



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Suzane Manzini

Análise Espacial e Pesquisa Molecular de *Toxoplasma gondii* em Amostras de Leite Bovino de Tanque de Expansão Procedentes de Pequenas Propriedades de Agricultura Familiar

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientadora: Profa. Dra. Virginia Bodelão Richini Pereira e Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

**Botucatu
2022**

Suzane Manzini

**ANÁLISE ESPACIAL E PESQUISA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii*
EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO DE TANQUE DE EXPANSÃO
PROCEDENTES DE PEQUENAS PROPRIEDADES DE AGRICULTURA
FAMILIAR**

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus
de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Doenças
Tropicais.**

**Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientadora: Profa. Dra. Virginia Bodelão Richini Pereira e Dra. Maria
Izabel Merino de Medeiros**

**Botucatu
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Manzini, Suzane.

Análise espacial e pesquisa molecular de toxoplasma gondii em amostras de leite bovino de tanque de expansão procedentes de pequenas propriedades de agricultura familiar / Suzane Manzini. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Simone Baldini Lucheis
Coorientador: Maria Izabel Merino de Medeiros
Coorientador: Virginia Bodelão Richini Pereira
Capes: 40101096

1. Bovino de leite. 2. Toxoplasmose em animais - Diagnóstico. 3. Leite. 4. Zoonoses. 5. Saúde única.

Palavras-chave: Diagnóstico; Leite; One Health; Toxoplasmose; Zoonose.

Suzane Manzini

**ANÁLISE ESPACIAL E PESQUISA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii*
EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO DE TANQUE DE EXPANSÃO
PROCEDENTES DE PEQUENAS PROPRIEDADES DE AGRICULTURA
FAMILIAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Comissão examinadora

Profa. Dra Renata Bonini Pardo, FATEC Marília

Prof. Dr Hélio Langoni, UNESP Botucatu

Botucatu, 27 de maio de 2022

Dedicatória

Aos meus pais, Heloiza e Donisete,

Pelo amor incondicional a mim dedicado, pelas conversas, por todo apoio e compreensão. Por terem me dado a chance de estudar, por permitirem seguir meu sonho e mostrar que sempre tenho um lugar para qual retornar se preciso for.

Ao meu irmão Vinicius,

Por ficar sempre ao meu lado, me apoiar e me encorajar. Pelas nossas aventuras, conversas construtivas sobre seguir sempre em frente não importa as dificuldades e que acreditar em si é o primeiro passo.

Agradecimento especial

Agradeço à **Deus**, pois sei que sem Ele minha trajetória de vida não teria sido possível. Pela proteção que deu durante toda minha vida para poder realizar este sonho diante de vários alcançados e dos demais que ainda estão por vir. Por sempre estar comigo nos pequenos detalhes da vida. Por me fortalecer nos momentos de dificuldades e por toda sabedoria alcançada. Por toda evolução pessoal, espiritual e profissional. Sem Deus nada seria possível!

Aos meus pais, **Heloiza e Donisete**! Vocês são os tesouros mais preciosos que tenho em minha vida, a razão do meu viver. Os melhores pais do mundo!! Agradeço também, ao meu irmão, **Vinicius**, por todo companheirismo. Eu os amo e admiro muito. Obrigada por me permitirem realizar este sonho e conquistar tudo que consegui durante essa jornada. A vocês, minha eterna gratidão!

À Doutora **Simone Baldini Lucheis** que confiou e acreditou em mim desde à iniciação científica. Por ter me dado apoio e ter tido paciência comigo desde o início. Por todo conhecimento científico, pelas conversas sérias, incentivadoras e também pelas conversas descontraídas. Por todo crescimento profissional e pessoal. Por sempre nos defender diante as dificuldades. Por me mostrar que uma orientadora pode desempenhar sua função com extrema competência e ética sem deixar de compartilhar momentos de ócio. Mais que uma orientadora, tenho-te como exemplo. Obrigada!

Agradecimentos

À minha coorientadora **Maria Isabel Merino de Medeiros**, a Bel, por me acompanhar desde a minha Iniciação Científica. Por confiar em mim e me encorajar neste mundo acadêmico. Por todos cookies, cafés da tarde e encontros do LASAB antes da pandemia. Por todo cuidado conosco no APTA mesmo no período de alta da Covid-19. Além de conhecimento, me ensinou valiosas lições de vida, sempre mostrando uma generosidade imensurável. Tenho um sentimento de admiração e gratidão eterno por você.

À minha coorientadora **Virginia Bodelão Richini Pereira**, por todo ensinamento de biologia molecular. Por ter nos recebido tão bem no Instituto Adolfo Lutz e nos ajudado em épocas aonde tudo dava errado com os reagentes no laboratório. Meus sinceros agradecimentos.

À minha amiga da Pós Graduação **Nássarah Jabur Lot Rodrigues**, por toda conversa, parceria e ensinamentos. Por todo apoio, por ser a luz no meu fim do túnel em diversos momentos. Sem sua amizade nada seria possível. Presente de Deus e da Pós para a vida. Grata pela nossa amizade!

A minha amiga da graduação **Giovanna Rodrigues de Oliveira**, por todo companheirismo, conselhos, broncas. Por todo apoio, carinho e ajuda. Por todas as conversas sérias e divertidas, por todas as danças. Presente de Deus e da graduação para a vida. Grata pela nossa amizade!

À minha irmã de alma **Bárbara Carvalho Neves**, por estar comigo a mais de 15 anos. Por todo apoio pessoal e profissional. Por ser minha inspiração de mulher jovem determinada, guerreira e que nunca desiste dos seus sonhos. Por todo companheirismo, troca de experiências, por me guiar em diversos momentos da minha vida e por acreditar em mim. Por mesmo de longe se fazer tão presente. Pela nossa sintonia. Grata por tudo!

Ao **Nicholas Eshiji Miazaki**, por sempre me incentivar e por estar ao meu lado. Pela paciência e pelo carinho. Por acreditar em mim quando nem mesmo acreditava. Por ser meu ponto de paz e calma durante esses anos. Por todos momentos vividos. Pelos ensinamentos e amadurecimento. Não seria a pessoa que sou hoje sem você na minha vida. Grata por todo respeito e companheirismo!

Aos **meus amigos** que me acompanham desde sempre, por toda conversa, encontros que trouxeram leveza no caminhar da minha vida. Vocês fazem parte da pessoa que me tornei e me torno a cada dia. Obrigada por tudo! Ao **Wesley**, por ter me auxiliado desde o primeiro e-mail que enviei com interesse em entrar no LASAB. Por ter me recebido tão bem no laboratório, por todo conhecimento passado, por todas conversas, por ficar horas procurando doces e não pedir nada, pelas risadas, jogos, cafés da tarde, amigos secretos. Grata por tudo!

À **Livia Maísa Guiraldi**, por todo acolhimento quando entrei no LASAB, por todas conversas, por todo conhecimento, apoio, cafézinhos, crossfut, encontro de jogos, amigos secretos. Obrigada por ser tão humana, gentil,

bondosa, com coração gigante. Grata por tudo!

À **Isabella Neves Aires**, pelas conversas, troca de experiência, noite de jogos, amigos secretos e demais momentos compartilhados desde a Iniciação. Todo sucesso do mundo a você. Minha eterna gratidão e admiração!

À **Nur**, pelas conversas, todos ensinamentos e conhecimentos principalmente com a cultura libanesa no pouco período de tempo que tivemos. Obrigada!

À **Diana Zapparoli**, por todos momentos de conversas e sorrisos compartilhados. Por todos docinhos pós almoço. Obrigada!

À **Thainá Valente Bertozzo**, por toda conversa, apoio, por estar comigo na fase mais doida do laboratório. Pelo respeito e compreensão nos meus dias não muito bons. Pelos momentos de descontração. Continue essa pessoa e profissional incrível. O mundo é pequeno para você! Grata por tudo!

À **Jackieline Sampaio Steinle**, por todas conversas, pela espontaneidade, por agitar o LASAB e pelo análise espacial. Grata por tudo!

À **Marcela Alexandrino**, pelas conversas, risadas e por toda ajuda. Obrigada por acrescentar no meu dia a dia, você é incrível!

À **Maria Eduarda Cavaleiro**, pelas conversas, risadas, ideias, apoio, cafés e balas. Por toda ajuda no LASAB. Você é uma pessoa incrível! Obrigada!

À **Amanda Bezerra Bertolini**, por me ensinar biologia molecular quando entrei no LASAB na Iniciação Científica. Por ceder suas amostras do mestrado para a realização do meu mestrado. Por toda ajuda com artigos. Eterna gratidão!

À **Natássia** do Instituto Adolfo Lutz, por nos ceder seu tempo e conhecimento para nos ajudar em um momento crítico do laboratório. Obrigada por todas as conversas e momentos que compartilhamos!

Ao prof. Dr. **Rinaldo Aparecido Mota** e **Renata Pimentel Bandeira de Melo** da UFRPE, pela parceria conosco, pela ideia de complementar este trabalho com um novo primer. Pelo sequenciamento. Pela troca de conhecimento. Meus sinceros agradecimentos!

À toda equipe da **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Apta** de Bauru pelos dias de companheirismo e convivência. Pelas confraternizações de aniversários, pelas risadas compartilhadas, muito obrigada!

Ao **Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ-UNESP- Botucatu**, pela concessão da cepa RH de *Toxoplasma gondii*;

À **Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB – UNESP**, pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais.

À todos os **membros da banca examinadora**, titulares e suplentes, os quais foram escolhidos à dedo para este momento especial em minha vida! Agradeço por compartilharem todo o conhecimento de vocês!

À Seção Técnica de Pós Graduação em especial à **Bruna Quirino** e a **Tatiane de Fátima Pineiz**, por todo auxílio antes mesmo de ingressar na FMB e durante esses dois anos.

À **biblioteca** do campus pelo suporte técnico.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxílio financeiro concedido.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo Auxílio a Pesquisa Regular – processo 2020/09409-2, o qual contribuiu para a compra de reagentes.

Ao **núcleo de apoio à pesquisa** da UNESP, ao professor **José Eduardo e Lídia Raquel de Carvalho** pelo apoio estatístico.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho e na minha vida, meu muito obrigada!



“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.” – Chico Xavier.

“Quando você está junto de gigantes, naturalmente, você engrandece. E um dos melhores investimentos que você pode fazer, como pessoa, é desenvolver um ambiente com pessoas fora de série. Pessoas que agregam valor e estão em harmonia em prol de um objetivo comum.” - Thiago Nigro.

“O importante é não parar de questionar.” - Albert Einstein.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.” - Marie Curie.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.” - Isaac Newton

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença.” - Benjamin Franklin.

RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Apresenta relevância na saúde animal e humana devido os felídeos serem os únicos hospedeiros definitivos, e os humanos e outras espécies animais serem hospedeiros intermediários. No humano, a infecção é comum e a manifestação clínica tem maior importância em pessoas imunossuprimidas e na transmissão transplacentária. O consumo do leite cru ou não pasteurizado é considerado um fator de risco e possível via de transmissão de taquizoítos, como pode ser verificado em alguns estudos no leite caprino; entretanto, no leite bovino, há poucos estudos acerca da presença de *T. gondii* no leite dessa espécie. Desta forma, este estudo teve como objetivo pesquisar pela técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) e Nested PCR a presença de *T. gondii* em amostras de leite bovino de 102 tanques de expansão, coletadas de pequenas propriedades de agricultura familiar em oito municípios da região Centro-Oeste Paulista. A cPCR foi realizada com os *primers* TOX4/TOX5 e a Nested PCR foram realizadas com os *primers* TgNP1/TgNP2 e Tg18s48F/Tg18s359R. Como resultado, foi possível detectar DNA de *T. gondii* em 19 amostras (18,63%). Para os *primers* TOX4 e TOX5, cinco amostras foram positivas (4,90%) e para os *primers* TgNP1/TgNP2, treze (12,74%) amostras foram positivas. Para o Filo Apicomplexa, com os *primers* Tg18s48F/Tg18s359R, uma (01) amostra foi positiva (0,98%), confirmando-se tratar-se de *T. gondii*, com 100% de similaridade. Tais resultados indicam um alerta para a importância do

leite cru bovino como fonte de infecção para *T. gondii*, tendo em vista o hábito ainda muito comum do consumo e utilização do leite cru para a produção de queijo e manteiga em pequenas propriedades de agricultura familiar, cujo leite e derivados constitui-se como fonte de renda ao produtor.

Palavras-chave: Diagnóstico; Leite; Saúde Única; Toxoplasmose; Zoonose.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonosis caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). It has relevance in animal and human health because felids are the only definitive hosts, and humans and other animal species are intermediate hosts. In humans, the infection is common and the clinical manifestation is more important in immunosuppressed people and in transplacental transmission. The consumption of raw or unpasteurized milk is considered a risk factor and possible route of transmission of tachyzoites, as can be seen in some studies in goat milk; however, in bovine milk, there are few studies about the presence of *T. gondii*. Thus, this study aimed to investigate the presence of *T. gondii* in 102 bulk tank milk samples, collected from small family farms in eight municipalities of Midwest region of São Paulo. cPCR was performed with TOX4/TOX5 primers and Nested PCR was carry out with TgNP1/TgNP2 and Tg18s48F/Tg18s359R primers. As a result, it was possible to detect *T. gondii* DNA in 19 samples (18.63%). For the TOX4 /TOX5 primers, five samples were positive (4.90%) and for the TgNP1/TgNP2 primers, thirteen (12.74%) samples were positive. For Phylum Apicomplexa, with primers Tg18s48F/Tg18s359R, one (01) sample was positive (0.98%), confirming that it was *T. gondii* with 100% similarity. These results indicate an alert for the importance of raw bovine milk as a source of infection for *T. gondii*, in view of the still very common habit of consumption and use of raw milk for the production of cheese and butter on small family farms, whose milk and dairy products constitutes a source of income for the producer.

Keywords: Diagnosis; Milk; One Health; Toxoplasmosis; Zoonosis.

