnes bovina, suína e quibe, comercializados na cidade de Botucatu-SP para <i>Toxoplasma gondii</i> . Botucatu-SP, 2013.....	35
Tabela 3. Frequência dos resultados da técnica de PCR a partir de cortes de carnes bovina, suína e quibe e sua origem, comercializados na cidade de Botucatu-SP para <i>Toxoplasma gondii</i> . Botucatu-SP, 2013.....	36
Tabela 4. Frequência dos resultados da técnica de PCR a partir de cortes de carnes bovina, suína e quibe e sua data de coleta, comercializados na cidade de Botucatu-SP para <i>Toxoplasma gondii</i> . Botucatu-SP, 2013.....	37
Tabela 5. Descrição de amostras positivas com sequenciamento, genotipagem, PCR, qPCR e origem do material pesquisado. Botucatu-SP 2013.....	38
Tabela 6. Perfil genotípico para <i>Toxoplasma gondii</i> das amostras isoladas de produtos cárneos comercializados na cidade de Botucatu-SP. Botucatu-SP, 2013.....	39
Tabela 7. Resultados da RFLP-PCR e do sequenciamento dos amplicons das nove amostras de produtos cárneos submetidos à nested-PCR para o gene 18S rRNA para <i>Toxoplasma gondii</i> . Botucatu-SP, 2013.....	40

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Delineamento experimental.....	26
4.2. Obtenção das amostras	26
4.3. Isolamento em camundongos	26
4.4. Exame sorológico	27
4.4.1. Produção de antígeno	27
4.4.2. Preparação de antígeno inativado pela formalina.....	27
4.4.3. Prova de aglutinação direta modificada	28
4.5. Exames de PCR para <i>T. gondii</i>	28
4.5.1. Extração de DNA.....	28
4.5.2. PCR.....	29
4.5.3. q PCR: determinação da carga parasitária	30
4.5.4. Genotipagem	30
4.5.5. Sequenciamento	31
4.5.5. Análise estatística	32
5. RESULTADOS	34
5.1. Isolamento em camundongos - Bioprova	34
5.2. Prova de aglutinação direta modificada	34
5.3. Exames de biologia molecular	34
5.3.1. PCR	34
5.3.2. qPCR: determinação da carga parasitária.....	35
5.3.3. Genotipagem.....	35
5.3.4. Sequenciamento	38
6. Discussão	41
7. Conclusões.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
TRABALHO CIENTÍFICO	57
Anexo 1 – Tabelas.....	Erro! Indicador não definido.

GENEROSO, D. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *TOXOPLASMA GONDII* EM QUIBES CRUS E EM CARNES SUÍNA E BOVINA COMERCIALIZADAS EM BOTUCATU-SP. Defesa de Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório, amplamente distribuído pelo mundo, sendo responsável por perdas na produção animal e sério problema de saúde pública. Os produtos cárneos podem albergar formas infectantes de diversos agentes zoonóticos, sendo um deles os bradizoítos de *T. gondii*. Deste modo, o presente estudo objetivou determinar a presença de *T. gondii* em produtos cárneos comercializados na região de Botucatu, SP, Brasil. Foram analisados 141 cortes comerciais de carne suína, sendo 49 de pernil (34,75%); 48 de músculo traseiro bovino (34,04%) e de quibe cru (44; 31,21%), com as técnicas de bioensaio em camundongos, e pesquisa do DNA do parasito pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) do gene repetitivo 200-300x no genoma, amplificando 529pb. Todas as amostras foram negativas ao bioensaio. Das amostras positivas à PCR, foram pesquisadas a carga parasitária pela PCR quantitativa (qPCR) do mesmo gene, utilizando-se sistema SYBR Green, e genotipagem pela multiplex-, nested- e RFLP- PCR utilizando 11 marcadores: SAG1, 5'-3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, B-TUB, GRA6, L358, c22-8, c29-6, PK1, Apico. Das amostras estudadas, nove (6,38%) foram positivas à PCR, sendo cinco (55,56%) bovinas, três (33,33%) suínas e uma (11,11%) de quibe, apresentando carga parasitária com medianas variando de zero até 390 parasitos.mL⁻¹. A genotipagem foi possível em somente uma amostra que apresentou genótipo semelhante a outros já identificados na literatura (MAS, TgCkBr89 e TgCkBr147). Adicionalmente, nested- e RFLP-PCR do gene 18S ribossomal RNA (18S rRNA), sequenciamento dos produtos da nested-PCR e alinhamento com a base de dados do GenBank no NCBI foram realizados para todas as nove amostras positivas para verificar a possibilidade de co-infecção com outros protozoários Apicomplexa, resultando em 100% de homologia com *T. gondii* em quatro amostras, sendo três suínas e um quibe (44,44%; GenBank número de acesso L37415.1), *Sarcocystis hominis* em duas amostras de bovinos (22,22%, GenBank número de acesso AF006471.1), *S. cruzi* em duas amostras de bovinos

(22,22%; GenBank número de acesso AF176934.1) e *S. hirsuta* em uma amostra de bovino (11,11%, GenBank número de acesso AF006469.1). Conclui-se que *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. estão circulantes em produtos cárneos no município de Botucatu - SP, com especial atenção a *S. hominis* e *T. gondii*, visto seu caráter zoonótico.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, produtos cárneos, segurança alimentar, saúde pública, técnicas moleculares, genotipagem.

GENEROSO, D. Evaluation of the presence of *Toxoplasma gondii* in raw kibbe and in pork and beef marketed in Botucatu. Dissertation (Mestrado) - Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite, widely distributed throughout the world, accounting for losses in animal production and serious public health problem. The meat products may harbor infectious forms of various zoonotic agents, one of them being the bradyzoites of *T. gondii*. Thus, the present study aimed to determine the prevalence of *T. gondii* in meat products marketed in Botucatu, SP, Brazil. We analyzed 141 commercial cuts of pork (ham, 49; 34.75%) and beef (muscle, 48, 34.04%), and raw kibbe (44, 31.21%) by bioassay in mice, and survey of parasite DNA by polymerase chain reaction (PCR) gene repetitive 200-300x in the genome, amplifying 529bp. All samples were negative by bioassay. Of the PCR-positive samples were studied parasite load by quantitative PCR (qPCR) of the same gene, using the SYBR Green system and the multiplex genotyping, nested PCR and RFLP markers using 11: SAG1, 5'-3' SAG2, alt.SAG2, SAG3, B-TUB, GRA6, L358, c22-8, c29-6 PK1, Apico. Of the samples studied, nine (6.38%) were positive for PCR, five (55.56%) for cattle, three for pork (33.33%) and one for raw kibbe (11.11%), with median parasite load ranging from 16 to 390 parasitos.mL⁻¹. Genotyping was possible in only one sample that showed genotype similar to those already identified in the literature (MAS, TgCkBr89 and TgCkBr147). In addition, nested PCR and RFLP gene 18S ribosomal RNA (18S rRNA) sequencing of the nested-PCR products and alignment to the GenBank database at NCBI were performed for all nine positive samples to verify the possibility of co-protozoa infection with other Apicomplexa, resulting in 100% homology with *T. gondii* in four samples, three from pork meat sows and one from kibbe (44.44%; GenBank accession number L37415.1), *Sarcocystis hominis* was found in two samples of cattle (22.22%, GenBank accession number AF006471.1), *Sarcocystis cruzi* in two samples of beef (22.22%; GenBank accession number AF176934.1) and *Sarcocystis hirsuta* in one sample of beef (11.11%, GenBank accession number AF006469.1). It is concluded that *T. gondii* and *Sarcocystis* spp. are circulating in meat products in

the Botucatu - São Paulo, with special attention to *T. gondii* and *S. hominis*, since they are zoonotic.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, meat products, food safety, public health, molecular techniques, genotyping.

***I*NTRODUÇÃO**

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular capaz de infectar grande variedade de hospedeiros. É classificado no filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae, e agente da toxoplasmose, zoonose de importância mundial, tanto na medicina humana quanto na veterinária. É capaz de infectar os animais homeotérmicos (mamíferos e aves), inclusive os humanos. O seu ciclo é classificado como heteroxeno facultativo com muitos hospedeiros intermediários, sendo os felídeos, os únicos hospedeiros definitivos, nos quais se desenvolve o ciclo completo, enteroepitelial deste protozoário, forma sexuada e assexuada. Esses animais são responsáveis por liberarem grande quantidade de oocistos no ambiente, pelas fezes. Nos hospedeiros intermediários, como nos animais de produção, utilizados para consumo humano, ocorre a formação de cistos teciduais (bradizoítos). Nestes a toxoplasmose é responsável por perdas nos índices zootécnicos, com desordens reprodutivas principalmente, e conseqüentemente perdas econômicas. Possui considerável relevância em saúde pública, pela possível contaminação de alimentos de origem animal provenientes de animais infectados, sendo ainda uma zoonose grave em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana aids e, imunossuprimidos por outras causas (TENTER et al., 2000).

Os animais de produção tem um papel fundamental na dispersão da infecção. Os seus produtos cárneos representam sérias implicações em saúde pública, como uma importante via de transmissão para a infecção em humanos, por conterem as formas císticas de bradizoítos na musculatura. A manipulação de carne contaminada com cistos tanto pelos magarefes, como pelas pessoas que as preparam, tem sido descrito como um fator de risco para a infecção (MILLAR et al., 2007).

Estudos de epidemiologia das enfermidades transmitidas por alimentos recebem grande atenção por tratar-se de um problema de saúde pública. A pesquisa do *T. gondii* em carnes destinadas ao consumo humano é de suma importância por ser uma via de transmissão, e responsável por surtos de origem alimentar a partir da utilização de produtos cárneos contaminados com cistos (FRANCO e BRANCO, 2009).

Segundo Dubey et al. (2005), duas são as principais vias de transmissão do *T. gondii* para humanos: alimentos ou água contaminada com oocistos esporulados ou ainda pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos do agente. Outra forma importante de infecção, é a via transplacentária a partir dos taquizoítos. Estima-se que um terço da população humana seja infectada pelo *T. gondii*, constituindo-se em uma das zoonoses mais difundidas no mundo (TENTER et al., 2000). Na população brasileira, Veronesi e Focaccia (1999) relataram que essa taxa de prevalência chega a 75%, dependendo da região estudada.

Segundo pesquisas soropidemiológicas, sugere-se que em algumas localidades a principal via de transmissão é a ingestão de produtos cárneos crus ou mal cozidos contendo cistos de *T. gondii*. Os inquéritos soropidemiológicos mostram resultados variáveis para a infecção humana, o que pode ser devido aos padrões culturais da população, hábitos alimentares, idade, procedência urbana ou rural, entre outros fatores (AMENDOEIRA et al., 1999). Da mesma forma os resultados referentes aos animais são também variáveis, o que deve estar relacionado às técnicas sorológicas utilizadas para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*.

O parasitismo por este protozoário afeta grande parte da população humana e animal (mais de 300 espécies de animais entre mamíferos e aves – domésticos ou silvestres) em todo o mundo (DUBEY et al., 1998; TENTER et al., 2000). Merece grande atenção por ser de importância médica e veterinária, com necessidade do aprimoramento de técnicas diagnósticas de maior eficácia e precisão temporal da infecção para promover aumento na segurança alimentar e nos índices produtivos (TENTER et al., 2000). A grande maioria dos animais infectados por *T. gondii* resiste à infecção, tornando-se portadores (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

A genotipagem em vários loci é necessária para revelar a diversidade de genótipos da população de *T. gondii*, encontrar os fatores genéticos que podem influenciar a virulência, entender eventuais mecanismos de seleção de genótipos de acordo com a espécie hospedeira e tentar encontrar relações entre o genótipo e a doença em humanos (DARDÉ, 2008). Assim este experimento teve como propósito pesquisar a presença de *T. gondii* em produtos cárneos, pela importância destes como fonte proteica para humanos e considerando-se a possibilidade de serem via

de transmissão do agente, na toxoplasmose humana, a partir da ingestão de produtos cárneos provenientes de suínos, bovinos e seus derivados.

***R*evisão de Literatura**

2. REVISÃO DE LITERATURA

T. gondii é um parasito de ciclo heteroxeno facultativo que infecta todas as espécies de sangue quente (mamíferos e aves) incluindo o homem (TENTER et al., 2000). Os felídeos são os únicos animais nos quais ocorre o ciclo enteroepitelial, sendo, portanto os únicos a realizarem a dispersão de oocistos deste parasito no ambiente. Ressalta-se, também, que pode ocorrer paralela ou simultaneamente, a multiplicação extra intestinal assexuada (taquizoítos e bradizoítos). Outros animais, no entanto, realizam somente o ciclo assexuado, podendo ocorrer a formação de cistos no cérebro, olhos, musculatura esquelética e cardíaca (INNES, 2010). A grande diversidade de vias de transmissão mostra a sua importância na disseminação para todos os susceptíveis (TENTER et al., 2000).