Lista de Figuras

Figura 1: Figura 1: “A”, “B” e “C” amostras devidamente armazenadas, separadas e identificadas em laboratório. “D” e “E” amostras sendo aliquotadas em microtubos de 1,5mL, dentro da capela de fluxo previamente esterilizada por 15 minutos na luz UV, para serem submetidas a extração. Fonte: arquivo pessoal.....62

Figura 2: “A” e “B” amostras de leite submetidas a extração do DNA. “C” e “D” quantificação das amostras extraídas. Fonte: arquivo pessoal.....70

Figura 3: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L15): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L16): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....71

Figura 4: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostras 23, 30 e 32 amplificaram ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L22): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L23 e L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....72

Figura 5: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras

foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....73

Figura 6: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....74

Figura 7: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. No gel 1, amostra 91 amplificou levemente e no gel 2, amplificou a amostra 99 ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Gel 1: Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*; Controle negativo (L24): água ultrapura. Gel 2: Controle positivo (L15): cepa RH de *Toxoplasma gondii*; Controle negativo (L16): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....75

Figura 8: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostras 1, 3, 23, 27, 29 e 32 amplificaram ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L35): cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

Controle negativo (L36): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....76

Figura 9: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostras 45, 46 e 59 amplificaram ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L35): cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

Controle negativo (L36): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....77

Figura 10: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Nenhuma amostra foi positiva ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Gel 1: Controle positivo (L35): cepa RH de *Toxoplasma gondii*; Controle negativo (L36): água ultrapura. Gel 2: Controle positivo (L5): cepa RH de *Toxoplasma gondii*; Controle negativo (L6): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....78

Figura 11: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostra 21 amplificou ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....79

Figura 12: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso

molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostras 22 e 31 amplificaram ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....80

Figura 13: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostra 43 amplificou ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....81

Figura 14: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.....82

Figura 15: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo

peçoal.....	83
Figura 16: Mapa do Brasil. Qgis.....	85
Figura 17: Mapa do Estado de São Paulo, Brasil. Qgis.....	86
Figura 18: Mapa dos municípios com amostras de leite bovino positivas para <i>Toxoplasma gondii</i>	87
Figura 19: Municípios com amostras de leite bovino positivas para os <i>primers</i> TOX4/TOX5 – cPCR.....	88
Figura 20: Municípios com amostras de leite positivos para os <i>primers</i> TgNP1 e TgNP2 – Nested PCR.....	89
Figura 21: Municípios com amostras de leite bovino positivas para os <i>primers</i> Tg18s48 e Tg18s359 – Nested PCR – Filo Apicomplexa.....	90

Lista de Tabelas

Tabela 1: Quantificação de DNA a partir da extração das amostras de leite de tanque de expansão.....	134
Tabela 2: Dados para realização do Teste Q de Cochran para análise estatística.....	148

Lista de Gráfico

Gráfico 1: Percentual de positividade segundo <i>primer</i> (P<0,0001).....	151
--	-----

Sumário

1 Introdução.....	27
2 Revisão bibliográfica.....	29
2.1 Histórico.....	29
2.2 Ciclo de vida.....	31
2.3 Epidemiologia.....	32
2.4 Toxoplasmose em bovinos.....	40
2.5 <i>Toxoplasma gondii</i> no leite para consumo humano.....	41
2.6 Surto de toxoplasmose humana no Brasil.....	48
2.7 Sintomas de toxoplasmose em humanos.....	53
2.8 Diagnóstico.....	54
2.9 Tratamento.....	55
3 Objetivos.....	57
3.1 Objetivo geral.....	58
3.2 Objetivos específicos.....	58
4 Material e Métodos.....	59
4.1 Comitê de ética.....	60
4.2 Localização de realização dos exames.....	60
4.3 Amostra de leite bovino a partir de tanque de expansão.....	61
4.4 Exames moleculares.....	63
4.4.1 Extração do leite para pesquisa do <i>T. gondii</i>	63
4.4.2 Quantificação do DNA.....	63

4.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) – <i>primers</i> TOX4/TOX5.....	63
4.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – <i>primers</i> TgNP1/TgNP2.....	64
4.4.5 4.4.5 Reação de Cadeia em Polimerase Nested (Nested PCR) – <i>primers</i> Tg18s48F/Tg18s359R	-
Apicomplexa.....	Filo 65
4.4.6 Eletroforese em gel de agarose.....	67
4.4.7 Controles.....	67
4.5 Sequenciamento.....	67
4.6 Análise espacial.....	68
4.7 Análise estatística.....	68
5 Resultados.....	69
5.1 Extração e quantificação das amostras.....	70
5.2 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) – <i>primers</i> TOX4/TOX5.....	70
5.3 Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested PCR) – <i>primers</i> TgNP1/TgNP2.....	76
5.4 Reação de Cadeia em Polimerase Nested (Nested PCR) – <i>primers</i> Tg18s48F/Tg18s359R	-
Apicomplexa.....	Filo 84
5.5 Sequenciamento.....	84

5.6 Análise espacial.....	85
5.7 Análise estatística.....	90
6 Discussão.....	91
7 Conclusão.....	109
8 Referências.....	111
9 Manuscrito.....	127
10 Anexos.....	129
10.1 Anexo 1.....	130
10.2 Anexo 2.....	131
10.3 Anexo 3.....	134
10.4 Anexo 4.....	138
10.4.1 Amostra 21.....	138
10.4.2 Amostra 31.....	140
10.4.3 Amostra 32.....	142
10.4.4 Amostra 43.....	144
10.4.5 Amostra 21.....	146
10.5 Anexo 5.....	148

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença zoonótica causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), um protozoário de distribuição mundial capaz de infectar todos os animais vertebrados e humanos (Dubey et al., 2020a). Estima-se que *T. gondii* infecte um terço da população humana mundial (Pereira et al., 2020).

A prevalência desta enfermidade em humanos é elevada na Europa, América Central e do Sul, sendo que na Tailândia e Japão a prevalência é inferior a 20%; Austrália, Polônia, Reino Unido e Bélgica está entre 23 e 53%; Taiti e França com prevalência acima de 60%; e no Brasil as infecções variam de 50 a 80% (Santos et al., 2016). Em função disso, *T. gondii* está entre os parasitos mais estudados entre os coccídeos e, devido sua importância médica e veterinária, faz com que muitos aspectos de biologia e epidemiologia continuem sendo pesquisados (Dubey et al., 2020a).

Neste contexto, este protozoário é apontado como a terceira maior causa de mortes em humanos por alimentos nos Estados Unidos (Dubey et al., 2020a). O referido parasito possui grande relevância em termos de Saúde Única, por ser uma das principais causas de abortamentos em mulheres, e costuma desenvolver manifestações clínicas mais graves em pacientes imunossuprimidos (Azevedo Filho et al., 2020).

Além do contato com oocistos ou ingestão de cistos teciduais, principalmente pelo consumo de carne crua ou malcozida de animais infectados,

o leite cru é considerado um fator de risco e possível via de transmissão de taquizoítos (Sah et al., 2019).

Bovinos são susceptíveis à infecção causada por *T. gondii*, mas parecem apresentar resistência ao desenvolvimento da patogenia, o que indica que o parasita não persiste por muito tempo nos seus tecidos (Sah et al., 2019). No entanto, os autores destacaram que a infecção é muito comum nesta espécie e que, boas práticas de manejo podem influenciar em uma soropositividade mais baixa para a doença em bovinos.

Os pastos contaminados com oocistos são a principal via de transmissão para esses animais e como o sistema extensivo de criação de bovinos é muito comum no Brasil, favorece a infecção toxoplásmica nessa espécie que, embora apresentem resistência, podem se infectar e não desenvolverem os sintomas clínicos (Chiebao et al., 2019).

Na literatura, trabalhos com pesquisa de *T. gondii* em leite de tanque de expansão são mais comuns em caprinos. Tignon et al. (2017) pesquisaram *T. gondii* em amostras de leite bovino de tanque de expansão, procedentes de diferentes países, tais como Alemanha, Dinamarca, Países Baixos e França. Assim, demonstraram que a pesquisa do agente a partir de amostra de leite de tanque de expansão pode ser útil para diagnóstico rápido e confiável da infecção, além de ser uma alternativa às amostras de sangue, devido a facilidade de coleta, pois pode ser feita por funcionários não especializados e ser menos invasivo para os animais, proporcionando o bem-estar e reduzindo perdas de

produção devido ao estresse (Gazzonis et al., 2018). Ademais, pode ser uma ferramenta de diagnóstico válida em um monitoramento ou investigação de programa de saúde de rebanhos, principalmente em grande escala (Tignon et al., 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

O agente etiológico da toxoplasmose foi descrito em 1908, quase que simultaneamente, em dois países distintos. Na Tunísia, localizado no Norte da África, Nicolle e Manceaux relataram a presença de um parasito intracelular no baço e no fígado do roedor *Ctenodactylus gundi*. Na época, estes pesquisadores acreditaram se tratar de uma forma particular de *Leishmania* spp., sendo assim denominada *Leishmania gondii* (Dubey et al., 2012). No mesmo ano, em São Paulo, Brasil, Splendore infectou experimentalmente coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus* e comparou o protozoário com o agente da leishmaniose visceral. Entretanto, um ano depois, em 1909, Nicolle e Manceaux, constataram que se tratava de um novo parasito, sendo, então, criado o gênero *Toxoplasma*. A sua nomeação ocorreu de forma definitiva em 1909, por estes mesmos pesquisadores, que o denominaram *T. gondii*, baseado na forma dos taquizoítos do protozoário (toxon = arco e plasma = célula) e “*gondii*” devido sua descoberta no roedor da espécie *Ctenodactylus gundii* (Nobuto et al., 1960; Vaz et al., 2011; Dubey et al., 2012).

O primeiro relato de toxoplasmose humana ocorreu em 1913, quando Castellani, no Sri Lanka, descreveu o primeiro caso da doença em um menino com quadro febril e com esplenomegalia (Simões et al., 2015). Fedorovitch, em 1916, observou organismos semelhantes relatados por Castellani em amostra de sangue de um menino de 10 anos de uma região do Mar Negro que apresentava anemia, febre e esplenomegalia. Além disso, Chalmers e Kamar em 1920 relataram organismos semelhantes em um soldado no Sudão que tinha dor de cabeça crônica, febre e diarreia. Entretanto, esses casos foram estudados de forma incompleta e como possível diagnóstico, os sintomas sugerirem a infecção pelo protozoário *Leishmania* spp. (Weiss, Dubey, 2009).

Em 1923, na cidade de Praga, um oftalmologista chamado Janku, relatou de modo inédito a toxoplasmose congênita humana em uma criança de 11 anos de idade com hidrocefalia e cegueira, que veio a falecer. Em um corte histológico do globo ocular após necropsia deste paciente, foi observada a presença de parasitos na retina. No Brasil, em 1927, Carlos Bastos Magarinos Torres evidenciou esta doença pela primeira vez em pessoas no Rio de Janeiro a partir da descrição de microrganismos em cortes histológicos do cérebro, miocárdio e músculos esqueléticos de um bebê que faleceu aos 29 dias de vida (Oréfice et al., 2010).

Em relação à toxoplasmose congênita, em 1939, nos Estados Unidos, Wolf, Cowen e Paige descreveram o primeiro caso de em um recém-nascido que morreu com 30 dias de vida que apresentava encefalite, mielite e meningite (Vaz

et al., 2011). Posteriormente, em 1942, foram evidenciados os sinais clínicos típicos (hidrocefalia, microcefalia, coriorretinite e calcificação intracraniana), conhecidos como tétrede de Sabin (Simões et al., 2015). Mais tarde, em 1948, foi desenvolvido um teste sorológico: o clássico teste do corante (dye test) de Sabin-Feldman. Por meio da execução deste exame, houve um incremento no diagnóstico laboratorial desta enfermidade, que permitiu a realização de inquéritos epidemiológicos (Vaz et al., 2011).

No ano de 1953, a infecção toxoplásmica foi diagnosticada com pioneirismo na espécie bovina por Sanger e colaboradores, em Ohio, EUA, pois foi induzida artificialmente sintomatologia clínica em bovinos jovens e adultos semelhante aos animais naturalmente infectados pelo coccídio (Gomes et al., 2020).

Posteriormente, foi elucidado cientificamente que são produzidos oocistos como produto da fase sexuada do *T. gondii* (Frenkel et al., 1970) e foi provado que os únicos mamíferos que excretam oocistos deste parasito são os felídeos domésticos e selvagens (Miller et al., 1972; Vaz et al., 2011). Portanto, os pesquisadores supramencionados, contribuíram substancialmente para a compreensão da epidemiologia desta zoonose.

2.2 Ciclo de vida

O parasito *T. gondii* apresenta três formas evolutivas: taquizoítos, bradizoítos (contidos no interior dos cistos teciduais) e esporozoítos (dentro dos

oocistos). Os taquizoítos infectam a célula do hospedeiro via penetração ativa da membrana celular e tornam-se envoltos pelo vacúolo parasitóforo que os protegem dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Dubey et al., 2004). Com multiplicação rápida e reprodução assexuada por sucessivas divisões binárias, causam destruição das células infectadas, rompem a célula do hospedeiro e se disseminam por via hematogênica (Dubey et al., 2012). Eles medem cerca de 4 x 9 µm de comprimento e 2 x 4 µm de diâmetro (Santos et al., 2016).

Na sequência, evoluem para outro estágio, em que se apresentam sob formas parasitárias denominadas cistos teciduais. Os bradizoítos, que estão interiorizados dentro destes cistos, representam a forma de resistência do *T. gondii* e sua multiplicação é lenta, nos hospedeiros intermediários. Estas formas evolutivas variam de tamanho, sendo que os menores medem aproximadamente cinco micrometros e podem conter apenas dois bradizoítos; os maiores podem conter vários destes. No cérebro, os cistos são esféricos e atingem no máximo 70 µm de diâmetro; já os intramusculares podem atingir até 100 µm. Os oocistos não esporulados medem cerca de 10 µm x 12 µm de diâmetro, enquanto os esporozoítos de 2 µm x 8 µm de diâmetro (Dubey et al., 2004).

2.3 Epidemiologia

T. gondii acomete animais de produção, silvestres, domésticos, além do ser humano. Pode causar infecção assintomática ou quadros sistêmicos graves, bem como prejuízos à saúde pública e à produção animal (Dubey et al., 2020a).

T. gondii é descrito como coccídeo que forma cistos nos tecidos e apresenta um ciclo de vida heteroxênico, com fase assexuada em vários tecidos dos hospedeiros intermediários, herbívoros ou onívoros; e associada à fase sexuada com desenvolvimento no intestino do hospedeiro definitivo (Delgado Betancourt et al., 2019).

Os felídeos são considerados hospedeiros definitivos e espécies-chaves na transmissão do *T. gondii*, por serem os únicos hospedeiros que albergam o parasito no epitélio intestinal, promovem a sua reprodução sexual e excretam oocistos nas fezes (Delgado Betancourt et al., 2019).

O intestino tem função fundamental no ciclo do *T. gondii*, pois quando o protozoário chega à mucosa intestinal, enfrenta uma barreira imunológica caracterizada especialmente pela presença da IgA, que desempenha um papel importante no combate a infecção oral do *T. gondii*, e uma barreira física formada pelos enterócitos. Para vencer a barreira física, o parasito desenvolveu várias estratégias de aderência, invasão dos enterócitos e disseminação além do epitélio. O ciclo enteroepitelial do *T. gondii* (fase sexuada) ocorre no interior dos enterócitos, e mais raramente no interior de células caliciformes de felinos. Os enterócitos rompem-se durante a eliminação dos oocistos e temporariamente a barreira intestinal fica comprometida (Delgado Betancourt et al., 2019).

Os esporozoítos podem passar pelos enterócitos e células caliciformes do epitélio ileal duas horas após a infecção e entrar na lâmina própria onde os parasitas se diferenciam (Delgado Betancourt et al., 2019).

Nos gatos, a toxoplasmose clínica apresenta-se mais grave em fetos infectados via transplacentária, que podem desenvolver hepatite ou colangiohepatite, pneumonia e encefalite, além de apresentar sinais de ascite, letargia e dispneia. Nos adultos, são observados sinais de hepatite e acometimento abdominal, insuficiência hepática e colangite hiperplásica, enterite extra-intestinal, doença inflamatória intestinal e espessamento da parede gástrica. A doença pode ser rapidamente fatal em gatos, com sinais respiratórios ou neurológicos graves (Calero-Bernal e Gennari, 2019). Se ocorrer manifestações clínicas, os órgãos mais comumente afetados são os olhos e pulmões. Aproximadamente 75% dos animais com uveíte são soropositivos para *T. gondii* (Negri et al., 2013).

A toxoplasmose em ovinos e caprinos é bem conhecida na literatura e a principal via de transmissão para ambos é por meio da ingestão de pastagens e água contaminada com oocistos esporulados do parasito. Comparativamente a outros animais de abate, *T. gondii* é mais patogênico para os caprinos, pois o parasito causa morte fetal, mumificação, natimortalidade, abortos ou nascimento de animais debilitados, ocasionando perda econômica aos criadores (Garcia et al., 2012).

A caprinocultura apresenta prejuízos causados por doenças infecciosas e parasitárias, como a toxoplasmose. Os pequenos ruminantes desenvolvem níveis muito elevados de anticorpos IgG anti-*T. gondii* durante a infecção aguda, os quais podem persistir por anos, na fase de latência (Nunes et al., 2016).

Portanto, a toxoplasmose em ovinos e caprinos está relacionada diretamente com episódios abortivos, sendo a maior causa de complicação reprodutiva em todo o mundo (Stelzer et al., 2019).

T. gondii viável já foi isolado de carne, leite e queijo de cabra. A transmissão horizontal acontece após a ingestão de cistos em carnes malcozidas ou pelo consumo de alimentos contaminados com oocistos esporulados, bem como pelo leite cru de cabra e ovelha. O papel zoonótico de *T. gondii* foi demonstrado uma vez que o consumo de carne crua/ malcozida ou leite contaminados causa infecção humana (Sah et al., 2019).

A toxoplasmose clínica grave em suínos é considerada rara e epizootias de toxoplasmose foram relatadas no Japão, Cingapura e Taiwan, sendo raros surtos em outros países. Alguns levantamentos sorológicos indicam que 30% dos porcos domésticos são expostos ao *T. gondii* mundialmente. Além disso, foi relatado na literatura que este parasito fica viável na carne suína de tecidos abatidos em frigorífico (Dubey et al., 2020b).

T. gondii foi reconhecido pelas Autoridades Europeias para a Segurança dos Alimentos (EFSA) com riscos para a saúde pública em suínos a ser avaliado durante a inspeção da carne. Além disso, na última década o DNA do *T. gondii* em carne de porco processada ou em produtos de carne de porco curada levantou questões sobre a segurança desses produtos (Dubey et al., 2020b).

A toxoplasmose em equinos apresenta uma baixa prevalência em relação as outras espécies, pois são animais que apresentam mais resistência no

desenvolvimento clínico, mas quando manifestam sintomas são caracterizados por hiperirritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e abortamento. O risco de contrair uma infecção via ingestão da carne dessa espécie é baixa e, por isso, não se dá importância epidemiológica significativa por esta via. Entretanto, ainda assim é uma fonte de infecção de cistos de *T. gondii* e, desta forma, considera-se com risco à saúde pública em indivíduos que tem o hábito de consumir esta carne. Em zoológicos, alguns animais são alimentados com este tipo de carne, principalmente felídeos silvestres, tornando-se, portanto, uma via de transmissão importante para hospedeiros definitivos (Millar et al., 2008).

T. gondii viável pode persistir em tecidos comestíveis até 476 dias após a infecção nos cavalos e os animais que estiverem infectados podem permanecer soronegativos ou desenvolver apenas um baixo título de anticorpos específicos em testes sorológicos específicos como a técnica de Aglutinação Direta Modificada (MAD) (Stelzer et al., 2019).

As aves, em especial galinhas de criadouros, podem conter cistos teciduais de *T. gondii* e representam risco de infecção ao ser humano, principalmente pela manipulação da carne sem cuidados higiênicos ou pelo consumo de carne crua ou malcozida (Beck et al., 2013). As galinhas domésticas são consideradas um bom indicador da contaminação do solo por oocistos de *T. gondii* e quando estão presentes em regiões de elevada prevalência de infecção pelo parasita em humanos, são utilizados como animais sentinelas, devido ao hábito de ciscar e de sua suscetibilidade ao protozoário. Por sua vez, quando

criadas em sistema intensivo tem menor probabilidade de contato com as vias de transmissão parasitária e apresentam baixa prevalência ao *T. gondii* (Stelzer et al., 2019).

As implicações da toxoplasmose estão relacionadas diretamente aos grupos de risco como gestantes, crianças e indivíduos imunodeprimidos. É uma doença de notificação compulsória, ou seja, todos os casos positivos de toxoplasmose aguda devem ser notificados (Brasil, 2018).

Nos indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose manifesta-se quase sempre de forma subclínica, sem repercussões mais sérias na maioria dos casos; entretanto, é preciso chamar atenção para a toxoplasmose ocular, pois cerca de 85% dos recém-nascidos (RN) com toxoplasmose congênita não apresentam sinais clínicos evidentes ao nascimento. Contudo, com o uso de uma avaliação mais detalhada, pode mostrar alterações, tais como restrição do crescimento intrauterino, prematuridade, anormalidades líquóricas e cicatrizes de retinocoroidite.

Quando presentes, as manifestações clínicas podem ser encontradas no período neonatal ou ao longo dos primeiros meses de vida; também podem surgir sequelas da doença que não foram previamente diagnosticadas na adolescência ou na idade adulta. Dentre os RN assintomáticos, estima-se que 85% apresentarão cicatrizes de retinocoroidite nas primeiras décadas de vida, podendo evoluir

em anormalidades neurológicas. A maior gravidade tem sido identificada, possivelmente devido à exposição a cepas mais virulentas do *T. gondii* ou a maior suscetibilidade da população (Brasil, 2018).

A frequência da toxoplasmose é variável nos diversos países e esta variabilidade está ligada a fatores como padrões culturais da população, hábitos alimentares, idade e procedência rural ou urbana (Mareze et al., 2019).

As principais vias de transmissão de *T. gondii* para o ser humano são pela ingestão de alimentos de origem animal e vegetal, bem como pela água contaminada por oocistos esporulados (Blaga et al., 2019).

A prática da não cocção adequada de produtos cárneos foi introduzida principalmente nos países por questões culturais. No Brasil, por exemplo, esses hábitos estão fortemente arraigados, o que favorece a ocorrência desta doença (Gomes et al., 2020) e sua consequente disseminação, uma vez que existe evidência de que os cistos permanecem viáveis nos tecidos musculares dos animais após o abate (Azevedo Filho et al., 2020).

Importante mencionar que este protozoário não pode ser detectado visualmente durante a inspeção da carne; assim, o processamento incorreto e o consumo deste alimento podem infectar os consumidores (Olsen et al., 2019), uma vez que espécies de animais de produção (Costa et al., 2010), inclusive bubalinos, são suscetíveis a doença (de Barros et al., 2020).

Neste contexto, um fator preocupante é a informalidade dos mercados alimentares, onde acontece o abate clandestino de carne bovina, que pode

propiciar a propagação desta zoonose (Marinho et al., 2020). Vale destacar que a maior parte da carne bovina é consumida no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país (Witter et al., 2020). Assim, pelo potencial de mercado nacional deste produto e por diversos relatos de isolamento de *T. gondii* em bovinos, a relevância dessa infecção nesta espécie animal não pode ser negligenciada (Gomes et al., 2020).

Por sua vez, os bovinos se infectam por *T. gondii*, mas aparentemente parecem apresentar resistência, havendo indício de que este parasito não persiste por muito tempo em seus tecidos. No entanto, esta infecção é muito comum na espécie em questão e a adoção de boas práticas de manejo, pode propiciar menor ocorrência desta doença (Dubey et al., 2012).

A toxoplasmose congênita em bovinos, embora não seja frequentemente relatada na literatura, merece atenção, pois essa via de transmissão acontece comumente e a virulência da cepa *T. gondii* influencia na possível transmissão por esta via (Santos et al., 2016). Isso foi observado em um estudo com vacas infectadas experimentalmente das quais foram isolados *T. gondii* do cérebro e fígado em quatro vacas, da placenta de duas vacas e do conteúdo gástrico de dois fetos. Outra observação foi que uma fêmea abortou 24 dias após a inoculação intravenosa de *T. gondii*. Esses dois fatos sugerem que há variabilidade na patogenicidade de diferentes cepas deste protozoário, principalmente quando se trata de problemas reprodutivos em bovinos (Santos et al., 2016).

2.4 Toxoplasmose em bovinos

Os pastos contaminados com oocistos esporulados de *T. gondii* são a principal via de transmissão para animais de produção e, como o sistema de criação extensivo é muito comum no Brasil, isso favorece a infecção toxoplásmica nestes hospedeiros que, embora apresentem resistência, podem se infectar e não desenvolver os sintomas clínicos (Adesiyun et al., 2020), que geralmente são inespecíficos e leves (Azevedo Filho et al., 2020).

Em pesquisas já foi demonstrado que anticorpos para *T. gondii* vêm sendo observados mundialmente em bovinos. No entanto, há dificuldade em se investigar suas taxas de prevalência. No Brasil, por exemplo, essa enfermidade encontra-se amplamente disseminada entre os bovinos por todo país, embora as porcentagens possam variar de acordo com a região. O alto predomínio de reagentes relatado na literatura fortalece a hipótese de que esses ruminantes são fonte de infecção tanto para consumidores quanto para indivíduos que trabalham em contato direto com este tipo de alimento cru ou malcozido (Stelzer et al., 2019; da Costa et al., 2019; Pereira et al., 2020).

No Brasil, A frequência de ocorrência de anticorpos de *T. gondii* varia de 1 a 89,1%, com base em dados de 1978 a 2018 e dependendo da região avaliada. Apesar do país ter um dos maiores rebanhos bovinos comerciais do mundo, os dados de frequência de ocorrência estão disponíveis apenas em alguns estados. Sendo assim, a frequência de ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* nos rebanhos da região Norte (45,5%) é a mais alta, seguida do Centro-Oeste

(42,2%), Sul (23,4%), Sudeste (17%) e Nordeste (13,4%) (Gomes et al., 2020). A baixa frequência de ocorrência de *T. gondii* na região Sudeste ressalta a importância deste estudo.

2.5 *Toxoplasma gondii* no leite para consumo humano

O leite é tido como alimento completo, principalmente para crianças e idosos, devido ao seu alto teor de proteínas, minerais, gorduras e vitaminas. Por serem consumidos por milhões de pessoas ao dia, a qualidade higiênica do leite e seus derivados é de grande importância na saúde pública, visto que em uma contaminação pode causar infecções ao homem e outros animais (Dehkordi et al., 2013).

Na literatura foi demonstrado que o leite contaminado com taquizoítos pode causar toxoplasmose em humanos, o que facilita a disseminação da infecção no organismo e inclusive a transmissão para a prole em casos gestacionais. Além do contato com oocistos pela comida, o leite cru é considerado um fator de risco e possível via de transmissão de taquizoítos. Apesar destes serem muito sensíveis ao pH ácido do estômago, já foi evidenciada transmissão de *T. gondii* via leite, assim como a sobrevivência dos taquizoítos por vários dias (Koethe et al., 2017).

As formas de taquizoítos que chegam ao estômago podem ser destruídas, mas as que penetram na mucosa oral podem evoluir como oocistos e cistos. Após a liberação dos taquizoítos na circulação, caso o animal seja uma fêmea

gestante pode ser transmitido para o feto, parasitando-o (Marinho et al., 2020).

Além da infecção ser causada pelos taquizoítos no leite, pode acontecer pela excreção do cisto tecidual porque durante a pré-lactação, as células mamárias podem abrigar cistos de *T. gondii*. Os cistos também podem ser excretados pelas células da glândula mamária por exocitose, permitindo a contaminação do leite dentro da membrana. Essa infecção pode-se agravar pela diminuição da concentração de enzimas proteolíticas no intestino de crianças e animais lactantes, o que proporciona o aumento da sobrevivência das formas deste parasito (Boughattas, 2015).

Assim, a infecção por *T. gondii* é comumente encontrada em crianças de áreas rurais, principalmente em crianças que estão em fase de amamentação cuja mãe adquiriu toxoplasmose, evidenciando-se a importância do leite como fator de disseminação do parasito (Boughattas, 2015).

O leite não pasteurizado ou processado inadequadamente e o queijo fresco elaborado com leite cru (ou não pasteurizado) são importantes fontes de alimento nas áreas rurais e também nas áreas urbanas, onde ocorre a comercialização do leite cru de maneira informal ou clandestina (Badini et al., 1996) e podem ser vias de transmissão de *T. gondii*, por taquizoítos, para o ser humano (Hiramoto et al., 2001). Os taquizoítos estão presentes no leite não pasteurizado, sendo mais comum na literatura relatos em leite cru de cabras (Marana et al., 1995) e ovelhas (de Barros et al., 2020). Devido os bovinos apresentarem resistência ao protozoário, os estudos são escassos com relação

ao leite nessa espécie (Costa et al., 2010).

No leite de búfalas que também é utilizado para o consumo humano, estima-se que a prevalência de anticorpos nessa espécie varia de 0 a 87,79% (de Barros et al., 2020).

Um trabalho no Irã realizou bioensaio em gatos para isolar *T. gondii* a partir do leite de búfala e, para isso, os animais foram alimentados com 50 mL de leite por três dias com amostras de leite cru de 33 rebanhos de búfalas coletadas de animais clinicamente saudáveis e sem alterações físicas do leite indicando a presença do *T. gondii*. Além disso, as 164 amostras de leite de búfala coletadas foram submetidas ao ELISA. Como resultado ao bioensaio, todos os gatos eliminaram oocistos nas fezes e, com relação ao ELISA, cinco (3,65%) amostras foram reagentes para *T. gondii*. Ambos resultados sugerem a viabilidade dos taquizoítos no leite e a importância do leite cru na transmissão de *T. gondii* para o homem (Dehkordi et al., 2013).

Na Mongólia, amostras de leite foram coletadas de 19 rebanhos, perfazendo-se um total de 59 cabras, 58 ovelhas e 9 camelas. O DNA do *T. gondii* foi detectado no leite de uma ovelha e em cinco camelas. Este resultado demonstra a importância dos camelos no ciclo de vida deste protozoário, sendo considerado o primeiro relato de detecção do parasito no leite de camelas e a primeira caracterização genotípica na Mongólia com a presença do genótipo tipo I, o que é preocupante, pois associa-se com toxoplasmose congênita humana em comparação com outras linhagens (Iacobucci et al., 2019).

A prevalência de *T. gondii* foi pesquisada também em jumentas prenhas, pelas técnicas de ELISA e Nested PCR, tendo em vista que, apesar da carne não ser consumida pelo ser humano, no Brasil, o leite é uma fonte de alimento comum em zonas rurais e pobres sem controle de qualidade. Como resultado, foram detectados anticorpos contra *T. gondii* no leite em 46,3% das amostras, com a técnica de ELISA e três de seis amostras de leite testadas foram positivas à PCR (Boughattas, 2015). Ressalta-se que na China o consumo de carne de jumento e burro é uma iguaria e, em duas notificações do país, dos 738 jumentos e 1278 burros, apresentaram soroprevalências de 23,6% e 16,7% para *T. gondii*, respectivamente (Dubey et al., 2020a). O consumo dessa carne difere dentre outros países, como os Estados Unidos, no qual a criação de burros e jumentas é considerado como passatempo e com fins reprodutivos, além de serem usados como meio de transporte, vendas de produtos lácteos e exportação da carne do animal; no entanto, 6,4% de 373 burros apresentaram soroprevalência para *T. gondii* (Dubey et al., 2020a).

Embora pouco relatado na literatura, o leite de jumenta devido sua composição ser mais próxima do leite da mulher – pobre em proteínas e gordura e rico em lactose – é sugerido como um substituto para bebês, crianças e adultos com alergia ao leite, pois uma das propriedades deste leite é a sua capacidade de modular o sistema imunológico do idoso como a resposta imunológica da mucosa intestinal, sendo indicado principalmente para idosos. Além disso, esse leite é recomendado para auxiliar na prevenção de aterosclerose e na terapia do

tumor ou no tratamento da conjuntivite, de acordo com algumas crenças étnicas (Boughattas, 2015).

Referente ao leite de ovelhas, há uma escassez de estudo com o leite ovino e sobre o seu potencial de transmissão de *T. gondii* para o ser humano; entretanto, um estudo feito no Nordeste do Brasil por Silva et al. (2015), coletaram amostras de sangue e leite do mesmo animal e submeteram as amostras de sangue à técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), e as amostras de leite à PCR convencional. Como resultado 15,78% (9/57) ovelhas foram soropositivas a RIFI e nenhuma positividade à PCR (Silva et al., 2015).

A técnica de PCR pode apresentar uma maior sensibilidade em relação à detecção de anticorpos IgG, já que, em uma fase aguda, a técnica de PCR poderá identificar os taquizoítas circulantes no leite em um período médio de 12 a 15 dias após a infecção, com a presença dos taquizoítos. Nesta fase, a sorologia para *T. gondii* em relação aos anticorpos IgG será não reagente, sendo somente reagentes nas primeiras duas semanas a dois meses após o início da infecção, em que ocorrerá o pico de produção de anticorpos. A partir desta fase, os taquizoítos passam para a forma de bradizoítos, o qual se aloca nos tecidos, não sendo detectados em fluidos corporais (Silva et al., 2015).

A detecção do *T. gondii* no leite indica a possibilidade da transmissão pelo consumo de leite cru e derivados não pasteurizados, bem como representa risco à saúde pública (Silva et al., 2015).