O período pré-patente para a liberação de oocistos, nas fezes dos felinos, é de 3-10 dias quando há ingestão de cistos teciduais, e de 19 ou mais dias quando a infecção ocorre pela ingestão de taquizoítos ou oocistos. A contaminação ambiental pelos oocistos é de suma importância para a manutenção do ciclo evolutivo do parasito. Menos de 50% dos gatos, ao se infectarem a partir de taquizoítos ou oocistos, eliminam oocistos, mas ao se infectarem a partir de cistos teciduais, praticamente todos eliminam oocistos nas fezes (DUBEY e FRENKEL, 1976).

Oocistos presentes no ambiente atuam no ciclo de transmissão de herbívoros. A principal via de transmissão é pela ingestão de oocistos presentes nas pastagens, feno, forragem, ração e na água de bebida destes animais (TENTER et al., 2000). Esta contaminação ambiental pode explicar a infecção em seres humanos vegetarianos, e não se descarta a possibilidade de outros animais se infectarem por esta via (INNES, 2010). Outra possibilidade em herbívoros é a transmissão transplacentária (TENTER et al., 2000).

Os hospedeiros suscetíveis se infectam por uma das três formas de apresentação do parasito, correspondente aos três estágios morfológicos: taquizoítas (secreções, excreções, sangue e pseudocistos), bradizoítas (cistos) e esporozoítas (oocistos esporulados no ambiente contaminado com fezes de felídeos) (DUBEY, 2008).

A participação do gato no ciclo sexuado do *T. gondii* é essencial, pois resultados de pesquisa mostram que onde não havia felinos, a toxoplasmose também era ausente (DUBEY e SU, 2009).

A infecção pelo *T.gondii* é de ampla distribuição, variando entre diferentes regiões. Estima-se que aproximadamente um terço da população humana apresenta a infecção por *T. gondii* (HILL e DUBEY, 2002). Dubey e Beattie (1988) estimaram que a ocorrência da infecção na Europa e América do Sul variasse de 50 a 80%, enquanto Tenter et al., (2000) relataram ocorrência variável de 0 a 100%, de acordo com a região e grupo étnico estudado.

Estudos soropidemiológicos no Brasil têm demonstrado que os suínos e bovinos apresentam soroprevalência variável conforme o local do estudo, devido às variações regionais ou fatores geográficos e dos diferentes sistemas de produção adotados (GARCIA et al., 1999). No Brasil as pesquisas sorológicas mostram os percentuais de frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos de 1,11% a 54,1% (VIDOTTO et al., 1990; SOUZA, 1995; BARCI et al., 1998; GARCIA et al., 1999; PORTO et al., 1999; FIALHO e ARAÚJO, 2003; TSUTSUI et al., 2003; MILLAR et al., 2008a) e nos bovinos de 12 a 49,1% (COSTA et al., 1978; COSTA e COSTA, 1978; COSTA et al., 2001; DAGUER et al., 2004). Deste modo a alta prevalência de animais sororeagentes, relatada pelos referidos autores, mostra a circulação deste parasito nas criações de suínos e de bovinos e de que podem atuar como fontes de infecção para os consumidores no caso da ingestão dos produtos cárneos ou seus derivados crus ou mal cozidos ou para os indivíduos que trabalham diretamente com estes produtos crus.

A sua ocorrência é alta, principalmente na forma subclínica. A doença clínica ocorre principalmente em crianças infectadas congenitamente e em indivíduos imunocomprometidos (DUBEY e JONES, 2008).

A via de transmissão pode ser pela ingestão de cistos presentes na carne crua ou mal cozida e água ou alimentos contaminados com oocistos. São importantes estudos epidemiológicos, regionalmente, para se estabelecer possíveis riscos de transmissão e fatores de risco para a ocorrência de infecção toxoplásmica ou de toxoplasmose (KIJLSTRA e JONGERT, 2008, 2009).

A presença de cistos teciduais em suínos foi relatada por Dubey (1988), entretanto Tsutsui et al. (2007) em estudo de infecção experimental em suínos não

estabeleceram diferenças significativas da presença de cistos entre os cortes comerciais: pernil, lombo, costela e paleta.

Os cistos presentes nas carcaças e produtos cárneos ficam viáveis e infectantes por tempo variável. Nos processos de refrigeração (1 a 4°C) os cistos permanecem por até três semanas infectantes, entretanto já em temperaturas mais baixas (-12°C) a maioria dos cistos são inativados (DUBEY, 2000). Processos de cura com sais, sacarose ou processos de defumação a baixas temperaturas são também capazes de inativar os cistos (HILL et al., 2004).

Os cistos na musculatura não são detectáveis durante o processo de fiscalização no abate (KOSKI, 1990). Os sistemas de produção são pontos importantes ao se considerar as boas práticas de produção de alimentos para se prevenir a infecção dos animais destinados ao abate (GONDIM et al., 1999). O que se observa nos sistemas produtivos, é a presença de felinos no mesmo ambiente de criação, sendo grandes responsáveis pela disseminação de oocistos no ambiente, contaminando pastagens, alimentos e água (DUBEY et al., 1995; MILLAR et al., 2008b).

Outro fator preocupante no contexto da produção de carne é o mercado de carnes informal, pois não recebe fiscalização, o que não assegura a origem desses produtos cárneos e nem os processos de produção pelos quais passaram. No caso do mercado de carne bovina há dados que 50% do mercado nacional corresponde a este tipo de comércio (AZEVEDO e BANKUTI, 2001). O risco na saúde pública já existe com a carne inspecionada e garantida, sendo muito maior nas carnes clandestinas, onde não se tem garantia dos processos de criação.

Surtos de origem alimentar são relatados com frequência, mostrando a participação de carnes principalmente suína, caprina e ovina como responsáveis (NAVARRO et al., 1994). Bonametti et al, (1997) relataram, no Brasil, surto de toxoplasmose aguda em 17 indivíduos, sintomáticos, após o consumo de carne crua de carneiro, na forma de quibe. A infecção em indivíduos imunocompetentes é subclínica, na maioria dos casos, diferentemente dos indivíduos imunossuprimidos, que pela imunodeficiência, desenvolvem a doença com quadros de febre, linfadenopatia, debilidade, alterações oculares, encefalites e até mesmo desordens multisistêmicas severas (McALLISTER, 2005). Na toxoplasmose congênita os

danos resultantes podem ser abortos, alterações congênitas, retardo mental e cegueira (TENTER et al., 2000).

A carne suína é um dos alimentos mais importantes na via de transmissão de *T. gondii* para saúde pública. O mesmo pode se considerar em produtos cárneos de caprinos e ovinos. A pesquisa do *T. gondii* nas carnes destas espécies é importante para se avaliar a cadeia de transmissão do *T. gondii*. O quibe cru, por ser um produto consumido in natura, representa um grande risco aos consumidores.

O controle da infecção em humanos se dá a partir da redução da infecção nos animais, que se baseia no monitoramento da evolução da infecção subclínica na população animal e adoção de medidas preventivas adequadas. Devem ser realizados testes diagnósticos rápidos e exequíveis (MAINAR-JAIME e BARBERÁN, 2007). Deve-se enfatizar que o processo de prevenção é caracterizado por várias ações realizadas na produção animal, no processo de industrialização dos produtos cárneos e no consumo destes produtos, sendo que os humanos possuem papel importante neste processo para impedir que a infecção ocorra (KIJLSTRA e JONGERT, 2008).

A estrutura clonal da população de *T. gondii* é ampla (HOWE e SIBLEY, 1995), e consiste predominantemente de três linhagens, designadas I, II e III. Na natureza sua distribuição ocorre, principalmente, pela replicação assexuada ou por cruzamentos uniparentais. A ligação entre as diferentes populações clonais com casos de toxoplasmose têm sido relatada: cepas tipo I tem sido encontradas em casos de toxoplasmose aguda, enquanto que as cepas do tipo II são prevalentes em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) e na toxoplasmose congênita em humanos (HOWE e SIBLEY, 1995; FUENTES et al., 2001).

O conhecimento de diferentes genótipos existentes permite uma associação entre hospedeiros e os danos por eles causados (OWEN e TREES, 1999). A ligação do genótipo com os seus danos (virulência) foi suportada quando se analisou *T. gondii* em modelos experimentais animais, nos EUA e Europa. As cepas do tipo II e III levam à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos, enquanto que as cepas do tipo I são extremamente virulentas para camundongos. A elevada parasitemia aumenta o risco de transmissão transplacentária ou a severidade de infecção fetal (HOWE e SIBLEY, 1995).

Uma descrição molecular do agente permite caracterizar a sua estrutura populacional clonal. A caracterização fenotípica da infecção estará intimamente ligada às variações ocorridas dentro desta estrutura populacional. Antigamente se considerava *T. gondii* como agente de baixa variabilidade genética, com base em informações derivadas de estudos conduzidos com isolamentos da Europa e América do Norte. Utilizando novos marcadores moleculares para a caracterização genética de amostras isoladas no Brasil e Guiana Francesa, verificou-se maior variabilidade genética em comparação às já registradas (AJZENBERG et al., 2004).

A análise das sequências polimórficas determina a cepa (SWITAJ et al., 2005). O protocolo de genotipagem que analisa um ou dois loci é limitante (LEHMANN et al., 2000; AJZENBERG et al., 2002). A análise em multilocus é importante para a avaliação da diversidade existente em várias regiões do DNA do parasito (KHAN et al., 2005; DUBEY et al., 2006b; SU et al., 2006; FAZAELI e EBRAHIMZADEH, 2007).

Os estudos de genotipagem têm sido embasados na pesquisa em 11 loci gênicos (SAG1, 5'+3'SAG2, SAG3, alt-SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358. PK1, Apico) (PENA et al., 2008), confirmando haver uma população clonal de *T. gondii* muito variada (DA SILVA et al., 2009a).

A identificação dos genótipos existentes em linhagens de *T. gondii* no Brasil é necessária. O uso da técnica RFLP-PCR para 11 diferentes sequências gênicas consegue analisar características das linhagens de *T. gondii* (DA SILVA et al., 2009b). Desta forma os estudos de epidemiologia molecular de isolados deste protozoário possibilitam melhor entendimento dos muitos aspectos relacionados à toxoplasmose tanto nos animais como em humanos.

Partindo-se do conhecimento da participação de produtos cárneos na cadeia de transmissão da toxoplasmose para humanos e a sua importância para a saúde pública a presente pesquisa teve como objetivo pesquisar a presença de *T. gondii* nos referidos produtos.

*O*bjtivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Pesquisar a presença de *T. gondii* em quibes crus e em cortes comerciais de carnes suínas e bovinas, comercializados em açougues e supermercado do município de Botucatu-SP, destinados ao consumo humano.

3.2. Objetivos Específicos

1 – Determinar a virulência do *T. gondii* a partir do isolamento em camundongos *Swiss Webster* (bioprova).

2 - Determinar a carga parasitária do agente pela técnica de PCR em tempo real (qPCR).

3 - Caracterizar genotipicamente as cepas de *T. gondii* positivas à PCR a partir das amostras de carnes bovinas, suínas e de quibe cru.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo longitudinal foi realizado utilizando amostras de cortes de carne de suínos e bovinos e de quibe cru foram adquiridas em cinco estabelecimentos comerciais do município de Botucatu – SP, em dez momentos distintos. A parte experimental foi realizada nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses – NUPEZO, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP.

4.1. Delineamento experimental

Um total de 141 amostras cárneas obtidas em cinco estabelecimentos comerciais (A, B, C, D e E), sendo mantido sigilo, mensalmente durante 10 meses, e analisadas para a tentativa de isolamento de *T. gondii* em camundongos *Swiss Webster*. As amostras foram obtidas por conveniência não probabilística.

4.2. Obtenção das amostras

Foram adquiridos e pesquisados os seguintes cortes: para carne suína: pernil (49 amostras); para carne bovina: músculo traseiro (48 amostras) e quibe cru (44 amostras), no 15º dia de cada mês, durante 10 meses, sendo processadas no total de 141 amostras. A diferença no número de amostras obtidas foi devido a não disponibilidade no dia da coleta do corte solicitado. Estes cortes comerciais foram obtidas em estabelecimentos comerciais. O material foi identificado e acondicionado em caixa isotérmica e mantido em condições de refrigeração (4-8°C) até o momento do processamento, quando da chegada ao laboratório.

4.3. Isolamento em camundongos

Inicialmente as amostras foram pesadas, obtendo-se asepticamente 50g, sendo retirados oito fragmentos de locais diferentes da peça de carne (1kg cada), sendo trituradas em seguida com auxílio de processador de carne tipo mixer. Foram utilizadas 10g de cada amostra. Da suspensão obtida, homogeneizando-se a 1:5 (p/v) em solução de cloreto de sódio 0,18%, adicionada de penicilina (500.000U/mL) e estreptomicina (100mg/mL) submeteu-se à digestão em solução ácida de pepsina (DUBEY, 1998), inoculando-se 1 ml por camundongo *Swiss Webster*, via subcutânea na prega nugal, no total de cinco animais por amostra.