No leite de cabra, *T. gondii* tem se mostrado viável e em quantidade suficiente para infectar camundongos e gatos, tanto no leite cru quanto em produtos de queijo produzidos com enzimas frias (Iacobucci et al., 2019).

Sabe-se que a ingestão de leite de cabra não pasteurizado é uma fonte de infecção para os humanos, pois a excreção de taquizoítos no leite pode desempenhar um papel na transmissão horizontal da infecção por *T. gondii* (Camossi et al., 2011). A ingestão deste leite e seus derivados contaminados com *T. gondii* é uma das formas de transmissão, principalmente em bebês alérgicos ao leite de vaca (Luptakova et al., 2014). A substituição do leite de vaca para o leite de cabra para os bebês alérgicos acontece porque a estrutura da caseína do leite de cabra é semelhante ao leite humano, além de ser facilmente digerido, devido ao tamanho menor de gordura, ser alcalino e tolerado por pessoa com intolerância à lactose, conter maior quantidade de colesterol que o leite de búfala ou camelo, com mais cálcio que o leite de vaca, porém com quantidade menor das vitaminas B6 e B12 (Boughattas, 2015).

O DNA de *T. gondii* em leite de cabra foram relatados por Bezerra et al. (2013) e Silva et al. (2015) no Nordeste do Brasil. Em ambos os estudos foram coletados amostras de sangue e leite do mesmo animal. As amostras de sangue foram submetidas à RIFI, e as amostras de leite, à PCR. Os resultados foram semelhantes em ambos, tendo positividade das amostras para RIFI e PCR. A presença de DNA de *T. gondii* no leite não confirma a viabilidade do parasita, porém sugere a possibilidade de a transmissão ocorrer pelo consumo de leite cru

e de seus subprodutos, como queijo e manteiga (Bezerra et al., 2013).

Embora os taquizoítos sejam sensíveis às condições ambientais e às enzimas proteolíticas presentes no estômago, o leite de cabra tem sido associado a surtos de toxoplasmose em humanos. Entre janeiro de 2000 a março de 2013, o Ministério da Saúde constatou mais de 8.000 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e, desse total, cinco surtos foram causados pelo *T. gondii* (Silva et al., 2015).

Pesquisas com leite de tanque de expansão para detecção do *T. gondii* são mais comuns em caprinos e escassos em bovinos, sendo efetuados apenas em países europeus como Alemanha, Dinamarca, Países Baixos e França (Tignon et al., 2017). Assim, a alta soropositividade para *T. gondii* e a presença do DNA no leite é um fator de risco para a população humana se houver o consumo do leite cru (Sah et al., 2018).

No norte da Itália foi detectado pelo teste de ELISA a imunoglobulina G anti-*T. gondii* em amostras de leite de cabras em tanques de expansão (Gazzonis et al., 2018). Em Bangladesh, foi verificado pelo teste de ELISA, que a ocorrência de anticorpos era significativamente maior em caprinos (16%) do que em bovinos (8,3%). No entanto, a considerável soroprevalência nestas espécies denota uma fonte de infecção em potencial pela possibilidade de consumo da carne crua ou malcozida, bem como da ingestão de leite destes animais, visto que a alta soropositividade para *T. gondii* e a presença do DNA no leite é um fator de risco para a população humana se houver o consumo do leite cru (Sah et al., 2018).

T. gondii pode ser transmitido para o ser humano pela via vertical, por meio de taquizoítos, os quais são transmitidos via placenta ao feto ou pela via horizontal. Nesse hospedeiro, pode desenvolver aborto e infecção congênita até doença ocular e encefalite fetal em hospedeiros imunocomprometidos, como em pacientes infectados pelo HIV (Dehkordi et al., 2013).

O consumo de leite contaminado pode causar doenças em humanos, pois o leite dos animais afetados contém taquizoítos, o que facilita a transmissão para a prole. *T. gondii* é a terceira causa de morte por alimentos nos Estados Unidos (Dehkordi et al., 2013).

No Brasil, estima-se um consumo anual de 9,8 kg de leite cru per capita, com 40% do queijo produzido de maneira artesanal em que a maioria dos produtores fabrica o queijo seguindo os métodos tradicionais de forma rudimentar, sem respeitar a legislação vigente com o devido controle de qualidade, voltado ao comércio local (Silva et al., 2015). Assim, a transmissão de *T. gondii* via leite e seus derivados não pasteurizados ou processados inadequadamente, é importante, tanto nas áreas rurais quanto urbanas.

2.6 Surto de toxoplasmose humana no Brasil

Em 1966, ocorreu um dos primeiros surtos antes da descoberta do oocisto em 1970. De um total de 500 estudantes da Universidade de São José dos Campos - SP, 99 se sentiram doentes e fizeram sorologia, com todos apresentando soropositividade e altos títulos de anticorpos, pelo teste de corante

(Sabin-Feldman) e teste de anticorpos fluorescentes indiretos (Reação de Imunofluorescência Indireta). O surto durou dois meses, de março a maio de 1966, e os sintomas apresentados por 97 pacientes foram febre, linfadenopatia, mialgia, astenia e cefaleia. A causa deste surto é desconhecida, porém provavelmente deve-se à ingestão de alimentos/água contaminados com oocistos (Dubey et al., 2021)

Em 2001, no município de Santa Isabel do Ivaí, no Paraná, houve um surto de toxoplasmose que impactou nos âmbitos social, econômico e médico, pois detectou 294 casos de toxoplasmose e atingiu o pico entre novembro de 2001 e janeiro de 2002. Os sintomas de toxoplasmose aguda (febre, linfadenopatia, mialgia, cefaleia, anorexia e artralgia) foram presentes em 155 pessoas. Um total de 3.868 pessoas foram testadas sorologicamente para anticorpos IgM e IgG, o qual 454 indivíduos foram positivos para IgM. Das pessoas IgM positivas, foram observados por oftalmologistas lesões oculares, rinite necrosante e clareamento focal da retina. Após um ano do surto, alguns indivíduos desenvolveram lesões necrosantes envolvendo a mácula (Dubey et al., 2021).

Além disso, de dez mulheres soropositivas durante a gravidez, uma apresentou aborto, porém em três não houve infecção congênita. Seis bebês nasceram com toxoplasmose congênita e um morreu aos 9 meses. Uma mulher apresentou envolvimento tetra-ocular, ou seja, tanto da mãe quanto do filho foram afetados. Cinco crianças infectadas congenitamente foram acompanhadas clinicamente por 13 anos, pois no momento do surto as mães estavam no terceiro

trimestre, tendo-se todas apresentado lesões oculares. Quatro crianças foram submetidas a testes neurológicos porque tinham dificuldades de aprendizagem. A causa do surto aconteceu porque as duas cisternas subterrâneas que abasteciam a cidade não eram completamente vedadas e a água não era filtrada por cloração antes do consumo humano; além disso, uma gata que morava perto da área da cisterna deu à luz três filhotes em outubro de 2001. Os filhotes viviam no topo da cisterna de água e um deles ficou preso, o qual era soropositivo para anticorpos anti- *T. gondii*. O parasito viável foi isolado da água servida pela cisterna. Esta foi a primeira infecção causada por oocistos de *T. gondii* em água e foi relatada como sendo o maior surto da doença até então (Dubey et al., 2021).

Em 2006, em São Luís no Maranhão, um surto de toxoplasmose aguda foi relatado. De 90 pessoas testadas sorologicamente, 33 foram soropositivas para IgM com toxoplasmose aguda. Dos casos, 20 eram mulheres e uma delas estava grávida. O surto durou quatro meses, de maio a agosto de 2006 e os sintomas relatados foram linfadenopatia, febre e cefaleia. A causa está correlacionada ao consumo de água filtrada em torneira (Rego e Silva et al., 2019; Dubey et al., 2021).

Em 2009, no município de Araraquara em São Paulo, 11 de 25 pessoas apresentaram evidências sorológicas de toxoplasmose aguda. Como sintomas apresentaram febre, linfadenopatia, cefaleia, mialgia e anorexia. A causa foi o consumo de saladas e vegetais que era servido no restaurante da empresa no qual esses indivíduos trabalhavam (Ekman et al., 2012; Dubey et al., 2021).

Em 2015, na cidade de Londrina, Paraná, dos 772 funcionários de uma instituição de pesquisa, 674 foram testados para anticorpos anti-*T. gondii* e 73 foram reagentes para toxoplasmose aguda; 54 pacientes apresentaram sintomas de linfadenomegalia, febre, mialgia, dor de cabeça, visão turva e dor de garganta. A principal causa foi associada à ingestão de saladas servidas em restaurante no local (Cabral Monica et al., 2020; Dubey et al., 2021).

Na cidade de Montes Carlos de Goiás, no período de dezembro de 2015 a agosto de 2016, ocorreu um surto de toxoplasmose humana, o qual está associado ao consumo de queijo fresco de leite cru bovino. Os sintomas observados foram linfadenomegalia, alteração oftálmica, convulsão e mialgia. Todos os indivíduos foram submetidos inicialmente ao diagnóstico para dengue, leishmaniose e leptospirose; tendo-se resultados negativos, foram submetidos a sorologia para *T. gondii*. Assim, a contaminação de queijo ou leite, bem como a água contaminada com oocistos (usada para fabricação do queijo) foi a causa deste surto (Da Costa et al., 2019; Dubey et al., 2021).

Em 2018 em Santa Maria, Rio Grande do Sul, foi relatado surto com 931 casos confirmados de 2.270 suspeitos. Dos 931, 146 eram gestantes, as quais apresentaram três óbitos fetais, 10 abortos e 29 casos de toxoplasmose congênita. O diagnóstico foi confirmado em 748 pessoas que apresentaram sintomas como febre, mialgia, linfadenopatia e lesões oculares. Foi possível isolar *T. gondii* viável do tecido placentário de duas mulheres por bioensaio em camundongos. A toxoplasmose clínica foi diagnosticada no terceiro trimestre de

gestação e as mulheres foram tratadas com sulfadiazina e pirimetamina, cujos filhos sobreviveram ao nascer. Cinco mulheres apresentaram morte fetal e três abortaram; *T. gondii* viável foi isolado das placentas de todas as cinco. O DNA de *T. gondii* foi detectado por PCR em líquido amniótico, tecidos fetais e placentas. Cento e oitenta e quatro (184) mães apresentavam evidências sorológicas de infecção recente por *T. gondii*, sendo que uma mãe com gravidez gemelar deu à luz um feto morto e uma criança com toxoplasmose congênita com 29 semanas de gestação. Dos 187 bebês, 29 apresentaram toxoplasmose congênita e 19 lesões oculares. As lesões oculares foram retinocoroidite, anormalidades do nervo óptico, microftalmia e catarata. Lesões oculares bilaterais foram encontradas em 10 de 19 lactentes, evidenciando infecção congênita. Treze dos 1.811 bebês testados apresentaram calcificação cerebral. Este foi o maior surto de infecção pelo *T. gondii* em mulheres grávidas durante o terceiro trimestre de gestação e resultou no nascimento de bebês com toxoplasmose grave. Portanto, a infecção materna durante o terceiro trimestre está associada a maior taxa de toxoplasmose congênita independente do tratamento materno (Dubey et al., 2021).

Em todos os casos é notável que os pacientes possuem um amplo espectro de sintomas, sendo alguns semelhantes aos da gripe e, por isso, podem passar despercebidos, a menos que um grande número de casos seja afetado (Dubey et al., 2021).

2.7 Sintomas de toxoplasmose em humanos

Em humanos imunocompetentes a infecção é assintomática em 80% a 90% dos casos e a frequência da infecção pode variar de acordo com a faixa etária, hábitos alimentares, padrões culturais e procedência urbana ou rural (Dubey et al., 2020c).

Na maioria das vezes, se desenvolve de forma assintomática; entretanto, sintomas como mal-estar, dor de cabeça, febre, perda de força e dores musculares podem estar presentes. Em alguns casos, observa-se a ocorrência de linfadenopatia, e, em quadros mais graves, o acometimento de órgãos vitais como pulmão, coração e fígado. Alguns pacientes desenvolvem a forma ocular que resulta em coriorretinite aguda ou crônica. Em indivíduos imunossuprimidos, a doença pode resultar em quadros de hepatite, pneumonite e lesão de sistema nervoso central (Azevedo Filho et al., 2020).

Em recém-nascidos (RN), é difícil demonstrar os sinais clínicos; entretanto, há alterações na restrição do crescimento intrauterino, prematuridade, anormalidades liquóricas, cicatrizes de retinocoroidite, bem como pode surgir sequelas na adolescência ou na idade adulta, como anormalidades neurológicas e lesões oftalmológicas. Quando RN apresentam sintomas, há acometimento visual em graus variados, retardo mental, crises convulsivas, anormalidades motoras, calcificação do cérebro e surdez (Brasil, 2018).

2.8 Diagnóstico

A pesquisa direta de *T. gondii* pode ser feita a partir de diversos componentes orgânicos como sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva, leite, escarro, medula óssea, cortes de placenta, além de conteúdos de infiltrados cutâneos, do baço, fígado, músculos e linfonodos (Sampaio et al., 2015).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pela demonstração do coccídio em técnicas parasitológicas, análise histológica, métodos imunológicos indiretos, biologia molecular, com destaque para as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (PCR) ou em tempo real (qPCR) (Gomes et al., 2020) e Nested (Su et al., 2010).

As técnicas sorológicas são Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), hemaglutinação indireta (HAI), fixação de complemento (CF), teste de Sabin-Feldman (teste de corante) e e Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (Santos et al., 2016). Há também o isolamento por meio de cultivos celulares e de bioensaios, histológico ou imunohistológico, bem como cPCR ou qPCR como diagnóstico direto (Brasil, 2018).

A principal ferramenta para o diagnóstico da toxoplasmose é a detecção de anticorpos no sangue (Sampaio et al., 2015); porém, estudos relatam a limitação diagnóstica tendo-se verificado a não concordância entre a presença de cistos viáveis de *T. gondii* na musculatura e a soropositividade para este parasito (Burrells et al., 2018).

A cPCR e Nested PCR são considerados grandes avanços para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* e têm demonstrado na literatura maior acurácia, sensibilidade e especificidade do que os métodos diagnósticos tradicionais (Su et al., 2010; Dehkordi et al., 2013; Rouatbi et al., 2020), pois permitem detectar pequenas quantidades de DNA alvo e potencialmente fornecem uma ferramenta alternativa de diagnóstico sensível. Além disso, a PCR permite que o diagnóstico seja confirmado em um dia (Sah et al., 2019).

2.9 Tratamento

O tratamento e acompanhamento da doença estão disponíveis, de forma integral e gratuita, pelo Sistema Único de Saúde (Brasil, 2018). O tratamento para humanos para combater os taquizoítos é feito com a combinação da pirimetamina com sulfadiazina (Simões, 2015).

A clindamicina aplicada a cada 24 horas, por duas semanas, é usada em cães e geralmente administrada intramuscular, pois doses orais altas tendem a causar transtornos gastrointestinais (Simões, 2015).

Para reduzir o acometimento fetal, no Brasil, o tratamento é feito com o uso da espiramicina para tratar a infecção materna aguda confirmada com idade gestacional inferior a 30 semanas e durante toda a gestação. A partir da trigésima semana gestacional ou quando há confirmação ou probabilidade alta de infecção fetal, é indicado o uso da associação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico (Brasil, 2012).

De modo geral, os medicamentos mais usados para tratar toxoplasmose em animais são as sulfonamidas, o qual a sulfadiazina é a mais predominante e pode ser associada ou não a pirimetamina. Em casos de pacientes alérgicos a sulfonamidas, é introduzido a clindamicina. No tratamento com pirimetamina, o ácido fólico é indicado para prevenir efeitos colaterais. Em gatos com sinais clínicos sistêmicos, o tratamento também é efetivo com uso de corticosteroides tópicos, orais ou parentais (Silva e Silva, 2016).

Tendo em vista a carência de referências na literatura científica acerca da detecção de *T. gondii* em amostras de leite bovino e devido à sua notoriedade como agente zoonótico e de importância em saúde pública, propusemos esta pesquisa.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Pesquisar *T. gondii* em amostras de leite cru bovino, a partir de tanques de expansão em pequenas propriedades rurais de agricultura familiar do Centro-Oeste Paulista.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Utilizar a técnica molecular de PCR convencional e Nested para detecção de *T. gondii* em amostras de leite bovino a partir de tanques de expansão;
- ❖ Realizar o sequenciamento das amostras positivas;
- ❖ Analisar espacialmente a distribuição de casos positivos nos municípios das propriedades leiteiras estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

O presente projeto de pesquisa previu a utilização de material biológico (leite de tanque de expansão) de um estudo de outro projeto de pesquisa, tendo em vista a situação da pandemia por COVID-19, com a proposta de ida presencial às propriedades leiteiras para coleta de material estar impossibilitada devido ao controle sanitário dentro das propriedades e à proteção à saúde dos produtores e funcionários pelas medidas de isolamento.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética - CEUA - da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB – UNESP sob o número 1367/2020 (ANEXO 1).

Ressalta-se que todas as amostras de leite de tanque estavam devidamente armazenadas no laboratório em freezer a -20° Celsius e a proposta diagnóstica para esta pesquisa, com uso de técnica molecular de PCR para *T. gondii* não apresentou qualquer prejuízo para sua execução, seguindo-se adequadamente todos os protocolos descritos na literatura.

4.2 Local de realização dos exames

O procedimento molecular de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR foi realizado no Laboratório de Sanidade Animal da Unidade Regional de Pesquisa e Desenvolvimento - APTA/SAA - SP (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), situada na cidade Bauru. As reações de sequenciamento foram realizadas na Genotyping/BPI diagnóstico genético de Botucatu.

4.3 Amostras de leite bovino a partir de tanques de expansão

As amostras de leite encontravam-se devidamente armazenadas no Laboratório de Sanidade Animal da APTA Centro-Oeste – Bauru, em freezer a - 20 graus Celsius. As amostras eram procedentes de 102 tanques de expansão, coletadas de diferentes propriedades localizadas em oito municípios da região Centro-Oeste Paulista, sendo uma amostra de leite por propriedade: Anhembí (13 amostras), Avaré (47 amostras), Arandu (quatro amostras), Bofete (sete amostras), Botucatu (duas amostras), Bauru (três amostras), Cerqueira Cesar (dez amostras) e Pardinho (16 amostras). O leite dos tanques de expansão era coletado para processamento por laticínios situados da região estudada.

Os tanques estavam a temperatura máxima de 4°C, e não armazenavam leite de ordenhas realizadas a mais de 48 horas (dois dias). Previamente à coleta, o agitador do tanque foi ligado para que o leite fosse homogeneizado por pelo menos cinco minutos e, após este período, com um auxílio de uma concha de inox previamente esterilizada, foi coletado o volume de 250 mL de leite cru para um frasco plástico estéril, o qual foi acondicionado em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e em seguida encaminhado ao laboratório, para ser adequadamente identificado e aliqotado para as técnicas moleculares (Figura 1).



Figura 1: “A”, “B” e “C” amostras devidamente armazenadas, separadas e identificadas em laboratório. “D” e “E” amostras sendo aliquotadas em microtubos de 1,5mL, dentro da capela de fluxo previamente esterilizada por 15 minutos na luz UV, para serem submetidas a extração. Fonte: arquivo pessoal.

4.4 Exames Moleculares

4.4.1 Extração do leite para pesquisa de *Toxoplasma gondii*

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

4.4.2 Quantificação do DNA

Para verificação da quantidade de DNA em cada amostra, foi utilizado o aparelho Quantificador NanoVue Plus® da GE Healthcare, Bioscience/UK (ANEXO 3).

4.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) – primers TOX4/TOX5

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

extraído com a utilização dos *primers* TOX4 e TOX5, cujo perfil de ciclagem foi de acordo com Homan et al. (2000), com modificações.

Abaixo segue os *primers* utilizados e as condições de amplificação em termociclador Mastercycler Pro gradiente (Eppendorf®):

TOX4 - 5' (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) 3'

TOX5 - 5' (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) 3'

O ciclo de amplificação foi um período de desnaturação por 7 minutos a 94 °C, período de anelamento com 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C e 1 minuto em 72 °C. Ciclo de extensão final por 5 minutos a 72 °C. Após isso, a mistura foi refrigerada a 4 °C.

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

Para a detecção do DNA de *T. gondii* pela Nested PCR, foram utilizados os *primers* externos TgNN1/TgNN2 que hibridizam a região ITS1 comum a *T. gondii* e *Neospora caninum* (Hurtado et al., 2001). E *primers* internos TgNP1/TgNP2 que amplificam um fragmento de 227 pb da região ITS1 de *T. gondii*. O DNA de taquizoítos da cepa RH e água ultrapura foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente, e incluídos em todas as execuções de PCR (Santos Silva et al., 2020).

Abaixo segue os *primers* utilizados e as condições de amplificação em termociclador Mastercycler Pro gradiente (Eppendorf®):

NN1 - 5' (CCTTTGAATCCCAAGCAAAACATGAG) 3'

NN2 – 5' (GCGAGCCAAGACATCCATTGCTGA) 3'

TgNP1 – 5' (GTGATAGTATCGAAAGGTAT) 3'

TgNP2 – 5' (ACTCTCTCTCAAATGTTTCCT) 3'

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

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

O DNA de *T. gondii* foi detectado pela Nested PCR pelo gene do DNA ribossômico 18S (rDNA) do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae (*Eimeria* spp., *Hammondia* spp., *Isospora* spp., *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp. e *T. gondii*). A primeira reação de PCR foi realizada utilizando os *primers* externos Tg18s48F e Tg18s359R. Para a segunda reação, os *primers* internos utilizados

foram Tg18s58F e Tg18s348R que amplificam 300 pb (Su et al., 2010; Melo et al., 2020).

A mistura de amplificação consistiu em 0,5 µL de cada primer a 2 µM, 6,25 µL de GoTaqGreen Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 2,75 µL de água ultrapura e 2,5 µL de DNA em um volume final de 12,5 µL. O produto amplificado de aproximadamente 300 pares de bases foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Blue Green (LGC Biotechnology), e então fotodocumentado (Loccus - L-PIX EX) (Su et al., 2010; de Oliveira et al., 2021).

Abaixo segue os *primers* utilizados e as condições de amplificação em termociclador Mastercycler Pro gradiente (Eppendorf®):

Tg18s48F - 5' (CCATGCATGTCTAAGTATAAGC) 3'

Tg18s359R - 5' (GTTACCCGTCCTACTGCCAC) 3'

Tg18s58F - 5' (CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC) 3'

Tg18s348R - 5' (TGCCACGGTAGTCCAATAC) 3'

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

4.4.6 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de tampão de corrida (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água ultrapura) e submetidas à eletroforese em cuba horizontal contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A identificação dos produtos amplificados foi feita em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Syber Safe® (Invitrogen) 0,1 µL/mL. A voltagem utilizada foi de 100V por 90 minutos (1h30min). Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger 100 bp DNA Ladder (Norgen) e o tamanho dos fragmentos amplificados, foram comparados visualmente com os padrões de peso molecular das cepas padrão utilizadas como controles positivos com o uso de luz UV e a imagem capturada pelo sistema Major Science™, a qual foi documentada utilizando-se o software Vision Works LS.

4.4.7 Controles

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

4.5 Sequenciamento

O produto da cPCR e Nested PCR foi purificado com a enzima ExoSap (USB) e utilizado 4 µL da enzima para cada 10 µL de produto da PCR, incubando

inicialmente durante 1 hora a 37 °C e depois por 20 minutos a 80 °C, e posteriormente quantificado em espectrofotômetro. As reações de sequenciamento foram realizadas na Genotyping - BPI diagnóstico genético, de Botucatu. Os *amplicons* foram visualizados, pelo software Chromas 2.3, na forma de eletroferograma alinhados pelo programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 10.0 (Kumar et al., 2018). Posteriormente, submetidos ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparados com as sequências depositadas nos bancos de dados.

4.6 Análise espacial

Através de uma base de dados digital, a análise espacial foi realizada a partir do mapeamento dos municípios das propriedades com amostras de leite positivas, visando compreender espacialmente a distribuição de casos positivos na área de estudo. Para isso, foi utilizado o instrumento de Sistema de Informação Geográfica (SIG), utilizando o software QGis 3.24.1.

4.7 Análise Estatística

Como análise estatística, foi feito o Teste Q de Cochran para testar se três ou mais conjuntos combinados de frequências ou proporções diferiam significativamente entre si. Neste caso, possibilitou testar se os três *primers* utilizados diferiam para as 102 amostras (Santos; Cunha, 2013).

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Extração e quantificação das amostras

As 102 amostras de leite foram extraídas (Figura 2) e quantificadas (ANEXO 3) pelo Quantificador NanoVue Plus® da GE Healthcare, Bioscience/UK.

A relação 260/280, por estar entre 1.800 e 2.000, indica a confiabilidade no processo de extração do DNA das amostras de leite, evidenciando pouca ou nenhuma interferência de inibidores. A quantidade de DNA encontrada em cada amostra quantificada foi considerada satisfatória para dar seguimento as etapas da biologia molecular.



Figura 2: “A” e “B” amostras de leite submetidas a extração do DNA. “C” e “D” quantificação das amostras extraídas. Fonte: arquivo pessoal.

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

Foram submetidas 306 amostras à técnica de PCR convencional (cPCR) para os *primers* TOX4 e TOX5, ou seja, as 102 amostras de leite foram

submetidas à cPCR em triplicatas com o objetivo de aumentar o valor amostral e, conseqüentemente, ter resultados favoráveis na estatística. Como resultado, cinco amostras foram positivas à cPCR para os *primers* TOX4 e TOX5 (Figuras 3 a 7).



Figura 3: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L15): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L16): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 4: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostras 23, 30 e 32 amplificaram ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L22): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L23 e L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 5: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 6: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 7: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. No gel 1, amostra 91 amplificou levemente e no gel 2, amplificou a amostra 99 ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Gel 1: Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*; Controle negativo (L24): água ultrapura. Gel 2: Controle positivo (L15): cepa RH de *Toxoplasma gondii*; Controle negativo (L16): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.

Do total das 102 amostras, obteve-se cinco (05) amostras (4,90%) de leite positivas quando submetidas aos *primers* TOX4 e TOX5. Quando feitas em triplicatas, elas amplificaram fracamente, descartando-se possível contaminação e confirmando as amostras como positivas para *T. gondii*. Devido à baixa qualidade do DNA destas amostras, não houve sucesso para o sequenciamento genético. As amostras positivas eram provenientes dos municípios de Avaré, Anhembi e Botucatu/SP.

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

Foram submetidas 306 amostras à técnica de Nested PCR para os *primers* NN1 e NN2 seguidos pelo TgNP1 e TgNP2, ou seja, as 102 amostras de leite foram realizadas em triplicatas com o objetivo de aumentar o valor amostral e, consequentemente, ter resultados confiáveis e favoráveis à estatística. Como resultado, treze amostras (12,74%) foram positivas à PCR.

Inicialmente, foi possível visualizar que do total das 102 amostras, nove (09) amplificaram fortemente quando submetidas a Nested PCR (Figuras 8 e 9), sendo as demais negativas (Figura 10). Destas nove amostras, foi possível a realização do sequenciamento genético em apenas uma, referente ao número 32.



Figura 8: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostras 1, 3, 23, 27, 29 e 32

amplificaram ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L35): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L36): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.

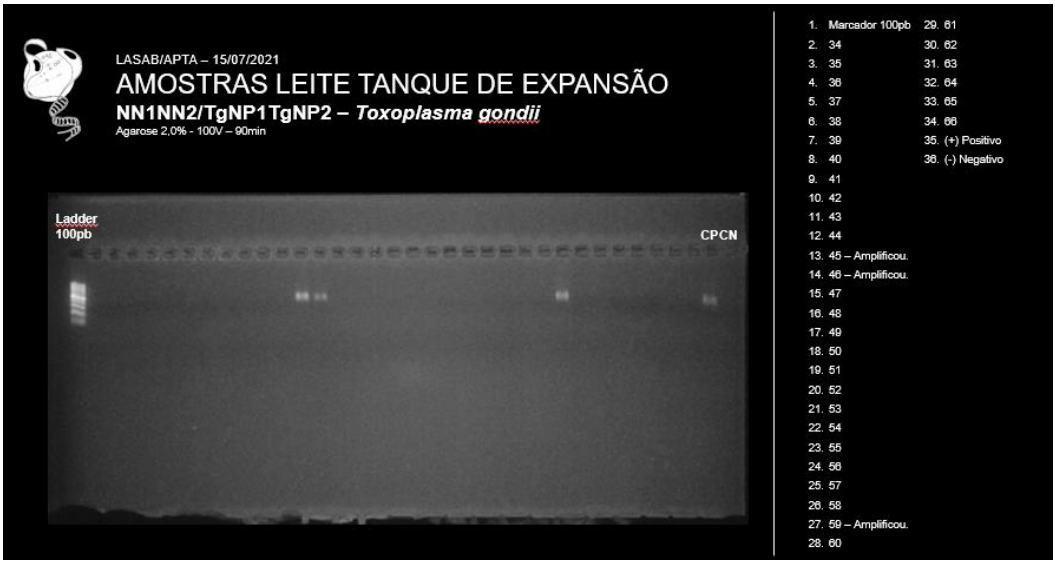


Figura 9: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostras 45, 46 e 59 amplificaram ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L35): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L36): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 10: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Nenhuma amostra foi positiva ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Gel 1: Controle positivo (L35): cepa RH de *Toxoplasma gondii*; Controle negativo (L36): água ultrapura. Gel 2: Controle positivo (L5): cepa RH de *Toxoplasma gondii*; Controle negativo (L6): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.

Quando realizada a duplicata e triplicata das amostras, embora obtendo-se uma amplificação fraca, foi possível visualizar quatro amostras positivas: 21, 22, 31 e 43 (Figuras 11 a 13). Todas as demais foram negativas aos *primers* TgNP1 e TgNP2 (Figuras 14 e 15).



Figura 11: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostra 21 amplificou ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 12: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostras 22 e 31 amplificaram ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.

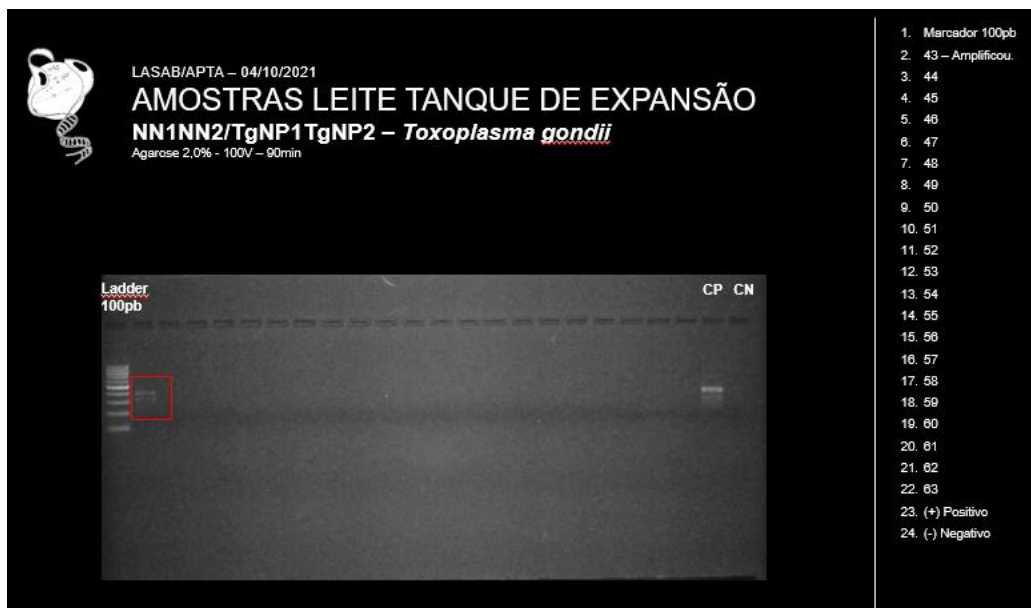


Figura 13: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Amostra 43 amplificou ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 14: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 15: Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (Linha (L) 1). Amostras de leite de bovinos. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 227 pb de *Toxoplasma gondii*. Controle positivo (L23): cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Controle negativo (L24): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.