Os animais inoculados foram mantidos em observação por período máximo de 60 dias, em caixas de propileno, em estante ventilada ALESCO, modelo ALE99002-001, com *no-break*, recebendo água e ração *ad libitum*. Dos animais que morreram durante o período de observação foram coletados os cérebros para realização de PCR. Dos animais que sobreviveram ao período de observação, foi colhido o sangue pela punção do seio retro-orbital, e após separação do soro, realizado a prova de aglutinação direta modificada (MAT-AF) para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. Foram consideradas positivas as amostras com PCR positiva para *T. gondii* ou naqueles animais em que o resultado MAT-AF fosse positivo (DUBEY e BEATTIE, 1988).

4.4. Exame de detecção de anticorpos

4.4.1. Produção de antígeno

Foi utilizada a cepa RH, genótipo tipo I, isolada por Sabin em 1939 de uma criança nos Estados Unidos (SABIN, 1941), mantida por passagens semanais em camundongos Swiss Webster, albinos, com 30 dias de idade, pesando de 30 a 40 g, obtidos no Biotério Central do Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a produção de antígeno para as provas sorológicas, seguindo-se o protocolo descrito por Desmonts e Remington (1980). Ao final, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspendido em 100mL de SST 0,01M pH7,2, sendo devidamente homogeneizado.

4.4.2. Preparação de antígeno inativado pela formalina

Foi adicionado 100 ml de formalina-12% (formaldeído-6%), diluída em SST 0,01M pH7,2, à suspensão com parasitos, mantendo-a *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foi centrifugada a 600 x g durante 10 minutos e, o sedimento, ressuspendido em 50 ml de SST 0,01M pH7,2. Esse processo foi repetido mais duas vezes, para remover os restos celulares e o formaldeído. Finalmente foi ressuspendido em solução tampão borato pH 8,7, ajustando-se a suspensão final para 2x10⁴ parasitos por µL, que foi mantida a 4°C até o momento da sua utilização (DESMONTS e REMINGTON, 1980).

4.4.3. Prova de aglutinação direta modificada

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1600 x g por 10 minutos, para obtenção do soro sanguíneo, e imediatamente acondicionados em microtubos plásticos devidamente identificados com o número de protocolo e data da colheita, e armazenados a -20°C até o momento de execução da prova sorológica.

A técnica de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pela formalina (MAT-AF) foi realizada de acordo com Desmonts e Remington (1980). As amostras de soro foram diluídas em microplacas de fundo chato, adicionando-se 150µl de SST 0,01M pH7,2 em todas as cavidades utilizadas. Na primeira delas, foi adicionado 10µL de soro (diluição 1:16) e, após homogeneização com auxílio de micropipeta, foi transferido 50µl para a cavidade seguinte, equivalendo a diluição 1:64, procedendo-se assim até a diluição 1:16.384. A seguir, 25µL de cada diluição foi transferida para as respectivas cavidades de microplacas com fundo em "V". Posteriormente, adicionou-se 25µl de 2-mercaptoetanol 0,2M, diluído em SST 0,01M pH7,2, e finalmente a adição de 50µL do antígeno, diluído em solução tampão borato pH8,7. As placas foram seladas com filme plástico, homogeneizadas por um minuto e incubadas a temperatura ambiente, *overnight*, procedendo-se a leitura com interpretação dos resultados. Foi considerado positivo quando houve a formação de uma película cobrindo pelo menos metade do fundo da cavidade, e negativo quando houve a formação de "botão ou anel no fundo".

4.5. Exames de biologia molecular para *T. gondii*

Foram utilizadas medidas para evitar a contaminação entre amostras em todas as fases do protocolo experimental, desde a colheita das mesmas, pela utilização de materiais individuais e estéreis, bem como para as etapas características da PCR, tais como utilização de salas diferentes para a extração de DNA, preparação de reagentes, amplificação e análise das amostras, troca freqüente de luvas, material plástico individual e descartável, e utilização de controles dos reagentes de extração e amplificação.

4.5.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA foram utilizadas amostras digeridas de cada corte comercial de carne suína e bovina e de quibe, 0,5 ml de cada amostra. Também

foram utilizadas amostras de cérebro dos camundongos positivos, meio cérebro de cada amostra. Este processo foi realizado para expor o DNA do parasito. A extração e purificação de DNA das amostras teciduais foram realizadas utilizando-se kit de extração, Illustra Tissue and cells genomic Prep Mini spin kit (GE Healthcare Life Sciences do Brasil Ltda.[®]), conforme instrução do fabricante. A concentração e qualidade do DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare).

4.5.2. Reação em Cadeia pela Polimerase

Todas as amostras de carnes suínas e bovinas, de quibe e dos animais em que o material inoculado foi positivo foram examinadas para a detecção de DNA de *T. gondii* pela PCR, utilizando-se os primers TOX4 (5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3') e TOX5 (5'CGCTGCAGACACGTGCATCTGGATT3'), segundo descrito por Homan *et al.* (2000), amplificando uma região de 529 pares de base (pb), que possui de 200 a 300 cópias no DNA. Cada microtubo de reação de 0,2mL recebeu 2,5µL tampão de PCR 10x, sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 0,75µL MgCl₂ (1,5mM), 0,25µL de solução de deoxinucleotídeos (1,25mM), Taq DNA polimerase (0,15U), 5µL de cada oligonucleotídeo (10µM), 10µL de amostra, e 17,35µL água ultrapura. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador MasterCycler EP gradient, utilizando-se uma incubação inicial de sete minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 60°C e um minuto a 72°C, com incubação final de 10 minutos a 72°C.

Alíquotas de 10µl das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5µl de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com 0,3µL/mL de brometo de etídio em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x. A corrida foi realizada a 100 volts por 90 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado e fotografado em sistema de fotodocumentação digital, Sistema Gel-Doc it, sob luz ultravioleta e em computador específico.

4.5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa: determinação da carga parasitária

As amostras positivas na PCR convencional foram submetidas a PCR quantitativa (qPCR). Para a determinação da carga parasitária foram utilizados primers direcionados para a região alvo descritos por Homan et al. (2000), de 529 pb repetitiva 200 a 300 vezes no genoma do parasito (Toxo-529), amplificando um produto de 94 pb, utilizando oligonucleotídeos e o sistema SYBR Green, como descrito por Edvinsson et al. (2006). As reações foram processadas em termociclador StepOne Real-time PCR (Applied Biosystems).

4.5.4. Genotipagem

As amostras positivas à triagem foram amplificadas em protocolo de PCR em vários *loci* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores externos para todos os 11 marcadores genéticos (SAG1, 5'-3'SAG2, SAG3, B-tub, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, aSAG2 e Apico) mais um marcador de virulência (CS3) segundo descrito por Su et al. (2006), Ferreira et al. (2006) e Pena et al. (2008). Foram utilizadas amostras de referências GT1, PTG, CTG, TgCgCa1, MAS e TgCatBr5, como controle para os cortes das enzimas. Para a multiplex-PCR (oligonucleotídeos externos), onde cada tubo de reação de 0,2mL recebeu 2,5µL de tampão de PCR 10x, sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 2,0µL de MgCl₂ (25mM), 2,0µL de cada deoxinucleotídeos (2,5mM), 0,2µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 0,15µL de mix de oligonucleotídeos (25µM de cada primer), 16,5µL de água ultrapura, atingindo volume final de 23,5µL, e 1,5µL de amostra. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: denaturação inicial de 95°C por quatro minutos, 30 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 55°C por um minuto, extensão a 72°C por dois minutos. Aos produtos da PCR foi adicionado 25µL de água ultrapura para diluir o produto da PCR. Os produtos foram armazenados a 4°C.

Para a nested-PCR (oligonucleotídeos internos) cada tubo de reação de 0,2mL recebeu a mesma quantidade e concentração de reagentes utilizados na multiplex-PCR, com exceção da concentração dos primers, onde cada região do DNA foi amplificada separadamente com 0,15µL de cada oligonucleotídeo (50µM). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: denaturação inicial de

95°C por quatro minutos, 35 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 60°C por um minuto, extensão a 72°C por dois minutos.

Após a obtenção dos produtos finais de reação de nested-PCR, foi realizada a RFLP-PCR em microtubo de 0,5mL, onde 3µL dos mesmos foram homogeneizados a uma mistura de 2,0µL de tampão NEB 10x específico, 0,2µL de albumina sérica bovina (BSA) 100x, 0,1µL da(s) enzima(s) de restrição apropriada(s), e 14,6µL água ultrapura por amostra, totalizando 20µL e incubando-se as amostras por período e em temperatura apropriada para cada enzima ou enzimas utilizadas, de acordo com o fabricante.

Nas mesmas condições foram realizadas as ampliações e digestões dos gene 18S rRNA, para diferenciar *T. gondii*, *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi* e *Sarcocystis* spp. (DA SILVA et al., 2009b).

Após a digestão, 4µL do produto da RFLP-PCR foi homogeneizado em 2µL de tampão de “loading” 5x e foram examinados em eletroforese de gel de agarose 2,5% (3,0% para o marcador Apico) com 0,3µL/mL brometo de etídio em tampão TBE 1x, 80 voltz por 60 minutos. Os perfis de cortes foram comparados aos das cepas referências e aos genótipos presentes na literatura científica.

4.5.5. Sequenciamento

Os produtos da PCR para os primers TOX4 e TOX5, e da nested-PCR no locus 18S rRNA foram purificados utilizando-se o kit de purificação Centrifugal Filter Units, MRCF0R030 (Millipore, EUA) ou ExoStar1-Step, US77705 (GE Healthcare, EUA) e a seguir o DNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando-se o espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare, EUA), e eletroforese em gel de agarose.

O sequenciamento direto dos produtos da PCR e nested-PCR foram realizados nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, SP, para confirmar a identidade dos amplicons obtidos na reação de nested-PCR das regiões que apresentaram nos perfis de digestão não identificados ainda na literatura com seqüências depositadas na base de dados do GenBank. Utilizou-se 5µL (5µM) dos oligonucleotídeos internos utilizados na PCR (TOX4 e TOX5) ou na nested-PCR (18SrRNA-S e 18SrRNA-AS), dependendo do resultado na PCR, e 10µL (10ng.µL-1)

de produto de DNA purificado. As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático Applied Biosystems 3100 (Applied Biosystems, EUA) empregando-se o ABI BigDye kit e GE DYEnamic ET terminator kit (GE Healthcare, EUA) e analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. As seqüências sense e antisense obtidas foram alinhadas e visualizadas em software BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0, na forma de eletroferograma, submetidas ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparadas com as seqüências depositadas nos bancos de dados supracitados.

4.5.5. Análise estatística

Todos os dados foram tabulados em planilha Excel. Foi realizado o teste de Fischer para analisar a associação entre as variáveis tipo de material (carnes bovinas, suínas e quibe), resultados de PCR, origem da amostra e data de coleta. Para as análises considerou-se nível de significância de 5% (TRIOLA, 2005).

*R*esultados

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento em camundongos - Bioprova

Foram descartados 56 animais, que morreram durante os primeiros cinco dias pós-inoculação ficando 649 animais, que sobreviveram ao período de 60 dias da bioprova. Nenhum animal revelou resultado positivo para *T. gondii*.

5.2. Prova de aglutinação direta modificada

As amostras de soro sanguíneos de 649 animais submetidas a prova de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pela formalina, também apresentaram resultados negativos. Destaca-se que foram realizados paralelamente exames com amostras de soros controles positivos e negativos.

5.3. Exames de biologia molecular

5.3.1. PCR

Foram realizados 182 exames de PCR, sendo 141 (77,47%) das amostras de produtos carneos e 41 (22,53%) de camundongos que foram inoculados com material positivo. Das amostras de produtos carneos nove foram positivas (6,38%), sendo cinco (55,56%) de carne bovina, três (33,33%) de carne suína e uma (11,11%) amostra de quibe positiva. Não houve diferença estatística entre as diferentes amostras para os resultados da PCR.

Todas as amostras provenientes de camundongos inoculados com material positivo à PCR foram negativas.

Das amostras positivas à PCR sete (77,78%) eram provenientes de açougues e duas (22,22%) de supermercado. A distribuição das amostras positivas à PCR segundo sua procedência foi: três (10,35%) do açougue A e três (10,00%) do açougue C e uma (3,33%) do açougue B. No açougue A duas amostras eram de bovinos e uma de suíno. No açougue C uma amostra de cada produto cárneo foi positiva e no açougue B somente uma amostra de bovino. No açougue D nenhuma amostra foi positiva. Duas amostras (7,14%) do supermercado foram positivas, sendo uma de carne bovina e uma de suína (**Tabela 1**). Não houve diferença estatística entre a origem do material e os resultados de PCR.

Tabela 1. Frequência dos resultados da pesquisa de DNA para *T. gondii* pela PCR a partir de carnes bovina e suína, e de quibe comercializados na região de Botucatu, SP, assim como sua origem. Botucatu, SP, 2011 – 2013.

Origem	N (%)	PCR positivo		
		n	FR (Estabelecimentos); IC95%	FR (total); IC95%
Açougue A	29 (20,57)	3	10,35 (3,76-26,53)	33,33 (12,16-65,25)
Açougue B	30 (21,28)	1	3,33 (0,79-16,70)	11,11 (2,52-44,50)
Açougue C	30 (21,28)	3	10,00 (3,63-25,75)	33,33 (12,16-65,25)
Açougue D	24 (17,02)	0	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)
Supermercado	28 (19,85)	2	7,14 (2,19-22,77)	22,22 (6,67-55,61)
Total	141 (100)	9	6,38 (3,43-11,69)	100 (-)

N: número de amostra para cada estabelecimento; n: número de amostras com resultados positivo à PCR; %: porcentagem; IC95%: intervalo de confiança de 95%.

Ao se analisar as variáveis data da coleta e os resultados de PCR, verificou-se que houve diferença estatística significativa ($P < 0,001$).

5.3.2. Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa: determinação da carga parasitária

Das nove amostras de produtos cárneos positivas à PCR, em oito foram realizados exames de qPCR. Os resultados foram: quatro (44,45%) amostras de carnes bovinas, duas (22,22%) amostras de carnes suínas, uma (11,11%) amostra de quibe positiva e uma (11,11%) amostra negativa. A quantificação revelou resultados variáveis de 0 a 390 parasitos por mL. Os valores de duas amostras, que foram confirmadas como sendo *T. gondii* por sequenciamento e genotipagem, foram superiores a 100 (uma com 170 e outra com 390 parasitos por mL), uma amostra ficou abaixo de 100 (16 parasitos por mL) e uma apresentou resultado de zero (negativo).

5.3.3. Genotipagem

As nove amostras positivas a PCR como triagem para pesquisa do DNA parasitário foram amplificadas em protocolo de PCR em vários *loci* utilizando os

oligonucleotídeos iniciadores externos para 12 marcadores genéticos. Após a análise dos perfis genotípicos, somente uma amostra de quibe (11,1%) apresentou padrão completo como *T. gondii*. Em oito amostras (88,8%) não foi possível a caracterização genotípica para *T. gondii* em várias enzimas utilizadas. Pela genotipagem obteve-se resultado compatível com padrão de cortes de *T. gondii* em quatro amostras e de *S. hominis* em duas. Em três amostras o resultado não pode ser determinado por esta técnica, apresentando bandas inespecíficas (**Tabela 2**).

Tabela 2. Caracterização genotípica de *Toxoplasma gondii* de amostra de quibe comercializado na cidade de Botucatu, SP, positivo à PCR. Botucatu, SP, 2011 – 2013.

Registro	Amostra	Sobrevida (dias)*	Marcadores Genéticos											Genótipo	Referência	
			SAG1	5'-3'SAG2	alt-SAG2	SA G3	Btub	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico			CS3
															MAS	Su et al. (2006)
51	Quibe	60	nd	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	nd	TgCkBr89	Dubey et al. (2008)
															TgCkBr147	Dubey et al. (2008)

*Período de observação dos camundongos = 60 dias p.i.; nd: sem dados.

5.3.4. Sequenciamento

Os amplicons da nested-PCR do gene 18S do rRNA foram sequenciados, sendo no total nove (100%) amostras. As amostras foram assim caracterizadas, quatro (44,44%) como *T. gondii*, duas (22,22%) como *Sarcocystis cruzi* (*S. cruzi*), uma (11,11%) como *Sarcocystis hirsuta* (*S. hirsuta*) e duas (22,22%) como *S. hominis* (**Tabela 3**). A identidade das amostras submetidas ao sequenciamento comparadas com sequenciamentos depositados no GenBank foi de 100% em oito amostras (amostras 51, 100, 106, 107, 112, 115, 116 e 119) sendo quatro amostras de *T. gondii*, duas de *S. cruzi*, uma de *S. hirsuta*, e uma de *S. hominis*. Uma amostra apresentou identidade de 99% para *S. hominis*.

Tabela 3. Resultados das provas de biologia molecular dos amplicons das nove amostras de produtos cárneos submetidos à pesquisa molecular pela PCR e qPCR, e do gene 18S rRNA do parasito pela nested-PCR, RFLP-PCR e sequenciamento. Botucatu, SP, 2011 – 2013.

Registro	Amostra	Origem	Gene repetitivo 529pb		Gene 18S rRNA				
			PCR	qPCR (parasitos.mL ⁻¹)	Nested-PCR (tamanho)	RFLP-PCR	Sequenciamento		
							número de acesso (GenBank)	Identidade	Agente
51	quibe	Açougue C	Positivo	390	~290pb	<i>T. gondii</i>	L37415.1	100%	<i>T. gondii</i>
100	bovino	Açougue A	Positivo	15	~310pb	ND	AF176934.1	100%	<i>S. cruzi</i>
106	bovino	Supermercado	Positivo	8	~310pb	ND	AF006469.1	100%	<i>S. hirsuta</i>
107	suíno	Supermercado	Positivo	16	~290pb	<i>T. gondii</i>	L37415.1	100%	<i>T. gondii</i>
112	bovino	Açougue B	positivo	10	~310pb	ND	AF176934.1	100%	<i>S. cruzi</i>
115	bovino	Açougue C	positivo	NR	~310pb	<i>S. hominis</i>	AF006471.1	100%	<i>S. hominis</i>
116	suíno	Açougue C	positivo	170	~290pb	<i>T. gondii</i>	L37415.1	100%	<i>T. gondii</i>
118	bovino	Açougue A	positivo	6	~310pb	<i>S. hominis</i>	AF006471.1	99%	<i>S. hominis</i>
119	suíno	Açougue A	positivo	0	~290pb	<i>T. gondii</i>	L37415.1	100%	<i>T. gondii</i>

pb: pares de bases; NR: não realizado; ND: resultado não determinado

L37415.1: *T. gondii* 18S ribosomal RNA gene, complete sequence; AF176934.1: *S. cruzi* strain 12hcr60 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF006469.1: *S. hirsuta* 18S ribosomal RNA gene, complete sequence; AF006471.1: *S. hominis* 18S ribosomal RNA gene, complete sequence.

*D*iscussão

6. Discussão

Os produtos cárneos, in natura e derivados de carne bovina e suína são importantes fontes proteicas para humanos. Os animais de produção tem um papel fundamental na dispersão da infecção pelo *T. gondii*, sendo uma das possíveis vias de transmissão na toxoplasmose humana. A pesquisa de agentes zoonóticos em carnes destinadas ao consumo humano é de grande importância, por representar risco à saúde pública (FRANCO e BRANCO, 2009).

A produção de cistos teciduais é variável entre os animais e está relacionada ao organotropismo, que o parasito apresenta (Dubey e Jones, 2008). O isolamento pela bioprova fica na dependência da dose infectante mínima para que ocorra a infecção nos camundongos. Os cistos presentes nas carcaças e produtos cárneos ficam viáveis e infectantes por tempo variável. Os resultados do isolamento são dependentes da viabilidade e da virulência das formas infectantes do protozoário. Tal fato deve ser considerado, analisando-se os resultados negativos da bioprova e da sorologia, pois não foi possível detectar soroconversão nos animais inoculados no presente estudo.

Com base nos resultados positivos das provas de biologia molecular e negativos da bioprova, pode-se discutir que o material inoculado apresentava DNA do parasito, porém a sua viabilidade, estava comprometida, ou que as cepas são avirulentas para os camundongos.

O bioensaio para o isolamento de *T. gondii* é laborioso (TSUTSUI, 2007), entretanto, fornece características de virulência da cepa isolada. No presente estudo não se isolou *T. gondii* em nenhuma amostra analisada. Sabe-se que o congelamento faz com que ocorra a inativação de bradizoítos presentes nas amostras de produtos cárneos. De acordo com Bayarri et al. (2012), congelamento é suficiente para inativar as formas infectantes de *T. gondii*.

Mendonça et al. (2004) ao estudarem a importância de linguiças na cadeia epidemiológica da transmissão da toxoplasmose, investigaram a presença de *T. gondii* em 70 amostras de linguiças vendidas em estabelecimentos comerciais. Realizaram a bioprova para tentativa de isolamento do agente em camundongos, e a PCR. Os resultados da bioprova foram todos negativos e na técnica de PCR obtiveram 33 (47,14%) de amostras positivas. A presença de material genético na

PCR e o resultado negativo no isolamento mostra que o protozoário estava presente, entretanto, com sua viabilidade comprometida, fato que pode ter ocorrido no presente estudo, quanto as amostras de quibe analisadas, considerando-se que são temperadas com sal.

Os resultados obtidos da PCR revelaram a presença do parasito em nove (6,38%) amostras. Estes dados permitem a interpretação de que o parasito ou estava inviável, ou avirulento para os camundongos.

Os resultados da MAD e PCR do material obtido dos camundongos das bioprovas revelam que os animais não desenvolveram a infecção. Resultados da literatura por outro lado, mostram que os bovinos, se infectam e podem albergar as formas infectantes de *T. gondii* (MACEDO et al., 2012). A carne suína no que se refere a transmissão de toxoplasmose, é considerada como uma das mais importantes para a saúde pública, e a de bovinos de menor importância neste contexto (TENTER et al., 2000), entretanto, não se pode descartar a possibilidade de sua contaminação com cistos de *T. gondii*.

A pesquisa de *T. gondii* na carne é importante para se avaliar a cadeia de transmissão deste protozoário, e o quibe cru é um produto que pode ser consumido in natura, o que representa um grande risco aos consumidores uma vez que a carne utilizada em seu preparo pode ser de várias espécies com importância na transmissão do *T. gondii* e vários surtos de origem alimentar envolvendo alimentos cárneos são relatados na literatura (NAVARRO et al., 1994; COOK et al., 2000; KIJLSTRA e JONGERT, 2008).

No presente estudo *T. gondii* foi detectado em amostras de suínos e quibe, corroborando com Tenter et al., (2000). Os suínos estão entre os mais importantes na cadeia de transmissão da toxoplasmose (TENTER et al., 2000), e o quibe por se tratar de um alimento produzido com carne ovina principalmente, além de outras, representa também riscos aos humanos quando consumido in natura (Da SILVA et al., 2003).

Os exames de PCR mostraram a presença de DNA de *T. gondii* no material pesquisado. A PCR é uma importante ferramenta no diagnóstico de *T. gondii*, bem como de outros patógenos, e o mesmo ocorre com a técnica de qPCR. As técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para detectar infecção toxoplásmica por serem sensíveis altamente específicas e rápidas (YAI et al., 2003).

Atualmente tem sido possível explorar melhor as técnicas biomoleculares considerando-se que os custos das provas tem se tornado mais acessível.

As carnes de bovinos analisadas revelaram na PCR e qPCR amplificação do *T.gondii*, entretanto, ao se realizar a genotipagem e sequenciamento verificou-se que tratava-se de *Sarcocystis* sp. Três espécies distintas foram suspeitas ao se utilizar os 11 marcadores genéticos para genotipagem de *T.gondii*. O sequenciamento mostrou tratar-se de: *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*. Este resultado mostra a relevância da carne bovina para a saúde pública pois *S. hominis* apresenta caráter zoonótico.

Bovinos são sabidamente hospedeiros intermediários de *Sarcocystis* sp. (CARLTON e MCGAVIN, 2005). Três espécies já foram descritas em bovinos: *S. cruzi*, *S. hominis* e *S. hirsuta* (LINDSAY et al., 1995).

Os humanos são hospedeiros definitivos de *S. hominis* (FAYER, 2004). É importante enquanto agente infeccioso para os animais (LOPES et al., 2005). É relatado como agente de sarcocistose intestinal em humanos a partir do consumo de carne crua. Os danos desta infecção são distúrbios digestivos com náusea, vomito e diarreia (DUBEY et al., 1989). A doença ocorre pela ingestão de carnes contendo o agente (FAYER, 2004).