Das 102 amostras, 13 amostras (12,74%) pertencentes às propriedades localizadas em Avaré e Arandu/SP, foram positivas à Nested PCR, porém somente quatro foram possíveis de obter resultados do sequenciamento. Portanto, as amostras 21, 31, 32 e 43 foram submetidas ao sequenciamento genético, sendo todas elas pertencentes ao município de Avaré/SP.

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

Foram submetidas 102 amostras à técnica de Nested PCR para os *primers* Tg18s48F e Tg18s359R seguidos pelo Tg18s58F e Tg18s348R. Como resultado, três (3) amostras foram positivas à PCR: 21 (Avaré/SP), 73 e 81 (Pardinho/SP). Entretanto devido a viabilidade do DNA só foi possível o sequenciamento da amostra 21 que confirmou o DNA de *T. gondii*, sendo a mesma proveniente do município de Avaré/SP. As demais não foram consideradas como positivas de *T. gondii*, pois este gene detecta a região 18S rDNA do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae. Portanto, somente uma (01) amostra (0,98%) foi positiva para *T. gondii* com os genes Tg18s58F e Tg18s348R.

O percentual de positividade segundo os *primers* utilizados pode ser visualizado no Gráfico 1 (ANEXO 5).

5.5 Sequenciamento

Os *amplicons* foram visualizados, pelo software Chromas 2.3, na forma de eletroferograma (ANEXO 4) alinhados pelo programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 10.0 (Kumar et al., 2018). Posteriormente, submetidos ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparados com as sequências depositadas nos bancos de dados.

Como resultado das amostras positivas ao gene TgNP1 e TgNP2, a amostra 21 obteve 98,65% de similaridade ao *T. gondii* (**chave de acesso:**

MH793505.1), amostra 31 com 99,32% de similaridade (**chave de acesso: MH793505.1**), amostra 32 com 97,96% de similaridade (**chave de acesso: MH793505.1**) e amostra 43 com 97,95% (**chave de acesso: MH793505.1**).

A amostra 21 foi positiva com os *primers* Tg18s58F e Tg18s348R, detectando 100% de similaridade a *T. gondii* (**chave de acesso: KX008033.1**).

5.6 Análise espacial

Foi realizada a análise espacial dos municípios das propriedades leiteiras avaliadas e que foi possível detectar *T. gondii* no leite do tanque, tendo-se verificado a positividade nos municípios de Avaré, Anhembi, Arandu e Botucatu. Os mapas com as localizações geográficas estão apresentadas a seguir.



Figura 16: Mapa do Brasil. Qgis.



Figura 17: Mapa do Estado de São Paulo, Brasil. Qgis.

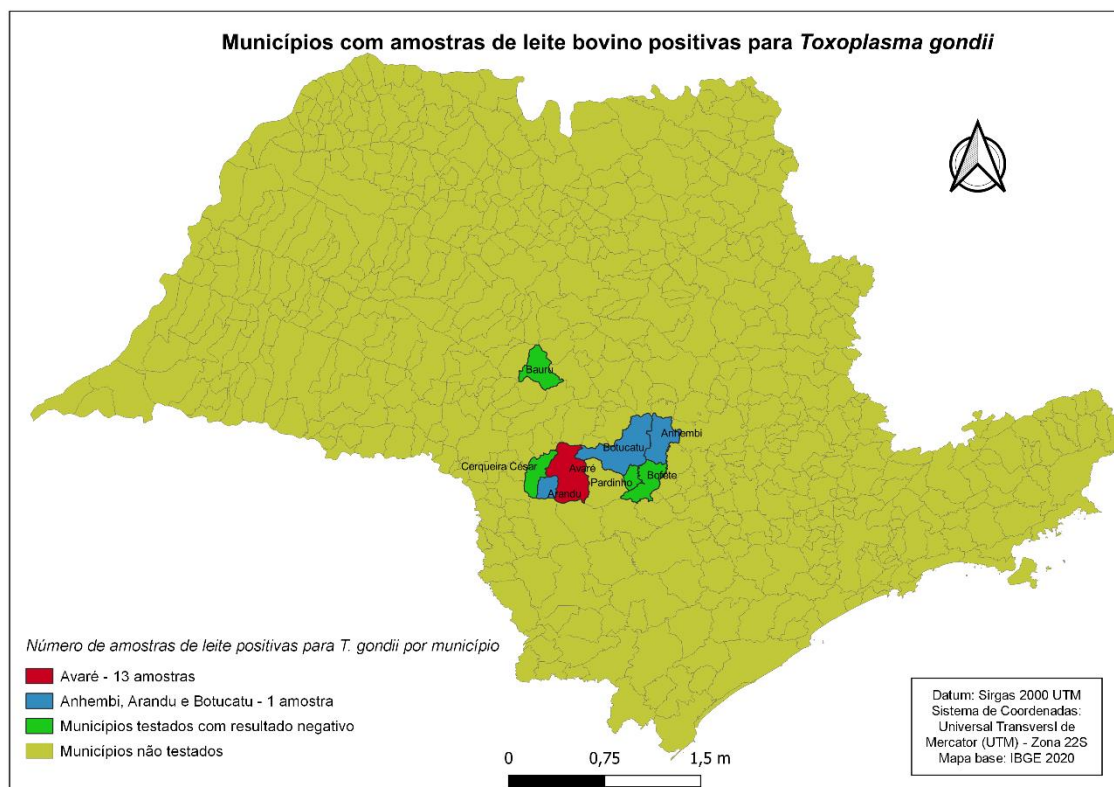


Figura 18: Mapa dos municípios com amostras de leite bovino positivas para *Toxoplasma gondii*.

Municípios com amostras de leite bovino positivas para os primers TOX4/TOX5

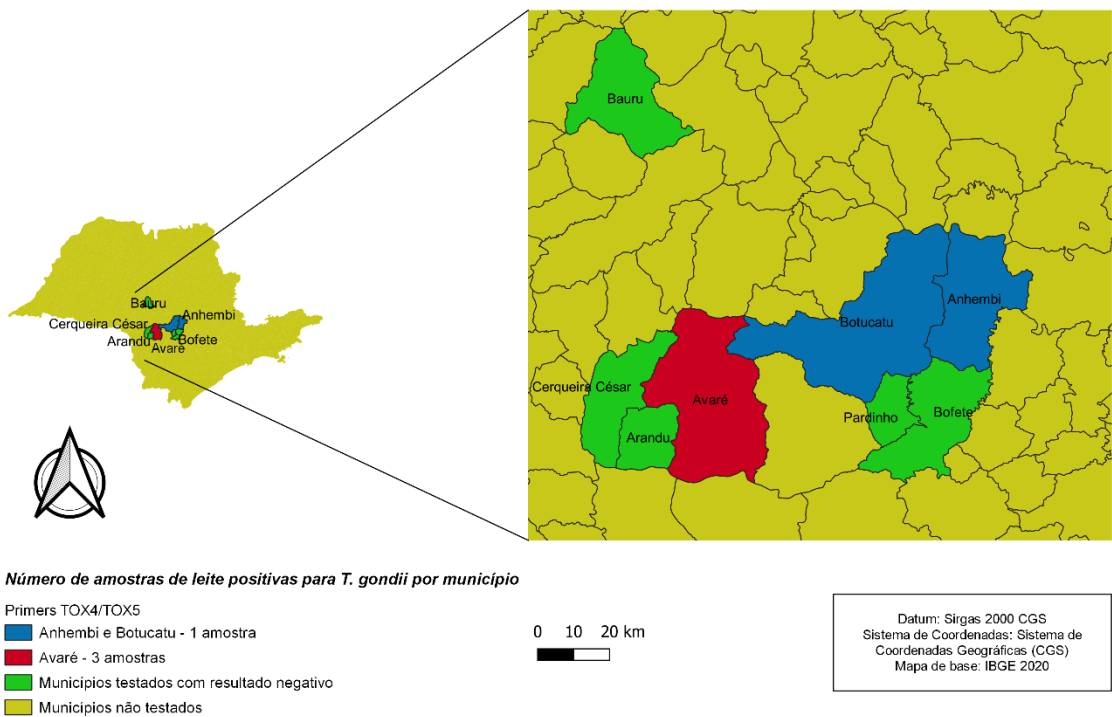


Figura 19: Municípios com amostras de leite bovino positivas para os *primers* TOX4/TOX5 – cPCR.

Municípios com amostras de leite bovino positivas para os primers TgNP1/TgNP2 - Nested PCR

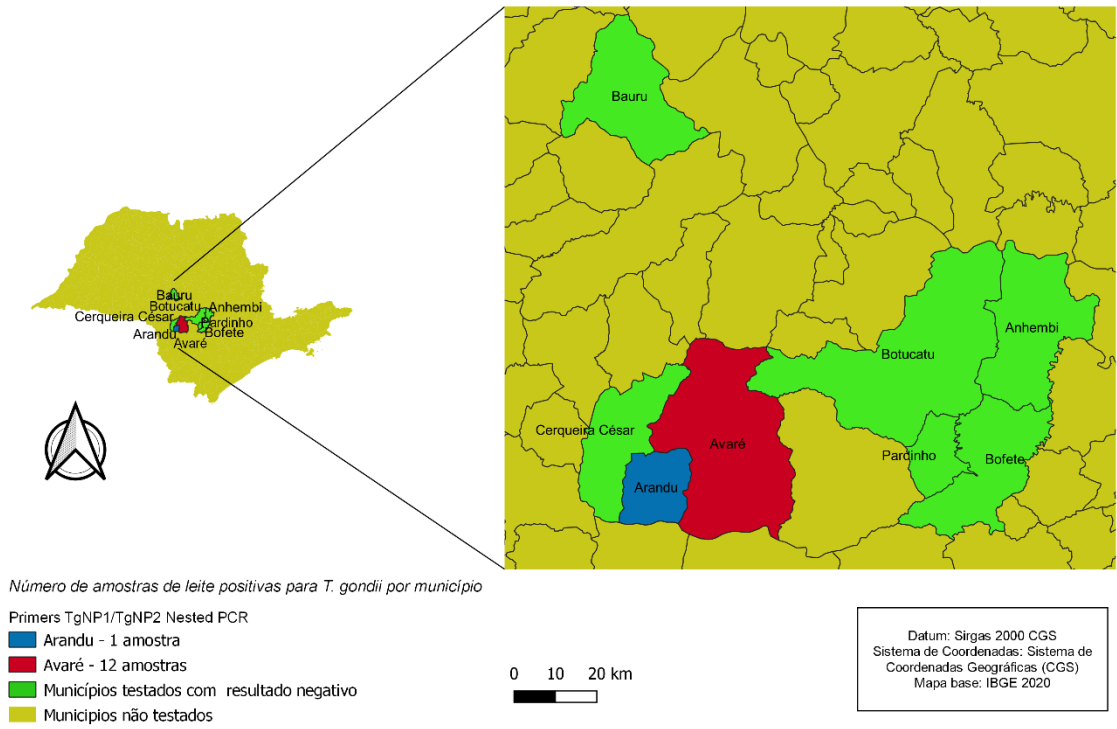


Figura 20: Municípios com amostras de leite positivos para os *primers* TgNP1 e TgNP2 – Nested PCR.

Municípios com amostras de leite bovino positivas para os primers Tg18s48/Tg18s359 - Nested PCR - Filo Apicomplexa

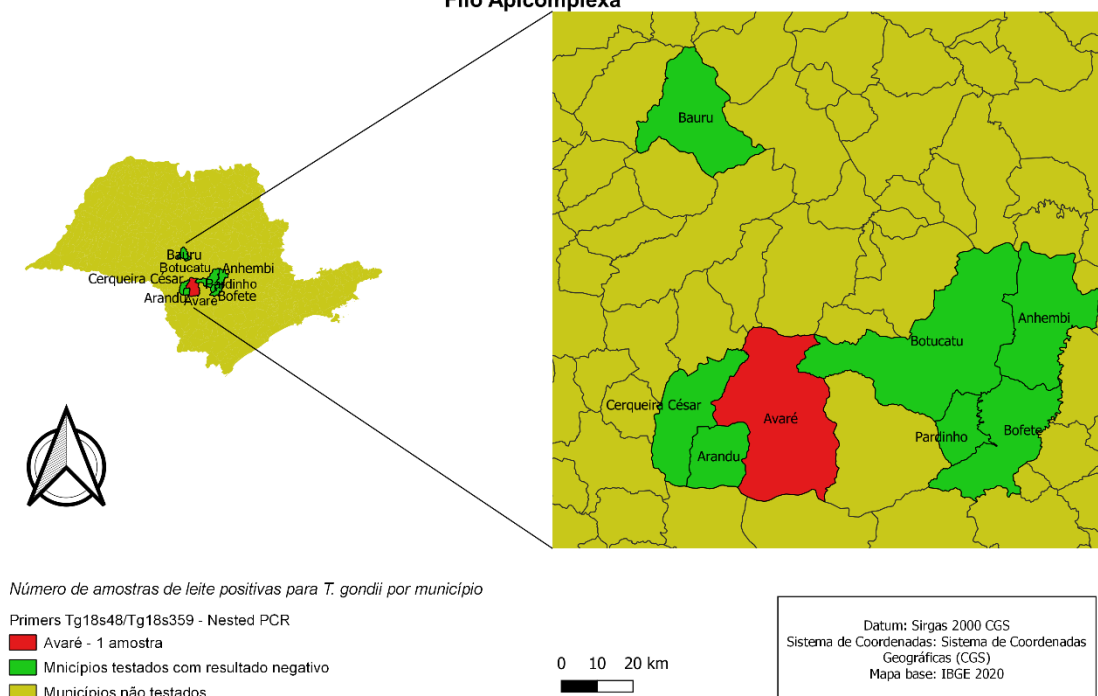


Figura 21: Municípios com amostras de leite bovino positivas para os *primers* Tg18s48 e Tg18s359 – Nested PCR – Filo Apicomplexa.

5.7 Análise estatística

Como resultado, o Teste de Cochran demonstrou que o *primer* TgNP1/TgNP2 (*primer* 2) diferiu do gene Tg18s58F/Tg18s348R (*primer* 3), porém o *primer* TOX4/TOX5 (*primer* 1) não diferiu dos *primers* 2 e 3, o qual apresentou um valor intermediário. Desta forma, $p < 0,0001$ indica diferença estatisticamente significativa (ANEXO 5).

DISCUSSÃO

6 Discussão

Há poucos relatos na literatura, a respeito da infecção humana por *T. gondii* pela ingestão de leite cru e seus derivados. Para fundamentar este trabalho, foram utilizados artigos de pesquisa sobre a infecção por *T. gondii* a partir do leite bovino, bem como estudos evidenciando a soroprevalência em bovinos. Estudos com o leite caprino também foram citados e utilizados como parâmetros de discussão, tendo em vista que há uma maior quantidade de trabalhos com esta espécie.

No presente estudo, das 102 amostras de leite, foi possível detectar o DNA de *T. gondii* em 19 (18,63%) amostras, sendo possível obter o sequenciamento genético de cinco (4,90%) devido a baixa qualidade do DNA para esta análise em específico, considerado como fator limitante do trabalho. A amostra 21 estava adequada para o sequenciamento com os *primers* TgNP1/TgNP2 e Tg18s48F/Tg18s359R, tendo-se confirmado tratar-se de *T. gondii*, com 100% de similaridade.

Deve-se ressaltar que as amostras de leite deste estudo foram reaproveitadas para esta pesquisa, devido a restrição à ida para propriedades leiteiras e coleta de material, pela pandemia de COVID-19. Não obstante, não houve prejuízo dos resultados obtidos tendo em vista que a quantificação de DNA das amostras esteve adequada para o seguimento das provas moleculares e detecção de amostras positivas para *T. gondii*.