No Brasil estudo com análise de 50 amostras de quibe preparadas com carne bovina, procedentes de 25 restaurantes árabes da cidade de São Paulo (duas amostras por estabelecimento) por análise de microscopia de luz e eletrônica, com o objetivo de investigar a ocorrência de *Sarcocystis* spp., revelou a presença de *S. hominis* em 94% das amostras, *S. hirsuta* em 70%, *S. cruzi* em 92% sendo a maioria como infecções mistas (PENA et al., 2001). No estado do Rio Grande do Sul, Ruas et al. (2001) verificaram cistos de *Sarcocystis* spp. em 100% das amostras de coração, 62% no esôfago, 52,8% em masseter, 52,8% nos músculos intercostais e 47,5% nas amostras de diafragma. A sarcocistose em bovinos da região sul do Rio Grande do Sul é considerada endêmica (RUAS et al., 2001). Tal fato mostra a importância epidemiológica e os riscos para a segurança alimentar para humanos.

A genotipagem empregando 11 marcadores genotípicos tem sido empregada mundialmente para a detecção de *T. gondii*. Na América do Sul os relatos são de que existe uma alta variabilidade genotípica, com o emprego da técnica e utilizando-se estes marcadores se consegue caracterizar *T. gondii* (DA

SILVA et al., 2009b). Vários autores confirmam a alta diversidade genética do parasito na América do Sul sendo isolado de diversas espécies animais como cabras no Ceará, Brasil (CAVALCANTE et al., 2007), em cães (DUBEY et al., 2007a) e gatos, na Colômbia (DUBEY et al., 2006b), e em frangos na Nicarágua (DUBEY et al., 2006a) e no Brasil (DUBEY et al., 2007b). Em Botucatu-SP já foram identificados amostras de *T. gondii* em linguiças, por provas moleculares (Da SILVA et al., 2005).

O sequenciamento identificou uma amostra de *T. gondii* descrita por Grigg et al (2001). A referida amostra era proveniente de um paciente humano na França, e foi classificada como virulenta. Outras amostras positivas ao exame de PCR não apresentaram padrões de cortes na RFLP-PCR, o que sugere baixa quantidade de material genético do agente. Esta interpretação pode explicar como foi encontrado amostras de *Sarcocystis* spp. pelo sequenciamento do material. Estudos envolvendo o encontro de novos genótipos devem ser encorajados para se entender a dinâmica de distribuição de *T. gondii*, contribuindo com a epidemiologia dinâmica da toxoplasmose, especialmente no que se refere à epidemiologia molecular.

Na toxoplasmose é possível a inativação do parasito, pelo congelamento, uso de salga bem como pelo cozimento adequado dos produtos cárneos. Estas medidas profiláticas são importantes para se evitar a infecção toxoplásmica em humanos, quando se discute a transmissão da toxoplasmose a partir da ingestão de produtos cárneos de origem animal, principalmente de ovinos, suínos, de bovinos, sabendo-se, entretanto, que qualquer mamífero é considerado como hospedeiro intermediário do *T. gondii* e que a princípio podem conter bradizoítos do agente encistados na musculatura.

É evidente que para a profilaxia da toxoplasmose há outras medidas relacionadas à cadeia epidemiológica de transmissão desta zoonose, como por exemplo, os cuidados que devem ser considerados com relação aos hospedeiros definitivos, como os felídeos e principalmente no que refere ao gato doméstico, elo importante nesta cadeia de transmissão por eliminar oocistos pelas fezes, que contribuem de forma significativa para a disseminação e manutenção da infecção entre humanos e animais.

Conclusão

7. Conclusões

1. A pesquisa de agentes zoonóticos em carnes comercializadas no comércio de Botucatu-SP revelou a circulação de *T. gondii* e de *Sarcocystis* spp. As carnes de suínos e quibe apresentaram *T. gondii* e as carnes de bovinos *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*.

2. A análise da virulência das amostras de *T. gondii* em camundongos não foi possível pelo material inoculado estar com a viabilidade comprometida.

3. A quantificação de material genético de *T. gondii* nas amostras de carnes do comércio de Botucatu-SP revelou carga parasitária baixa nas amostras de carne de bovinos, suínos e de quibe.

4. A caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* possibilitou a identificação de um padrão descrito previamente na literatura (MAS, TgCkBr89 e TgCkBr147).

*R*eferências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 34, p. 1185-1196, 2004.
- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A.-L.; TIBAYRENE, M.; DARDÉ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 27-38, 2002.
- AMENDOEIRA, M. R. R.; COSTA, T.; SPALDING, S. M. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**, v. 1, n. 1, p. 15-29, 1999.
- AZEVEDO, P.F.; BANKUTI, F.I. Na clandestinidade: o mercado informal de carne bovina. III INTERNACIONAL CONFERENCE ON AGRI-FOOD CHAIN/NETWORKS ECONOMICS AND MANAGEMENT, Ribeirão Preto, São Paulo, 2001. Disponível em: <<http://www.fearp.usp.br/egna/resumos/AzevedoFurquim.pdf>>. Acesso em: 30 mai. 2010.
- BARCI, L. A. G. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em plantéis de suínos reprodutores no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, n. 1, p. 111-113, 1998.
- BAYARRI, S.; GRACIA, M. J.; LÁZARO, R.; PÉREZ-ARQUILLUÉ, C.; HERRERA, A. *Toxoplasma gondii* in Meat and Food Safety Implications - A Review, Zoonosis, Dr. Jacob Lorenzo-Morales (Ed.), ISBN: 978-953-51-0479-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/zoonosis/toxoplasma-gondii-in-meat-and-food-safety-implications-a-review>. Acesso em 10 de fevereiro de 2013. 2012
- BONAMETTI A. M., PASSOS J. N., SILVA E. M. K.; BORTOLIERO, A. L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 21-25, 1997.
- CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. **Patologia Veterinária Especial**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 440 p.
- CAVALCANTE, A. C. R.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; FUX, B., BRANDÃO, G. P.; VITOR, R. W. A. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 69, p. 79-82, 2007.

COOK, A. J. C.; GILBERT, R. E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P. A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A. E.; DUNN, D. T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicenter case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. **British Medical Journal**, v. 321, p. 142-147, 2000.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Toxoplasmose: In: **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. São Paulo: MEDSI, 1992, p. 757-766.

COSTA, A. J.; COSTA, E. P. Freqüência de bovinos reagentes à reação de Imunofluorescência Indireta para *Toxoplasma gondii* em Poços de Caldas, MG, Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 30, n. 1, p. 47-51, 1978.

COSTA, G. H. N.; CABRAL, D. D.; VARANDAS, N. P.; SOBRAL, E. A.; BORGES, F. A.; CASTAGNOLLI, K. C. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 61-66, 2001.

COSTA, A. J.; KASAI, N.; PAULILLO, A. C.; SILVA, M. B.; GALESCO, H. Anticorpos anti-*toxoplasma* em soros de bovinos do município de Jaboticabal, S.P., Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 4, n. 45, p. 299-302, 1978.

Da SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; LANGONI, H.; MOTA, R. A ; MEIRELLES, L. R ; GOTTSCHALK, S. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: Estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 115-119, 2003.

Da SILVA, A. V.; MENDONÇA, A. O.; PEZERICO, S. B.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. . Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. **Parasitología Latinoamericana** (En línea), Santiago, v. 60, n. 1-2, p. 65-68, 2005.

Da SILVA, R. C.; SU, C.; LANGONI, H. First identification of clonal type II isolates of *Toxoplasma gondii* in Brazil. In: **10th International Congress on Toxoplasmosis**. Kerkrade. Proceedings of the 10th International Congress on Toxoplasmosis. Amsterdam : Intervet Schering-Plough Animal Health, v. 1, p. 152-152, 2009a.

Da SILVA, R. C.; SU, C.; LANGONI, H. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 332-336, 2009b.

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**, v. 34, n. 4, p. 1133-1137, 2004.

DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, p. 366-371, 2008.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, p. 562-568, 1980.

Dubey, J. P.; Su, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 190–195, 2009.

Dubey, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* —The First 100 Years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 55, p. 467–475, 2008.

Dubey, J.P; Jones, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal of Parasitology**. v. 38, p. 1257–1278, 2008.

DUBEY, J. P.; CORTÉS-VECINO, J. A.; VARGAS-DUARTE, J. J.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. M.; POLO, L. J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L. E.; KWOK, O. C. H.; SMITH, T.; SU, C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 45-50, 2007a.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C .H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 182-188, 2007b.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; PINEDA, N.; KYVSGAARD, N.C .; LUNA, L. A.; RIMBAUD, E.; OLIVEIRA, J. B.; KWOK, O. C. H.; QI, Y.; SU, C. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p .47-53, 2006a.

DUBEY, J. P.; SU, C.; CORTÉS, J. A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J. E.; POLO, L. J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L. E.; LORA, F.; JUMENEZ, J.; KWOK, O. C. H.;

SHEN, S. K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 42-47, 2006b.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; JONES, J. L.; HIGHTOWER, A. W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C. B.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States and risk assesment to consumers. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 5, p. 1082-1093, 2005.

Dubey, J. P. The scientific basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures. **Scientific background, clinical management and control**, Springer, Paris, p. 271-275, 2000.

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

DUBEY, J. P.; WEIGEL, R. M.; SEIGEL, A. M.; KITRON, U. D.; MANNELLI, A.; MITCHELL, M. A.; MATEUS-PINILLA, N. E.; THULLIEZ, P.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; TODD, K. S. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 736-741, 1995.

DUBEY, J. P; SPEER, C. A; FAYER, R. Sarcocystosis of Animals and Man. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, p. 102-104. 1989.

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

Dubey, J. P; Frenkel, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, v. 23, p. 537–546, 1976.

EDVINSSON, B.; LAPPALAINEN, M.; EVENGARD, B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 2, p. 131-136, 2006.

FAYER R. Sarcocystis spp. in human infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 894–902, 2004.

FAZAELI, A.; EBRAHIMZADEH, A. A new perspective on and re-assessment of SAG2 locus as the tool for genetic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates, **Parasitology Research**, v. 101, p. 99-104, 2007.

FERREIRA, A.M.; VITOR, R.W.A.; GAZZINELLI, R.T.; MELO, M.N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, p. 22-31, 2006.

FIALHO, C. G. e ARAÚJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da Grande Porto Alegre-RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 893-897, 2003.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N. A importância da parasitologia no atendimento às demandas em saúde pública. **Prática hospitalar**, n. 62, p. 62-65, Mar/Abr. 2009.

FUENTES, I.; RUBIO, J. M.; RAMÍREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1566-1570, 2001.

GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T.; MACHADO, R. Z.; SINHORINI, I. L. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into Iscom. **Experimental Parasitology**, v. 108, p. 40-46, 2004.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999.

GONDIM, L. F. P.; BARBOSA JÚNIOR, 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**, v. 82, n. 3, p. 273-276, 1999.

GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, p. 161–165, 2001.

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

HILL, D. E; SREEKUMAR C; GAMBLE, H. R.; DUBEY, J. P. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. **Journal of food Protection**, v. 67, p. 2230-2233. 2004.

HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma*

gondii, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 69-75, 2000.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

INNES E. A. A Brief History and Overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses Public Health**. v. 57, p. 1–7, 2010.

KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G. A.; CLIFFORD, D. B.; SIBLEY, L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 5881-5887, 2005.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1359-1370, 2008.

KOSKI, V. H. Evaluation of ELISA for the detection of *Toxoplasma* antibodies in swine sera. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 31, p. 413-422, 1990.

LEHMANN, T.; BLACKSTON, C. R.; PARMLEY, S. F.; REMINGTON, J. S.; DUBEY, J. P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 960-971, 2000.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; BRAUND, K. G. *Sarcocystis* spp and Sarcocystosis. **BAM**, v. 5, n. 3, p. 249-254, 1995.

LOPES, C. W. G., SÁ, W. F. DE; BOTELHO, G. G. Lesões em vacas mestiças gestantes, infectadas experimentalmente com *Sarcocystis cruzi* (Hasselman, 1923) Wenyon, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 79-83, 2005.

MACEDO, M. F.; MACEDO, C. A.; EWALD, M. P.; MARTINS, G. F.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A.; TARODA, A.; CARDIM, S. T.; SU, C.; GARCIA, J. L. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 21, n. 1, p. 74-7, 2012.

MAINAR-JAIME, R.C.; BARBERÁN, M. Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 122-129, 2007.

- McALLISTER, M. M. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of “subclinical” toxoplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p. 241–247, 2005.
- MENDONÇA, A. O.; DOMINGUES, P. F.; SILVA, A. V. D.; PEZERICO, S. B.; LANGONI, H. Detection of *Toxoplasma gondii* in swine sausages. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 59, p. 42–45. 2004.
- MILLAR, P. R.; DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; DE CARLI, A. L.; SOBREIRO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em trabalhadores de um matadouro de suínos e em indivíduos com outras atividades na cidade de Palmas, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 292-295, 2007.
- MILLAR, P. R.; DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; SOBREIRO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. *TOXOPLASMA gondii*: estudo soro-epidemiológico de suínos da região Sudoeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 15-18, jan. 2008a.
- 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**, v. 29, n. 3, p. 693-706, jul./set. 2008b.
- NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; PASSOS, J. *Toxoplasma gondii*: animais envolvidos em surto de toxoplasmose humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 516. 1994.
- OWEN, M. R.; TREES, A. J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 382-384, 1999.
- PENA, H. F.; OGASSAWARA, S.; SINHORINI, I. L. Occurrence of Cattle *Sarcocystis* species in raw kibbe from Arabian food establishments in the city of São Paulo, Brazil, and experimental transmission to humans. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1459–1465, 2001.
- PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561-569, 2008.
- PORTO, W. J. N.; RIBEIRO, T. C. E. S.; LEITE, A. S.; ALVES, L. C.; BARBOSA, C. L.; MOTA, R. A.; PEREIRA, G. C.; CARVALHO JÚNIOR, G. M. Frequência de suínos sororeagentes para *Toxoplasma gondii* na região metropolitana do Recife. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., Salvador, 1999. *Anais...* Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 219.

RUAS, J. L.; CUNHA, C. W.; SILVA, S. S. PREVALÊNCIA DE *Sarcocystis* spp. (LANKESTER, 1882) EM BOVINOS CLINICAMENTE SADIOS, DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 3, p. 227-230, 2001.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of American Medical Association**, v. 116, p. 801-807, 1941.

SOUZA, W. J. S. Epidemiologia da toxoplasmose: avaliação sorológica de suínos e trabalhadores em abatedouros na mesorregião do Grande Rio de Janeiro. Itaguaí, 1995. Tese de Doutorado em Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ. 143 p. 1995.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 841-848, 2006.

SWITAJ, K.; MASTER, A.; SKRZYPCZAK, M.; ZABOROWSKI, P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 170-176, 2005.

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

Triola, M.F., 2005. **Introdução à Estatística**. 9.ed. LTC: Rio de Janeiro.

TSUTSUI, V. S.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; VIEIRA, D. P.; MARANA, E. R. M.; PRUDÊNCIO, L. B.; NAVARRO, I. T. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 30-34, 2007.

TSUTSUI, V. S.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; FREITAS, J. C.; PRUDÊNCIO, L. B.; DELBEM, A. C. B.; MARANA, E. R. M. Soroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos no norte do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 27-34, 2003.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 1774 p.

VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; GIRALDI, N.; MITSUKA, R.; FREIRE, R. L. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p. 53-59, 1990.

YAI, L. E. O.; VIANNA, M. C. B.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R. L.; RICHTZENHAIN, L. J; GENNARI, S. M. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.227-234, 2003.

TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo #1

GENEROSO, D.; HAYASAKA, Ê. Y.; MENOZZI, B. D.; DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. 2013. Trabalho a ser enviado para a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABNT). **Detecção e caracterização molecular de amostras *Toxoplasma gondii* e outros Apicomplexa em quibes crus e em carnes suína e bovina comercializadas em Botucatu, SP, Brasil.**

1 **Detecção e caracterização molecular de amostras *Toxoplasma gondii* e**
2 **outros Apicomplexa em quibes crus e em carnes suína e bovina**
3 **comercializadas em Botucatu, SP, Brasil.**

4 **Detection and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* and others**
5 **Apicomplexa in raw kibbe and in pork and beef marketed in Botucatu, SP,**
6 **Brazil.**

7
8
9 Diego Generoso, Ênio Yoshinori Hayasaka, Benedito Donizeti Menozzi,
10 Rodrigo Costa da Silva, Helio Langoni*

11
12 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, UNESP Univ
13 Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária
14 e Saúde Pública, Botucatu, SP, Brazil.

15
16 * **Autor Correspondente:** Departamento de Higiene Veterinária e Saúde
17 Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade
18 Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior s/n, 18618-970 Botucatu,
19 SP, Brasil. Tel: +55 14 38802093. Fax: + 55 14 38802042. E-mail:
20 hlangoni@fmvz.unesp.br (H. Langoni)

22 **Resumo**

23 O presente estudo objetivou determinar a prevalência de *T. gondii* em produtos
24 cárneos comercializados na região de Botucatu, SP, Brasil. Foram analisados
25 141 cortes comerciais de carne suína (pernil, 49; 34,75%) e bovina (músculo
26 traseiro, 48; 34,04%), e de quibe cru (44; 31,21%) pelo bioensaio em
27 camundongos, e pesquisa do DNA do parasito pela reação em cadeia pela
28 polimerase (PCR) do gene repetitivo 200-300x no genoma, amplificando 526pb.
29 Todas as amostras foram negativas ao bioensaio. Das amostras positivas à
30 PCR, foram pesquisadas a carga parasitaria pela PCR quantitativa (qPCR) do
31 mesmo gene, utilizando-se sistema SYBR Green e genotipagem pela multiplex-
32 , nested- e RFLP- PCR utilizando 11 marcadores: SAG1, 5'-3'SAG2, alt.SAG2,
33 SAG3, B-TUB, GRA6, L358, c22-8, c29-6, PK1, Apico. Das amostras
34 estudadas, nove (6,38%) foram positivas à PCR, sendo cinco (55,56%)
35 bovinas, três (33,33%) suínas e uma (11,11%) de quibe, apresentando carga
36 parasitária com medianas variando de 0 a 390 parasitos.mL⁻¹. A genotipagem
37 foi possível em somente uma amostra que apresentou genótipo semelhante a
38 outros já identificados na literatura (MAS, TgCkBr89 e TgCkBr147).
39 Adicionalmente, nested- e RFLP-PCR do gene 18S ribossomal RNA (18S
40 rRNA), sequenciamento dos produtos da nested-PCR e alinhamento com a
41 base de dados do GenBank no NCBI foram realizados para todas as nove
42 amostras positivas para verificar a possibilidade de co-infecção com outros
43 protozoários Apicomplexa, resultando em 100% de homologia com *T. gondii*
44 em quatro amostras, sendo três suínas e um quibe (44,44%), *Sarcocystis*
45 *hominis* em duas amostras de bovinos (22,22%), *S. cruzi* em duas amostras de
46 bovinos (22,22%) e *S. hirsuta* em uma amostra de bovino (11,11%). Conclui-se
47 que *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. estão circulantes em produtos cárneos, com
48 especial atenção a *S. hominis* e *T. gondii*, visto seu caráter zoonótico.

49 **Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, produtos cárneos, segurança alimentar,
50 saúde pública, técnicas moleculares, genotipagem.

51

52

53 **1. Introdução**

54 *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório, causador
55 da toxoplasmose, uma zoonose mundialmente distribuída que infecta grande
56 variedade de hospedeiros homeotérmicos, inclusive o homem. Apresenta um
57 ciclo heteroxeno facultativo com muitos hospedeiros intermediários, sendo os
58 felídeos, os únicos hospedeiros definitivos. Os animais de produção,
59 hospedeiros intermediários, apresentam a formação de cistos teciduais
60 contendo bradizoítos causando perdas nos índices zootécnicos, com
61 desordens reprodutivas principalmente, e conseqüentemente perdas
62 econômicas. Possui considerável relevância em saúde pública pois há a
63 possibilidade de contaminação de alimentos de origem animal provenientes de
64 animais infectados, sendo ainda uma grave zoonose em pacientes com
65 doenças imunossupressoras (TENTER et al., 2000).

66 A manipulação de carne contaminada com cistos tanto pelos magarefes como
67 pelas pessoas que as preparam tem sido descrito como um fator de risco para
68 a infecção (MILLAR et al., 2007). A pesquisa do *T. gondii* em produtos cárneos
69 destinados ao consumo humano é de suma importância por ser uma via de
70 transmissão, e responsável por surtos de origem alimentar a partir da utilização
71 de produtos cárneos contaminados com cistos (FRANCO e BRANCO, 2009).

72 Os animais de produção apresentam evidências da ocorrência de infecção por
73 *T. gondii* por testes sorológicos e por isolamentos (KIJLSTRA e JONGERT,
74 2009). Macedo et al. (2012) analisaram soros de 60 fêmeas bovinas prenhes e
75 de seus fetos por imunofluorescência indireta e verificaram que 48,3% das
76 fêmeas e 3,7% dos fetos foram reagentes. No bioensaio 10% das fêmeas e
77 23,3% dos fetos foram positivos. Spagnol et al. (2009) em outro estudo
78 realizado em abatedouros do estado da Bahia, analisaram 600 soros de
79 bovinos por exames de imunofluorescência indireta e obtiveram prevalência de
80 11,83%. No estado do Paraná Daguer et al. (2004) analisaram 348 soros de
81 bovinos abatidos e obtiveram 41,4% de amostras reagentes. Rosa et al. (2011)
82 analisaram 353 amostras de suínos pela técnica da aglutinação direta e
83 obtiveram 30,4% de amostras reagentes, também por imunofluorescência
84 indireta. Da Silva et al. (2011) ao analisarem 602 amostras de ovinos abatidos
85 pela técnica de aglutinação direta e imunofluorescência indireta obtiveram
86 10,96% de amostras reagentes.

87 Partindo-se do conhecimento da participação de produtos cárneos na cadeia
88 de transmissão da toxoplasmose para humanos e a sua importância para a
89 saúde pública o presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência
90 da infecção por *T. gondii* e outros protozoários Apicomplexa em produtos
91 cárneos comercializados em estabelecimentos comerciais na região de
92 Botucatu, SP, Brasil.

93 **2. Material e Métodos**

94 *2.1. Amostragem*

95 Amostras de cortes de carne de suínos e bovinos, e de quibe cru foram adquiridas em
96 cinco estabelecimentos comerciais (açougues A, B, C e D, e um supermercado)
97 da região de Botucatu, SP (22°52'20"S; 48°26'37"O).

98 Utilizaram-se cortes cárneos das espécies suína (pernil) e bovina (músculo
99 traseiro), e quibe cru. As amostras foram coletadas mensalmente, durante 10
100 meses, num total de 141 amostras. A seguir dispõem-se a frequência de cortes
101 bovinos e suínos, e de quibes, respectivamente, em cada estabelecimento
102 [açougues A (9, 10, 9), B (10, 10, 9), C (9, 9, 6) e D (10, 10, 10), e
103 supermercado (10, 10, 10)], totalizando 48 amostras bovina, 49 suína e 44 de
104 quibes. Os materiais foram aliqüotados individualmente em sacos plásticos
105 estéreis, identificados e acondicionados em caixa isotérmica, sob temperatura
106 de refrigeração até o momento do processamento no laboratório. As coletas
107 mensais foram realizadas na tentativa de se aumentar a diversidade da origem
108 dos produtos cárneos comercializados pelos fornecedores aos
109 estabelecimentos comerciais na região. O presente estudo foi aprovado pela
110 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina
111 Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, SP, Processo
112 n.155/2010, em 10 de setembro de 2010.

113 *2.2. Bioensaio em camundongos*

114 As amostras foram pesadas e 50g foram separadas em oito fragmentos de
115 locais diferentes da peça de carne. As amostras foram trituradas
116 individualmente, e 10g de cada amostra foram utilizadas para o experimento. O
117 homogeneizado foi submetido à digestão ácida pela ação da pepsina, de
118 acordo com o protocolo descrito por Dubey (1998). Os animais foram mantidos
119 em observação por período de 60 dias, em caixas de propileno, em estante

120 ventilada ALESCO, modelo ALE99002-001, recebendo água e ração *ad libitum*.
121 Dos animais que sobreviveram ao período de observação, foi colhido o sangue
122 pela punção do seio retro-orbital e, após separação do soro, realizado a prova
123 sorológica de aglutinação direta modificada (MAT) para detecção de anticorpos
124 para *T. gondii*. Após, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara
125 saturada com vapor saturado de isoflurano, colhendo-se o cérebro para
126 realização da PCR. Foram consideradas positivas as amostras com PCR
127 positiva para *T. gondii* ou naqueles animais em que o resultado da MAT fosse
128 positivo (DUBEY e BEATTIE, 1988).

129 2.3. Exame de detecção de anticorpos

130 As amostras de sangue foram centrifugadas a 1600g por 10 minutos para
131 obtenção do soro sangüíneo, e imediatamente acondicionados em microtubos
132 plásticos devidamente identificados, e armazenados a -20°C até o momento de
133 execução da prova sorológica.

134 A pesquisa de anticorpos IgG para *T. gondii* foi realizada pelo método de
135 aglutinação direta modificado (MAT), utilizando-se antígeno inativado pela
136 formalina de acordo com Desmonts e Remington (1980). Foram utilizados
137 controles positivo e negativo, e considerado 16 o título de corte. Foi
138 considerado positivo o poço que apresentou formação de uma película
139 cobrindo pelo menos metade do fundo da cavidade, e negativo quando houve a
140 formação de “botão ou anel no fundo”.