O leite é tido como alimento completo, principalmente para crianças e

idosos, devido ao seu alto teor de proteínas, minerais, gorduras e vitaminas. Pelo fato do leite ou seus derivados serem consumidos por milhões de pessoas ao dia, a qualidade higiênica do mesmo é de grande importância na saúde pública, pois podem causar infecções ao homem e animais (Górska-Warsewicz et al., 2019).

Nos Estados Unidos, *T. gondii* é a terceira causa de morte de origem alimentar (Dehkordi et al., 2013). Na Europa, estima-se que *T. gondii* contribuiu com 17,6% para a carga total de doenças transmitidas por alimentos em 2010 (Azevedo Filho et al., 2020). No Brasil, entre janeiro de 2000 a março de 2013, ocorreram mais de 8.000 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), desse total o *T. gondii* foi responsável por cinco surtos e o leite e seus derivados veicularam os patógenos causadores de 337 surtos de DTA (Silva et al., 2015). Assim, a toxoplasmose de origem alimentar é caracterizada como doença parasitária de origem alimentar mais importante com 10,3 milhões de casos entre 2010 e 2015 (Rouatbi et al., 2020).

A presença de DNA de *T. gondii* no leite de vaca não confirma a viabilidade do parasita. No entanto, levanta a possibilidade de que a transmissão ocorra pelo consumo do leite cru e seus subprodutos, principalmente na região estudada. Ainda são escassos os estudos que investigam esse aspecto na literatura, entretanto pode-se atribuir a infecção por *T. gondii* em humanos à ingestão de leite contendo taquizoítos do parasita (Camossi et al., 2011; Bezerra et al., 2013). Assim, o leite de vaca é relevante para a saúde pública, uma vez que o leite e

seus derivados são importantes fontes alimentares no meio rural, áreas em que o leite é usado para subsistência sem pasteurização ou fervura antes do consumo (Camossi et al., 2011).

A transmissão da toxoplasmose por leite ou queijo fresco não pasteurizado ou processado de forma inadequada, importante fonte de alimentos em áreas rurais e também comercializado em área urbana, pode ser um meio significativo de contaminação por esse agente e isso foi possível identificar num estudo feito por Hiramoto et al. (2001) que mostraram a sobrevivência dos cistos de *T. gondii* no leite bovino e em seu derivado, o queijo fresco. Os pesquisadores contaminaram leite pasteurizado com cistos da cepa ME-49 de cérebro de camundongos previamente infectados e inocularam por via oral em camundongos. Além disso, o mesmo estudo utilizou queijos artesanais e leite pasteurizado contaminados com cistos da mesma cepa e alimentaram camundongos, os quais foram monitorados por 40 dias após ingestão. Como resultados, 12 ratos morreram pela ingestão dos cistos no leite e foram observados sintomas neurológicos após 20 a 30 dias da infecção. Cistos de *T. gondii* foram encontrados no cérebro de todos os camundongos dos grupos que receberam queijo tipo minas frescal artesanal (Hiramoto et al., 2001).

Esses dados evidenciam que o leite e o queijo caseiro podem manter a infectividade dos cistos de *T. gondii* por períodos de até 10 dias para o queijo caseiro e até 20 dias para o leite. A transmissão do parasito para o ser humano ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contaminados com cistos em

espécies caprinas, ovinas, suínas, bovinas, com surtos relacionado principalmente à ingestão de carne malcozida. Poucos surtos estão atribuídos à ingestão de leite bovino, apesar do *T. gondii* ter sido isolado no leite de vacas naturalmente infectadas. A ingestão de leite cru tem sido considerada uma possível fonte de transmissão do *T. gondii*, sendo frequentemente relatada na literatura infecções do coccídeo causadas pelo leite de cabra (Hiramoto et al., 2001).

Leite e queijo são uma das principais fontes de proteínas para crianças, e o queijo é uma forma barata e fácil de obter proteínas alimentares. *T. gondii* é destruído após a pasteurização quando exposto a temperaturas maiores que 70 °C por 10 min, mas a pasteurização pode não ser apropriada, em locais onde o leite é processado em grandes volumes e sem temperatura adequada, tornando-se um problema. A produção de queijo após a fervura é um processo demorado e caro, principalmente em pequenas propriedades, apesar de sua eficiência na eliminação desse contaminante (Hiramoto et al., 2001). Este fato é uma condição para que os derivados do leite, principalmente queijo e manteiga artesanais, sejam produzidos com leite cru, o que representa um risco para a saúde pública.

Dehkordi et al. (2013) e Koethe et al. (2017) também demonstraram que o consumo de leite contaminado pelo *T. gondii* pode causar doenças em humanos, pois o leite e derivados dos animais afetados contém taquizoítos, o que facilita a transmissão da infecção.

Dehkordi et al. (2013) detectaram 66 bovinos leiteiros sororreagentes ao

coccídeo, bem como detectaram o DNA do mesmo pela técnica de PCR, destacando que o leite pode ser facilmente contaminado com taquizoítos de *T. gondii*.

Koethe et al. (2017) realizaram um estudo o qual simulou o fluido gástrico do estômago para analisar a sobrevivência do *T. gondii* em sua forma de taquizoíta. Para isso, o fluido gástrico continha 2,6 g de pepsina, 5,0 g de NaCl e água destilada por 500 ml. O valor de pH do fluido foi ajustado para 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 e para isso, foi usado o NaHCO₃ ou HCl. O leite bovino comercial foi adicionado ao fluido nas seguintes quantidades, 25, 50 ou 75%. Após isso, foi possível notar que os taquizoítos morreram rapidamente em fluido gástrico com pH baixo e em pH alto (pH=2), perdendo a capacidade de infectar culturas de células cujo pH era alto.

A adição do leite bovino ao fluido gástrico causou um aumento nos valores de pH de 4,8, 5,8 e 6,3, visto que o pH do leite puro era de 6,6. Os taquizoítos colocados ao fluido puro de pH 2,0, foram todos inativados em 15 min. Pouco suplemento como 25% do leite ao fluido ácido e o aumento do pH, manteve a infecciosidade por pelo menos 120 min.

Altas concentrações de leite resultaram em culturas de células positivas e reações de PCR em qualquer momento de incubação. Na taxa de 75%, a sobrevivência dos taquizoítos no leite foi observada após 15 e 30 minutos, mas uma cultura de células foi negativa após 60 min, resultando na completa inativação de todos os taquizoítos naquela amostra. No leite puro, todas as

amostras mantiveram a infecciosidade por pelo menos 60 min., aumentando a infecciosidade devido ao aumento do pH que foi acompanhada pela adição de leite.

Os autores compararam e consideraram a mistura do leite ingerido com o fluido gástrico no estômago e as mudanças dos meios analisados (como o pH do estômago com a ingestão de alimento que é de 7 e quando em jejum ou sem comer por algum tempo o pH diminui para o ácido), assim sugeriram que quando os taquizoítos são ingeridos pelo leite não são expostos diretamente ao fluido gástrico ácido, mas sim a valores de pH mais altos, o que favorece a sobrevivência dos parasitos por pelo menos uma hora (60min). Desta forma, a passagem dos taquizoítos pelo estômago pode acontecer e assim, serão capazes de infectar células do intestino do indivíduo (Koethe et al., 2017).

Um estudo feito na Polônia, que objetivou determinar a presença de protozoários no leite cru e avaliar a rota potencial transmitida pelo leite na disseminação de patógenos zoonóticos selecionados, detectou o DNA do *T. gondii* pela técnica de PCR em 10 amostras do total de 63 amostras de leite bovino. O estudo citado corrobora com o presente estudo, visto que também sugere um risco potencial de infecção pelo coccídeo transmitido pelo leite, principalmente pelo consumo de leite cru bovino (Cisak et al., 2017).

A pesquisa realizada por Da Costa et al. (2019) em Montes Claros de Goiás, Brasil, investigou a origem de um surto de toxoplasmose ocorrido em 2016 e foi considerado o primeiro surto associado ao consumo de queijo fresco

artesanal, produzido com leite bovino. Para tanto, foram coletadas nove amostras, sendo duas de queijo (uma de laticínios e uma de feirinha), quatro de alface (duas de feirinha e duas de cada horta), duas de água de irrigação (uma de cada horta) e uma amostra da rede municipal de abastecimento de água. O queijo fresco artesanal de leite cru bovino era consumido por 78,6% (11/14) dos indivíduos participantes, por isso era a via mais suspeita, seguido das verduras. No estudo de caso-controle, a única variável significativa foi o consumo de queijo fresco artesanal de leite cru bovino. Como resultado, todas as amostras de queijo fresco artesanal (laticínios e feiras de produtores) foram positivas à PCR e em uma amostra de irrigação foi detectada o DNA do *T. gondii* (Da Costa et al., 2019). Em vista disso, esses dados reforçam a importância dos resultados encontrados no presente estudo.

Da Costa et al. (2019) enfatizaram a importância do reconhecimento dos sinais clínicos para toxoplasmose, sendo os mais frequentes a cefaleia, mialgia, febre, linfadenopatia, alterações oftálmicas e aborto. Embora os sinais sejam inespecíficos e serem confundidos com outras patologias, há a reprodutibilidade no padrão de sintomas clínicos entre os surtos e, quando reconhecidos, possam auxiliar no diagnóstico precoce da doença pela Vigilância Sanitária. Assim, o rápido reconhecimento de um surto, além da notificação e investigação, pode quebrar a cadeia de transmissão e prevenir o surgimento de novos casos, bem como adoção de boas práticas na fabricação de alimentos podem evitar a ocorrência de surtos causados por *T. gondii* (Da Costa et al., 2019).

Ressalta-se que pacientes imunocompetentes geralmente são assintomáticos quando infectados pelo *T. gondii*; entretanto, em indivíduos imunocomprometidos, os casos tendem a assumir manifestações clínicas mais graves. Outro grupo de risco importante, são as mulheres grávidas, pois a transmissão vertical pode desencadear patologias fetais ou aborto (Da Costa et al., 2019).

No oeste do Irã, na província de Hamedan, foi feito um estudo que pesquisou a soroprevalência de *T. gondii* em amostra de leite de vaca provenientes de tanque de expansão, o qual todas as amostras foram submetidas às técnicas de sorologia e molecular, ELISA e PCR respectivamente. Referente a sorologia, 16 (10,7%) amostras foram positivas ao *T. gondii* e para a biologia molecular, 8 (5,4%) amostras de 149 foram positivas (Gharekhani et al., 2021).

Os bovinos podem ser facilmente infectados com *T. gondii*, mas são considerados hospedeiros resistentes, porque desenvolvem uma resposta imune mais eficaz à infecção do coccídeo do que ovinos (Dong et al., 2018). No entanto, na China, Dong et al. (2018) isolaram *T. gondii* de tecidos de bovinos e a partir de leite não pasteurizado, indicando que além da carne, o leite contaminado pode ser fonte de infecção ao ser humano (Dong et al., 2018). Além disso, diversos estudos (Albuquerque et al., 2011; Burrells et al., 2018; Khames et al., 2018; Sah et al., 2018; Tialla et al., 2019; Pereira et al., 2020; Gomes et al., 2021) demonstraram a soroprevalência do coccídeo nos bovinos, salientando a

relevância desta espécie na epidemiologia da toxoplasmose animal e humana e, assim, alertando sobre os riscos à saúde pública (Gomes et al., 2021).

Os bovinos não são os hospedeiros primários de *T. gondii* e a alta prevalência desse parasita nesta espécie sugere o contato próximo desses animais com felinos, sobretudo com felídeos domésticos infectados por serem os únicos hospedeiros definitivos (Dehkordi et al., 2013), ou seja, são os únicos que liberam oocistos de *T. gondii* em suas fezes no ambiente (Albuquerque et al., 2011). Deste modo, os felinos são responsáveis pela maior parte da eliminação e disseminação dos oocistos, os quais liberam mais de 200 milhões de oocistos de *T. gondii* no meio ambiente (Da Costa et al., 2019), bem como pela manutenção do ciclo de vida deste parasita (Azevedo Filho et al., 2020).

Os gatos costumam enterrar suas fezes e, se estas estiverem contaminadas com oocistos de *T. gondii* que são altamente resistentes a fatores ambientais, podem esporular e sobreviver em ambientes úmidos por vários meses no solo (Azevedo Filho et al., 2020). Portanto, quanto maior for o número de gatos na fazenda, aumentam as chances de se ter um ambiente contaminado e, assim, resulta na infecção dos bovinos (Albuquerque et al., 2011).

Da Costa et al. (2019), ao avaliarem o sistema de produção de queijo, concluíram que o acesso a gatos domésticos ou selvagens da mata próxima, foram fatores essenciais para a contaminação do ambiente. Além disso, o leite não era pasteurizado e não havia boas práticas de fabricação, reduzindo a qualidade higiênico-sanitária do produto.

As práticas sanitárias também contribuem para variações na prevalência de infecção por *T. gondii* entre as regiões coletadas, porque as baixas frequências de infecção por este parasito estão associadas com rebanhos que apresentam práticas sanitárias adequadas, o que inclui o controle de gatos e roedores. Além do mais, a maior frequência de animais soropositivos está relacionada à prática de manejo a que esses animais são submetidos e aos hábitos alimentares de pastejo direto no solo, tornando-os mais propensos a ingerir alimentos contaminados com oocistos de *T. gondii* (Silva et al., 2015).

Um estudo realizado na África do Sul, que documentou a primeira infecção por *T. gondii* em bovinos, confirma que a existência de gatos domiciliados que vivem livremente, mas próximos às casas e o potencial de acesso deles à alimentação animal, estava associado a alta prevalência de detecção de anticorpos do parasito nos bovinos (Adesiyun et al., 2020).

A eliminação de oocistos por gatos e a presença de roedores representaram um papel significativo na disseminação da infecção nas áreas ao redor das fazendas leiteiras no Irã. A infecção por *T. gondii* em fazendas analisadas com a presença de gatos e roedores foi significativamente maior do que em outras fazendas (Gharekhani et al., 2021).

Outro fator importante é que a alta prevalência do *T. gondii* está associada a sazonalidade, especificamente no verão (Dehkordi et al., 2013), o que corrobora com os resultados do presente estudo, visto que as amostras de leite foram coletadas entre março a junho, pertencentes a estação de verão e outono.

Isso acontece porque o coccídeo necessita de clima quente, úmido e altitudes mais baixas para completar seu ciclo de vida (Dong et al., 2018).

Dehkordi et al. (2013) revelaram que as amostras de leite coletadas no verão (76,47%) seguidas das coletadas na primavera (11,76%) apresentaram maior prevalência do *T. gondii* do que as amostras coletadas no inverno (3,92%), seguidas das coletadas no outono (5,88%). Em vista disso, Dehkordi et al. (2013) sugerem que a inspeção e o controle do leite para a presença do *T. gondii* sejam efetivos na época do verão.

Silva et al. (2015) realizaram uma pesquisa em laboratório e mostraram que os oocistos retêm seu potencial infeccioso por até 30 dias a uma temperatura média de 37 °C ou até 46 dias em ambiente controlado com ar-condicionado, exposição ao sol e temperatura de 20 °C. No campo, os oocistos podem permanecer infectantes por até 18 meses, se houver condições favoráveis de temperatura, alta umidade e oxigenação (Silva et al., 2015). Oliveira et al. (2021) ao avaliarem as condições ambientais da região de estudo, observaram que temperaturas entre 28,9 °C e 30,3 °C do solo, permitem que os oocistos permaneçam viáveis por até 107 dias.

Casos de toxoplasmose decorrentes do contato com oocistos presentes no ambiente foram descritos em humanos e animais, o que impacta no problema de Saúde Única (One Health) por causar problemas na saúde humana, animal e ambiental, conhecida como tríade epidemiológica (de Oliveira et al., 2021).