141 2.4. Detecção de *T. gondii* pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) do 142 fragmento de 529pb

143 A extração e purificação de DNA das amostras teciduais foram realizadas
144 utilizando-se o kit de extração Illustra Tissue and cells genomic Prep Mini spin
145 kit (GE Healthcare, USA), com algumas adaptações, conforme instrução do
146 fabricante. A concentração e qualidade do DNA extraído foi determinada em
147 espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare, USA). A reação em cadeia pela
148 polimerase foi realizada de acordo com Homan et al (2000).

149 Todos os produtos de amplificação e de digestão foram visualizados por
150 eletroforese em gel de agarose 1,5, corado com brometo de etídio (0,3µL.mL⁻¹)
151 em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x, em sistema de fotodocumentação

152 digital, Sistema Gel-Doc-it (UVP, USA), com o programa VisionWorks (UVP,
153 USA).

154 2.5. PCR quantitativa (qPCR): determinação da carga parasitária

155 As amostras positivas na PCR foram submetidas a PCR quantitativa (qPCR).
156 Para a determinação da carga parasitária foram utilizados primers direcionados
157 para a região alvo descrita por Homan et al. (2000) e Edvinsson et al. (2006).
158 As reações foram processadas em termociclador StepOne Real-time PCR
159 (Applied Biosystems, USA).

160 2.6. Genotipagem

161 A genotipagem foi realizada utilizando-se 11 marcadores genéticos SAG1, 5'-
162 3'SAG2, alt-SAG2, SAG3, B-TUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico,
163 como descrito previamente (Su et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Dubey et al.,
164 2007a; Pena et al., 2008). O marcador CS3 foi incluído no presente estudo para
165 avaliar a virulência (Khan et al., 2005). Cepas referência (GT1, PTG, ME49,
166 CTG, M7741, TgCgCa1, MAS and TgCatBr5) foram utilizadas para o controle
167 das reações. As sequências do DNA alvo foram inicialmente amplificadas pela
168 multiplex-PCR utilizando-se primers externos para todos os marcadores,
169 seguido pela nested-PCR para os marcadores individualmente para
170 genotipagem (Su et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Dubey et al., 2007b; Pena et
171 al., 2008). Adicionalmente, a possibilidade de co-infecção com outro
172 protozoário parasito Apicomplexa foi determinada pela realização de multiplex-
173 nested-, e RFLP-PCR do gene 18S ribossomal RNA (18S rRNA) de acordo com
174 Da Silva et al. (2009) amplificando um produto esperado de 290pb para *S.*
175 *neurona*, *N. caninum*, *H. hammondi* and *T. gondii*, e de 310pb para outros
176 *Sarcocystis* spp. Controle positivo para *S. tenella*, *S. neurona*, *T. gondii*, *H.*
177 *hammondi* e *N. caninum* foram utilizados.

178 Todos os produtos de amplificação e de digestão foram visualizados por
179 eletroforese em gel de agarose 2.5 ou 3%, dependendo do marcador, corado
180 com brometo de etídio, e visualizado utilizando sistema
181 de fotodocumentação digital, Sistema Gel-Doc-it.

182 2.7. Sequenciamento

183 Os produtos da PCR para os primers TOX4 e TOX5, e da nested-PCR no gene
184 18S rRNA foram purificados utilizando-se o kit de purificação Centrifugal Filter

185 Units, MRCF0R030 (Millipore, USA) ou ExoStar1-Step, US77705 (GE
186 Healthcare, USA) e a seguir o DNA foi quantificado por espectrofotometria,
187 utilizando-se o espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare, USA), e
188 eletroforese em gel de agarose.

189 O sequenciamento direto dos produtos da nested-PCR foram realizados nos
190 laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade
191 Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, SP. As reações de
192 sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático Applied
193 Biosystems 3100 (Applied Biosystems, USA) empregando-se o ABI BigDye kit
194 e GE DYEnamic ET terminator kit (GE Healthcare, USA) e analisadas pelo
195 software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. As
196 seqüências sense e antisense obtidas foram alinhadas e visualizadas em
197 software BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0, na forma de
198 eletroferograma, submetidas ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)
199 e comparadas com as seqüências depositadas nos bancos de dados.

200 *2.8. Análise estatística*

201 Todos os dados foram tabulados em planilha Excel. Foi realizado o teste de
202 Fischer para analisar a associação entre as variáveis tipo de material (carnes
203 bovinas, suínas e quibe), resultados de PCR, origem da amostra e data de
204 coleta. Para as análises considerou-se nível de significância de 5% (TRIOLA,
205 2005).

206 **3. Resultados**

207 *3.1. Bioensaio em camundongos e MAT-AF*

208 Todos os animais que sobreviveram ao período de observação apresentaram-
209 se negativos ao bioensaio e sorologia, revelando resultados positivos somente
210 às amostras de soro controle positivas.

211 *3.2. Procedimentos de biologia molecular*

212 Foram realizados 182 exames de PCR, sendo 141 (77,47%) das amostras de
213 produtos carneos e 41 (22,53%) de camundongos que foram inoculados com
214 material positivo. Das amostras de produtos cárneos nove (6,38%; IC95% 3,43-
215 11,69%) foram positivas, sendo cinco (55,56%; IC95% 26,24-81,29%) de carne
216 bovina, três (33,33%; IC95% 12,16-65,25%) de carne suína e uma (11,11%;

217 IC95% 2,52-44,50%) amostra de quibe. Não houve diferença estatística entre
218 os resultados da PCR para os diferentes tipos de amostras.

219 Todas as amostras provenientes de camundongos inoculados com material
220 positivo à PCR foram negativas. Das amostras positivas à PCR sete (77,78%;
221 IC95% 44,39-93,33%) eram provenientes de açougues e duas (22,22%; IC95%
222 6,67-55,61%) de supermercado. A distribuição das amostras positivas à PCR
223 segundo sua procedência foi, entre os açougues, três (42,86%; IC95% 15,70-
224 75,51%) do açougue A e três (42,86%; IC95% 15,70-75,51%) do açougue C e
225 uma (14,29%; IC95% 3,19-52,65%) do açougue B. No açougue A, duas
226 amostras eram de bovinos e uma de suíno. No açougue C, uma amostra de
227 cada produto cárneo foi positiva, e no açougue B somente uma amostra de
228 bovino. No açougue D nenhuma amostra foi positiva. Das duas amostras
229 positivas de supermercados, uma era proveniente de bovino e outra de suíno
230 **(Tabela 1)**.

231 Não houve diferença estatística entre a origem do material e os resultados de
232 PCR.

233 A quantificação da carga parasitária revelou resultados variáveis com 0, 16,
234 170 parasitos.g⁻¹ em amostras de suínos, e 390 em quibe **(Tabela 2)**.

235 Das nove amostras positivas a PCR e submetidas a genotipagem, somente
236 uma amostra (11,11%; IC95% 2,52-44,50%) apresentou padrão completo como
237 *T. gondii* **(Tabela 3)**, obtendo-se similaridade com as amostras MAS (SU et al.,
238 2006), TgCkBr89 e TgCkBr147 (DUBEY et al., 2008).

239 Adicionalmente, realizou-se a multiplex-, nested- e RFLP-PCR para o gene 18S
240 rRNA. Quatro (44,44%; IC95 18,71-73,76%) amostras (amostras 51, 107, 116 e
241 119) apresentaram produtos de 290pb da nested-PCR, sugestivo de *T. gondii*,

242 Tabela 1. Frequência dos resultados da pesquisa de DNA para *T. gondii* pela PCR a partir de carnes bovina e suína, e de quibe comercializados na região de Botucatu, SP, assim como sua origem.
 243 Botucatu, SP, 2011 – 2013.

Origem	N (%)	PCR positivo		
		n	FR (Estabelecimentos); IC95%	FR (total); IC95%
Açougue A	29 (20,57)	3	10,35 (3,76-26,53)	33,33 (12,16-65,25)
Açougue B	30 (21,28)	1	3,33 (0,79-16,70)	11,11 (2,52-44,50)
Açougue C	30 (21,28)	3	10,00 (3,63-25,75)	33,33 (12,16-65,25)
Açougue D	24 (17,02)	0	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)
Supermercado	28 (19,85)	2	7,14 (2,19-22,77)	22,22 (6,67-55,61)
Total	141 (100)	9	6,38 (3,43-11,69)	100 (-)

244 N: número de amostra para cada estabelecimento; n: número de amostras com resultados positivo à PCR; %: porcentagem; IC95%: intervalo de confiança de 95%.

245 Tabela 2. Caracterização genotípica de *Toxoplasma gondii* de amostra de quibe comercializado na cidade de Botucatu, SP, positivo à PCR. Botucatu, SP, 2011 – 2013.

Registro	Amostra	Sobrevida (dias)*	Marcadores Genéticos											Genótipo	Referência		
			SAG1	5'-3'SAG2	alt-SAG2	SAG3	Btub	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico			CS3	
																MAS	Su et al. (2006)
51	Quibe	60	nd	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	nd	TgCkBr89	Dubey et al. (2008)	
															TgCkBr147	Dubey et al. (2008)	

246 *Período de observação dos camundongos = 60 dias p.i.; nd: sem dado

247
248

Tabela 3. Resultados das provas de biologia molecular dos amplicons das nove amostras de produtos cárneos submetidos à pesquisa molecular pela PCR e qPCR, e do gene 18S rRNA do parasito pela nested-PCR, RFLP-PCR e sequenciamento. Botucatu, SP, 2011 – 2013.

Registro	Amostra	Origem	Gene repetitivo 529pb		Gene 18S rRNA				
			PCR	qPCR (parasitos.g ⁻¹)	Nested-PCR (tamanho)	RFLP-PCR	Sequenciamento		
							Número de acesso (GenBank)	Identidade	Agente
51	quibe	Açougue C	Positivo	390	~290pb	<i>T. gondii</i>	L37415.1	100%	<i>T. gondii</i>
100	bovino	Açougue A	Positivo	15	~310pb	ND	AF176934.1	100%	<i>S. cruzi</i>
106	bovino	Supermercado	Positivo	8	~310pb	ND	AF006469.1	100%	<i>S. hirsuta</i>
107	suíno	Supermercado	Positivo	16	~290pb	<i>T. gondii</i>	L37415.1	100%	<i>T. gondii</i>
112	bovino	Açougue B	Positivo	10	~310pb	ND	AF176934.1	100%	<i>S. cruzi</i>
115	bovino	Açougue C	Positivo	NR	~310pb	<i>S. hominis</i>	AF006471.1	100%	<i>S. hominis</i>
116	suíno	Açougue C	Positivo	170	~290pb	<i>T. gondii</i>	L37415.1	100%	<i>T. gondii</i>
118	bovino	Açougue A	Positivo	6	~310pb	<i>S. hominis</i>	AF006471.1	99%	<i>S. hominis</i>
119	suíno	Açougue A	Positivo	0	~290pb	<i>T. gondii</i>	L37415.1	100%	<i>T. gondii</i>

249
250
251

pb: pares de bases; NR: não realizado; ND: resultado não determinado
L37415.1: *T. gondii* 18S ribosomal RNA gene, complete sequence; AF176934.1: *S. cruzi* strain 12hcr60 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF006469.1: *S. hirsuta* 18S ribosomal RNA gene, complete sequence; AF006471.1: *S. hominis* 18S ribosomal RNA gene, complete sequence.

252 enquanto cinco (55,56%; IC95% 26,24%-81,29%) apresentaram um produto
253 único (~310pb), com padrão de PCR-RFLP não esperado, sendo que duas
254 amostras (amostras 115 e 118) apresentaram padrão de corte semelhante a *S.*
255 *hominis*, e as demais com padrão não esperado e não semelhante a padrões
256 de referências conhecidos.

257 Os produtos da nested-PCR para o gene 18S rRNA de todas as amostras
258 foram sequenciadas e assim caracterizadas: quatro (44,44%; IC95 18,71-
259 73,76%) como *T. gondii* (número de acesso do GenBank L37415.1), duas
260 (22,22%; IC95% 6,67-55,61) como *S. cruzi* (número de acesso do GenBank
261 AF176934.1), uma (11,11%; IC95% 2,52-44,50%) como *S. hirsuta* (número de
262 acesso do GenBank AF006469.1) e duas (22,22%; IC95% 6,67-55,61) como *S.*
263 *hominis* (número de acesso do GenBank AF006471.1) **(Tabela 3)**.

264 **4. Discussão**

265 Os produtos cárneos “in natura” e aqueles derivados de carnes bovina e suína,
266 são importantes fontes proteicas para humanos. Os animais de produção tem
267 um papel fundamental na dispersão da infecção por *T. gondii*, albergando a
268 forma bradizoítica do agente, e sendo uma das possíveis vias de transmissão
269 para humanos. A pesquisa de agentes zoonóticos em carnes destinadas ao
270 consumo humano é de grande importância, por representar risco à saúde
271 pública (FRANCO e BRANCO, 2009).

272 A formação de cistos teciduais é variável entre os animais e está relacionada
273 ao organotropismo que o parasito apresenta (Dubey e Jones, 2008). Os cistos
274 presentes nas carcaças e produtos cárneos ficam viáveis e infectantes por
275 tempo variável. Porém, o isolamento pelo bioensaio em camundongos fica na
276 dependência da dose infectante mínima, virulência e ausência de agentes que
277 destroem o parasito (Mendonça et al., 2004).

278 Com base nos resultados positivos da PCR e negativos ao bioensaio, tem-se
279 que o material inoculado apresentava o DNA do parasito, porém sua viabilidade
280 estava comprometida. Ao se estudar produtos cárneos comercializados, devem
281 ser considerados o tempo e estado de conservação das carnes pesquisadas.
282 Sabe-se que o congelamento faz com que ocorra a inativação de bradizoítos.
283 De acordo com Bayarri et al. (2012), o congelamento é suficiente para inativar
284 taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii*.

285 Mendonça et al. (2004) observaram a presença de DNA de *T. gondii* em 70
286 amostras de linguças vendidas em estabelecimentos comerciais.
287 Corroborando com o presente estudo, todas as amostras foram negativas ao
288 bioensaio em camundongos, porém com 33 (47,14%; IC95% 35,88-58,71%)
289 amostras positivas à PCR.

290 A pesquisa de *T. gondii* na carne é importante para se avaliar a cadeia de
291 transmissão deste protozoário, e o quibe cru é um produto que pode ser
292 consumido “in natura”, representando um grande risco aos consumidores uma
293 vez que a carne utilizada em seu preparo pode ser de várias espécies,
294 principalmente ovina, com importância na ocorrência de vários surtos de
295 origem alimentar envolvendo produtos cárneos (NAVARRO et al., 1994; COOK
296 et al., 2000; KIJLSTRA e JONGERT, 2008).

297 O parasito foi detectado em amostras de suínos e quibe, corroborando com
298 Tenter et al., (2000). Os suínos e os ovinos estão entre os mais importantes na
299 cadeia de transmissão da toxoplasmose, principalmente por produtos cárneos
300 (TENTER et al., 2000), e o quibe por se tratar de um alimento produzido com
301 carne ovina principalmente, além de outras (Da SILVA et al., 2003).

302 Os valores de duas amostras, que foram confirmadas como sendo *T. gondii* por
303 sequenciamento e genotipagem, foram superiores a 100 (uma com 170 e outra
304 com 390 parasitos por mL), uma amostra ficou abaixo de 100 (16 parasitos por
305 mL) e uma apresentou resultado de zero (negativo).

306 Em relação aos produtos cárneos bovinos, verificou-se a presença de
307 *Sarcocystis* spp. Três espécies distintas foram identificadas ao
308 sequenciamento, dentre elas *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*. Este resultado
309 mostra a relevância da carne bovina para a saúde pública, pois *S. hominis*
310 apresenta caráter zoonótico. Bovinos são sabidamente hospedeiros
311 intermediários de *Sarcocystis* sp. (CARLTON e MCGAVIN, 2005). Três
312 espécies já foram descritas em bovinos: *S. cruzi*, *S. hominis* e *S. hirsuta*
313 (LINDSAY et al., 1995). Seu diagnóstico é realizado ao exame de inspeção da
314 carne em abatedouros onde se observa, macroscopicamente, a presença de
315 sarcocistos na musculatura (FORTES, 2004).

316 A genotipagem empregando 11 marcadores genotípicos tem sido empregada
317 mundialmente para a detecção de *T. gondii*. Na América do Sul os relatos são

318 de que existe uma alta variabilidade genotípica, com o emprego da técnica e
319 utilizando-se estes marcadores se consegue caracterizar *T. gondii* (DA SILVA
320 et al., 2009). Vários autores confirmam a alta diversidade genética do parasito
321 na América do Sul sendo isolado de diversas espécies animais como cabras no
322 Ceará, Brasil (CAVALCANTE et al., 2007), em cães (DUBEY et al., 2007a) e
323 gatos, na Colômbia (DUBEY et al., 2006b), e em frangos na Nicarágua
324 (DUBEY et al., 2006a) e no Brasil (DUBEY et al., 2007b). Em Botucatu-SP,
325 Brasil, já foram parcialmente caracterizadas amostras de *T. gondii* em
326 linguças, por provas moleculares (Da SILVA et al., 2005).

327 O sequenciamento identificou uma amostra de *T. gondii*, classificada como
328 uma linhagem atípica e previamente descrita na literatura por Grigg et al.
329 (2001). A referida amostra era proveniente de um paciente humano na França,
330 e foi classificada como virulenta. Esta amostra foi semelhante a amostras
331 descritas por Dubey et al. (2008), denominadas TgCkBr89 e TgCkBr147.

332 Outras amostras positivas ao exame de PCR não apresentaram padrões de
333 cortes na RFLP-PCR, o que sugere baixa quantidade de material genético do
334 agente. Estudos envolvendo o encontro de novos genótipos devem ser
335 encorajados para se entender a dinâmica de distribuição dos genótipos
336 clássicos e atípicos de *T. gondii*, contribuindo com a epidemiologia dinâmica da
337 toxoplasmose, especialmente no que se refere à epidemiologia molecular.

338 É evidente que para a profilaxia da toxoplasmose há outras medidas
339 relacionadas à cadeia epidemiológica de transmissão desta zoonose, como por
340 exemplo, os cuidados que devem ser considerados com relação aos
341 hospedeiros definitivos, como os felídeos, e, principalmente, no que refere ao
342 gato doméstico, elo importante nesta cadeia de transmissão por eliminar
343 oocistos pelas fezes, que contribuem de forma significativa para a
344 disseminação e manutenção da infecção entre humanos e animais.

345 **5. Conclusões**

346 Assim, a presente pesquisa revelou a circulação de *T. gondii* e de *Sarcocystis*
347 spp. em produtos cárneos comercializados no comércio de Botucatu-SP. As
348 carnes de suínos e quibe apresentaram *T. gondii* e as carnes de bovinos *S.*
349 *cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*.

350

351 **Agradecimentos**

352 Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
353 Tecnológico (CNPQ) pelo financiamento de auxílio pesquisa Processo
354 n.559471/2010-6 e a CAPES-DS pela bolsa de mestrado.

355

356 **Referências Bibliográficas**

357 CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. Patologia Veterinária Especial. 2ed. Porto
358 Alegre: Artmed, 440 p., 2005.

359 CAVALCANTE, A.C.R.; FERREIRA, A.M.; MELO, M.N. et al. Virulence and
360 molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará,
361 Brazil. Small Ruminan. Res., v.69, p.79-82, 2007.

362 COOK, A.J.C.; GILBERT, R.E.; BUFFOLANO, W. et al. Sources of *Toxoplasma*
363 infection in pregnant women: European multicenter case-control study.
364 European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. Brit. Med. J., v.321,
365 p.142-147, 2000.

366 DA SILVA, A.V.; CUNHA, E.L.P.; LANGONI, H. et al. Toxoplasmose em ovinos
367 e caprinos: Estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de
368 Pernambuco, Brasil. Ciênc. Rural, v.33, p.115-119, 2003.

369 DA SILVA, A.V.; MENDONÇA, A.O.; PEZERICO, S.B. et al. Genotyping of
370 *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. Parasitol.
371 Latinoamericana, v.60, p.65-68, 2005.

372 DA SILVA, R.C.; SU, C.; LANGONI, H. First identification of *Sarcocystis tenella*
373 (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally
374 infected sheep from Brazil. Vet. Parasitol., v.165, p.332-336, 2009.

375 DA SILVA, R.C.; LANGONI, H.; SU, C.; DA SILVA, A.V. Genotypic
376 characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses:
377 new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. Vet. Parasitol.,
378 v.1, p.173-177, 2011.

379 DAGUER, H.; VICENTE, R.T.; COSTA, T.; et al. Soroprevalência de anticorpos
380 anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da
381 microregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. Ciênc. Rural, v.34, p.1133-1137,
382 2004.

383 DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of
384 *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. J. Clin.
385 Microbiol., v.11, p.562-568, 1980.

386 DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals
387 in the United States. Int. J. Parasitol., v.38, p.1257–1278, 2008.

388 DUBEY, J.P.; VELMURUGAN, G.V.; CHOCKALINGAM, A. et al. Genetic
389 diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. Vet Parasitol.,
390 v.157, p.299-305, 2008.

391 DUBEY, J.P.; CORTÉS-VECINO, J.A.; VARGAS-DUARTE, J.J. et al.
392 Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and
393 genetic characterization of *T. gondii* isolates. Vet. Parasitol., v.145, p.45-50,
394 2007a.

395 DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M. et al. Biologic and genetic
396 comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the
397 northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed
398 highly diverse and distinct parasite populations. Vet. Parasitol., v.143, p.182-
399 188, 2007b.

400 DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; PINEDA, N. et al. Biologic and genetic
401 characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from
402 Nicaragua, Central America. Vet. Parasitol., v.142, p.47-53, 2006a.

403 DUBEY, J.P.; SU, C.; CORTÉS, J.A. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in
404 cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii*
405 isolates. Vet. Parasitol., v.141, p.42-47, 2006b.

406 DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of
407 *Toxoplasma gondii* from infected tissues. Vet. Parasitol., v.74, p.75-77, 1998.

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

410 EDVINSSON, B.; LAPPALAINEN, M.; EVENGARD, B. Real-time PCR targeting
411 a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clin. Microbiol. Inf.,
412 v.12, p.131-136, 2006.

413 FERREIRA, A.M.; VITOR, R.W.A.; GAZZINELLI, R.T.; MELO, M.N. Genetic
414 analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by
415 multilocus PCR-RFLP. Inf. Genet. Evol., v.6, p.22-31, 2006.

416 Fortes, E. Parasitologia Veterinária. 4.ed. São Paulo: Cone, 137p. 2004.

417 FRANCO, R.M.B.; BRANCO, N. A importância da parasitologia no atendimento
418 às demandas em saúde pública. Pratica Hospitalar, v.62, p.62-65, 2009.

419 GRIGG, M.E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A.B. et al. Success and virulence in
420 *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct
421 ancestries. Science, v.294, p.161-165, 2001.

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

426 KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis
427 transmitted by meat. Int. J. Parasitol., v.38, p.1359-1370, 2008.

428 KIJLSTRA, A; JONGERT, E. *Toxoplasma*-safe meat: close to reality? Trends
429 Parasitol., v.25, p.18-22, 2009.

430 LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; BRAUND, K.G. *Sarcocystis* spp. and
431 Sarcocystosis. Eur. J. Trans. Myol. Bas. App. Myol., v.5, p.249-254, 1995.

432 MACEDO, M.F.S.B.; MACEDO, C.A.B.; EWALD, M.P.C. et al. Isolation and
433 genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*)
434 slaughtered. Rev. Bras. Parasitol. Vet., v.21, p.74-77, 2012.

435 MENDONÇA, A.O.; DOMINGUES, P.F.; DA SILVA, A.V.D. et al. Detection of
436 *Toxoplasma gondii* in swine sausages. Parasitol. Latinoame., v.59, p.42-45,
437 2004.

438 MILLAR, P.R.; DAGUER, H.; VICENTE, R.T. et al. Soroprevalência de
439 anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em trabalhadores de um matadouro de
440 suínos e em indivíduos com outras atividades na cidade de Palmas, Paraná,
441 Brasil. Ciênc. Rural, 37(1), 292-295, 2007.

442 NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; PASSOS, J. *Toxoplasma gondii*: animais
443 envolvidos em surto de toxoplasmose humana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,
444 v.27, p.516, 1994.

445 PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Population structure and
446 mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int. J. Parasitol., v.38, p.561-
447 569, 2008.

- 448 ROSA, R.C., MATTEI, R.J., DA SILVA, R.C. et al. Anticorpos anti-*Toxoplasma*
449 *gondii* em suínos criados em granjas de elevado e baixo padrão sanitário no
450 noroeste do Paraná. Rev. Acad. Ciênc. Agrárias e Amb., v.9, p.435-437, 2011.
- 451 SPAGNOL, F.H.; PARANHOS, E.B.; OLIVEIRA, L.L.S. et al. Prevalência de
452 anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos em matadouros do
453 estado da Bahia, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 18(2), 42-45, 2009.
- 454 SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by
455 multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for
456 identification of parasites. Int. J. Parasitol., v.36, p.841-848, 2006.
- 457 TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from
458 animals to humans. Int. J. Parasitol., 30, 1217-1258, 2000.
- 459 TRIOLA, M.F. Introdução à Estatística. 9.ed. LTC: Rio de Janeiro. 682p. 2005.