O tipo de sistema de criação também influencia na presença do *T. gondii*

no meio ambiente e sua possível infecção nos bovinos e animais de produção em geral, pois o sistema de criação semi-intensivo e extensivo está relacionada a maior soropositividade em relação ao sistema intensivo, o que se deve ao maior risco dos animais ingerirem oocistos presentes nas pastagens e se infectarem (De Barros et al., 2020).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um grande avanço para o diagnóstico da infecção por *T. gondii*. Vários estudos demonstraram maior acurácia, sensibilidade e especificidade da técnica de PCR quando comparados a outras metodologias tradicionais (Dehkordi et al., 2013). Ademais, o diagnóstico pode ser confirmado em um dia, havendo maior possibilidade de detecção de pequenas quantidades de DNA alvo e, potencialmente, fornecem uma ferramenta de diagnóstico sensível alternativa (Sah et al., 2019). Assim, a detecção do *T. gondii* pela biologia molecular indica a existência de contaminação ambiental na região e demonstra a circulação do parasita (Santos Silva et al., 2020).

O uso dos *primers* TOX4 e TOX5 é bem descrito na literatura e comumente usados na detecção do *T. gondii* pela PCR convencional. Além de confirmar a especificidade e sensibilidade no presente estudo, foi possível visualizar tal afirmação em Bezerra et al. (2013), o qual detectou o parasito em amostras de leite de cabra, bem como em Santana Rocha et al. (2015) com amostras de leite de ovelhas positivas ao coccídeo. Portanto a PCR é vista como um bom indicador para detectar a presença do parasita em amostras de leite

(Ossani et al., 2017).

A complementação da Nested PCR com os genes NN1 e NN2 seguidos pelo TgNP1 e TgNP2, o qual amplifica 227 pb da região RH ITS1 do *T. gondii*, mostrou resultados mais satisfatórios do que quando submetidos aos iniciadores TOX4 e TOX5, portanto pode ser considerado mais sensível e específico para detectar o DNA do parasito. A alta especificidade dos *primers* também foi vista no trabalho de Hurtado et al. (2001) e Rouatbi et al. (2020) e deve-se ao número de cópias do gene amplificado porque a região ITS1 do rRNA do parasito, o qual é a região que os *primers* NN1 e NN2 seguidos pelo TgNP1 e TgNP2 amplificam, está presente num número elevado de cópias e, apesar de serem repetidos, os ITSs exibem variabilidade interespecífica, enquanto são altamente conservados dentro de uma espécie (Hurtado et al., 2001).

O uso dos *primers* externos Tg18s48F e Tg18s359R seguidos dos *primers* internos Tg18s58F e Tg18s348R para Nested PCR, que detecta a região do DNA ribossômico do filo Apicomplexa (18S rDNA) evidenciou confiabilidade no resultado devido a amostra 21 também ter sido positiva ao gene TgNP1 e TgNP2, o que diferenciou com os *primers* TOX 4 e TOX 5.

Su et al. (2010) realizaram um estudo que demonstrou que a Nested PCR de *T. gondii* utilizando o gene 18S do rDNA do filo Apicomplexa, da família Sarcocystidae, foi mais sensível. O marcador 18S rDNA é de particular interesse porque é capaz de distinguir vários protozoários parasitas que se relacionam ao *T. gondii*. Portanto, a Nested PCR é mais sensível que a PCR convencional

principalmente para detectar DNA de *T. gondii* (Su et al., 2010).

Contudo, deve-se atentar às medidas de prevenção pois há a possibilidade de contaminação, devido ao manuseio adicional de amplicons da Nested PCR, por ser realizada em duas etapas (Rouatbi et al., 2020). Portanto, o ambiente tem que estar asséptico, além da manipulação das amostras de pré e pós-amplificação que devem ser em áreas separadas (Hurtado et al., 2001), como foi realizado neste estudo.

Desta forma, a técnica de PCR identifica o DNA de taquizoítos do *T. gondii* no leite. O DNA deste parasito só pode ser identificado por um período médio de 12 a 15 dias após a infecção porque é o período em que os taquizoítos permanecem na corrente sanguínea e caracteriza uma infecção aguda. Após esse período, os taquizoítos convertem-se em bradizoítos e, assim, não são detectados nos fluidos corporais (Silva et al., 2015).

O uso de técnicas aprimoradas e mais sensíveis para a detecção molecular do DNA do parasita, em conjunto com o bioensaio em camundongos, pode fornecer novas informações sobre a disseminação, presença e viabilidade de *T. gondii* em bovinos (Burrells et al., 2018). As técnicas de ELISA e PCR são relatadas como métodos diagnósticos precisos, específicos, sensíveis, rápidos e seguros (Dehkordi et al., 2013). Assim, sugere-se novos estudos que associem técnicas moleculares, sorológicas e de bioensaio para compreender melhor a epidemiologia da toxoplasmose.

A análise do leite do tanque a granel ou de expansão (“bulk tank milk” -

BTM) é apontada como uma ferramenta diagnóstica válida em um programa de monitoramento ou investigação da saúde do rebanho, principalmente em uma perspectiva de grande escala, pois reduz os custos quando comparados com teste de amostras individuais de soro ou leite, além de ser de fácil obtenção e representar todos os animais de ordenha na fazenda no momento da amostragem para fins de levantamentos epidemiológicos e planejamento de controles de monitoramento por meio de repetidas coletas durante o período de lactação (Gazzonis et al., 2018).

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram a importância do repasse de informações por parte das autoridades sanitárias a fim de orientar os produtores de leite e derivados artesanais quanto a importância da fervura ou pasteurização, como forma de eliminar o risco de transmissão do *T. gondii*. Destaca-se a importância da realização de novos estudos para confirmar a quantidade e a viabilidade dos parasitas eliminados no leite (Bezerra et al., 2013). Além disso, estudos com infecções naturais são importantes em propriedades em que as famílias têm o costume de consumir leite cru bovino (Camossi et al., 2011). Outro fator é que, para garantir a segurança dos alimentos, é necessário o monitoramento contínuo da produção e manipulação de alimentos, além de treinamento aos produtores (Cisak et al., 2017).

O consumo de leite cru bovino ou de seus derivados produzidos com leite cru ou não pasteurizado, podem representar um risco à saúde pública, pois os taquizoítos, provavelmente presentes no leite, podem causar infecção

(Gharekhani et al., 2021). Em vista disso, o conhecimento sobre pontos críticos e fatores de risco desempenham um papel importante na prevenção e redução das infecções transmitidas pelo leite. A segurança e a qualidade do leite cru têm relação direta com os laticínios e com a saúde humana, visto que este leite pode estar contaminado com microrganismos zoonóticos patogênicos como *Yersinia enterocolitica* (Bertolini et al., 2019), *Brucella* spp., *Coxiella burnetti*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* spp., vírus da hepatite A e E, *Nocardia* spp., dentre outros além do *T. gondii* (Gharekhani et al., 2021).

A presença do *T. gondii* no leite bovino reforça a importância da adoção de medidas que contemplem as práticas de higiene na propriedade rural e o uso de tecnologias que garantam a produção de um alimento seguro (Silva et al., 2015). Tendo em vista que os fatores de risco são de natureza ambiental e de difícil controle, sugere-se investimento na educação em saúde para o controle e prevenção da infecção por este coccídeo (Gomes et al., 2021).

A partir da análise espacial possibilitou-se verificar que as amostras de leite positivas para *T. gondii* eram procedentes de propriedades localizadas nos municípios de Avaré, Anhembi, Arandu e Botucatu, o que demonstra a necessidade de mais estudos acerca da transmissão de *T. gondii* a partir do leite bovino.

Com os resultados obtidos neste trabalho, verificou-se a presença de *T. gondii* em leite bovino e que, desta forma, pode haver a possibilidade de transmissão deste agente para seus derivados não pasteurizados ou

processados inadequadamente, constituindo-se em uma importante fonte de infecção de *T. gondii* ao ser humano. Ressalta-se a importância de realizar futuros estudos com leite bovino referente a infecção pelo *T. gondii* e sua possível transmissão, devido a escassez de estudos na literatura com esta espécie, sendo mais relatado pesquisas com leite caprino. Outra prova diagnóstica, como o bioensaio em animais de experimentação, seria oportuna para validar a capacidade de infecção destas amostras.

CONCLUSÃO

7 Conclusão

- Foi possível detectar o DNA de *T. gondii* em amostras de leite bovino procedentes de pequenas propriedades de agricultura familiar;
- As técnicas moleculares de PCR convencional e Nested foram eficientes na detecção de *T. gondii* em amostras de leite bovino de tanques de expansão;
- O sequenciamento genético confirmou a detecção de *T. gondii* nas amostras de leite positivas às provas moleculares;
- A distribuição geográfica dos municípios em que foi possível a detecção de *T. gondii* revelou o município de Avaré com maior número de amostras positivas.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADESIYUN, A. A.; KNOBEL, D. L.; THOMPSON, P. N.; WENTZEL, J.; KOLO, F. B.; KOLO, A. O.; CONAN, A.; SIMPSON, G. J. G. Sero-Epidemiological Study of Selected Zoonotic and Abortifacient Pathogens in Cattle at a Wildlife-Livestock Interface in South Africa. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. Volume XX, Number XX. 2020. Doi: 10.1089/vbz.2019.2519

ALBUQUERQUE, G. R.; MUNHOZ, A. D.; TEIXEIRA, M.; FLAUSINO, W.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. G. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in dairy cattle, State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 31(4):287-290. 2011.

AZEVEDO FILHO, P. C. G.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; SANTOS, J. F.; REIS, A. C.; VALENÇA, S. R. F. A.; FERNANDES, E. F. T. S.; JUNIOR, J. W. P.; MOTA, R. A. Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cattle from Amazonas, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**. 176; 104885. 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104885>

BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; GERMANO, P. M. Health risk due to the consumption of raw milk commercialized without due authorization. **Revista Saude Pública**. 30(6):549-52. 1996. Doi: 10.1590/s0034-89101996000600009.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BECK, S.; KONOPKA, C. K.; SILVA, A. K.; DIEHK, F. P. Importância do rastreamento sorológico da toxoplasmose em gestantes atendidas em ambulatório de pré-natal de alto risco. **Revista Saúde**. v.36, n.1, p.29-36. 2013.

BERTOLINI, A. B; DUTRA, M. A. O.; GUIRALDI, L. M.; SANTOS, W. J.; MEDEIROS, M. I. M.; LUCHEIS, S. B. Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica* in bovine milk samples of bulk tanks from dairy farms in São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 40, n. 2, p. 723-730. 2019. Doi: DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n2p723

BEZERRA, M. J. G.; KIM, P. C. P.; MORAES, E. P. B. X.; AS, S. G.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; SILVA, J. G.; ALVES, B. H. L. S.; MOTA, R. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**. 2013. Doi:10.1111/tbed.12160

BLAGA, R.; AUBERT, D.; THÉBAULT, A.; PERRET, C.; GEERS, R.; THOMAS, M.; ALLIOT, A.; DJOKIC, V.; ORTIS, N.; HALOS, L.; DURAND, B.; MERCIER, A.; VILLENA, I.; BOIREAU, P. *Toxoplasma gondii* in beef consumed in France: regional variation in seroprevalence and parasite isolation. **Parasite**. 26, 77. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1051/parasite/2019076>

BOUGHATTAS, S. Toxoplasma Infection and Milk Consumption: Meta-analysis of Assumptions and Evidences. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2015. DOI: 10.1080/10408398.2015.1084993

BRASIL. 2012. Gestação de Alto Risco Manual Técnico. **Ministério da Saúde**.

Gestação de Alto Risco: Manual Técnico. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/gestacao_alto_risco.pdf.

BRASIL. 2018. Protocolo de Notificação e Investigação: Toxoplasmose Gestacional e Congênita. **Ministério Da Saúde**. Vol. 1. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_notificacao_%0Atoxoplasmose_gestacional.pdf.

BURRELLS, A.; TARODA, A.; OPSTEEGH, M.; SCHARES, G.; BENAVIDES, J.; DAM-DEISZ, C.; BARTLEY, P. M.; CHIANINI, F.; VILLENA, I.; VAN DER GIESSEN, J.; INNES, E. A.; KATZER, F. Detection and dissemination of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected calves, a single test does not tell the whole story. **Parasites & Vectors**. 11:45. 2018. Doi: 10.1186/s13071-018-2632-z.

CABRAL MONICA, T.; PINTO-FERREIRA, F.; MARTINS, F. D. C.; MATOS, R. L. N.; MATOS, A. M. R. N.; SANTOS, A. C.; NINO. B. S. L.; PEREIRA, L.; NARCISO, S. G.; GARCIA, J. L.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; MITSUKA-BREGANO, R. Epidemiology of a toxoplasmosis outbreak in a research institution in northern Paraná, Brazil. **Zoonoses and Public Health**. 2020. Doi:10.1111/zph.12705

CALERO-BERNAL, R; GENNARI, S. M. Clinical Toxoplasmosis in Dogs and Cats: An Update. **Frontier Veterinary Science**. 6:54. 2019. Doi: 10.3389/fvets.2019.00054

CAMOSSO, L. G.; GRECA-JÚNIOR, H.; CORRÊA, A. P. F. L.; RICHINI-PEREIRA,

V. B.; SILVA, R. C.; DA SILVA, A. V.; LANGONI, H. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. **Veterinary Parasitology**. Volume 177, Issues 3–4, 11. Pages 256-261. 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.007>.

CHIEBAO, D. P.; PENA, H. F.; PASSARELLI, D.; SANTÍN, T.; PULZ, L. H.; STREFEZZI, R. F.; SEVÁ, A. P.; MARTINS, C. M.; LOPES, E. G.; GRISI FILHO, J. H. H.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M. Congenital Transmission of *Toxoplasma gondii* After Experimental Reinfection with Brazilian Typical Strains in Chronically Infected Sheep. **Frontiers in Veterinary Science**. 6:93. 2019. Doi: 10.3389/fvets.2019.00093.

CISAK, E.; ZAJAC, V.; SROKA, J.; SAWCZYN, A.; KLOC, A.; DUTKIEWICZ, J.; WÓJCIK-FATLA, A. Presence of Pathogenic Rickettsiae and Protozoan in Samples of Raw Milk from Cows, Goats, and Sheep. **Foodborne Pathogens and Disease**. Volume 14, Number 4, 2017. Doi: 10.1089/fpd.2016.2203

COSTA, G. H. N.; COSTA, A. J.; LOPES, W. D. Z.; BRESCIANI, K. D. S.; SANTOS, T. R.; ESPER, C. R.; SANTANA, Á. E. *Toxoplasma gondii*: Infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Experimental Parasitology**. Volume 127, Issue 1. Pages 277-281, ISSN 0014-4894. 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.005>.

CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of Enterotoxins Genes in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Foods. **Brazilian Journal of Microbiology**. 37:70-74. ISSN 1517-

8382. 2006.

DA COSTA, M. A.; PINTO-FERREIRA, F.; ALMEIDA, R. P. A.; MARTINS, F. D. C.; PIRES, A. L.; MAREZE, M.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R. L.; MOREIRA, R. V. R.; BORGES, J. M.; NAVARRO, I. T. Artisan fresh cheese from raw cow's milk as a possible route of transmission in a toxoplasmosis outbreak, in Brazil. **Zoonoses Public Health**. 00:1–8. 2019. Doi: 10.1111/zph.12660

DEHKORDI, F. S.; RAHIMI, E.; ABDIZADEH, R. Detection of *Toxoplasma gondii* in Raw Caprine, Ovine, Buffalo, Bovine, and Camel Milk Using Cell Cultivation, Cat Bioassay, Capture ELISA, and PCR Methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**. Volume 10, Number 2. 2013. Doi: 10.1089/fpd.2012.1311

DE BARROS, L. D.; GARCIA, J. L.; BRESCIANI, K. D. S.; CARDIM, S. T.; STORTE, V. S.; HEADLEY, A. S. A Review of Toxoplasmosis and Neosporosis in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Frontier Veterinary Science**. 7:455. 2020. Doi: 10.3389/fvets.2020.00455

DELGADO BETANCOURT, E.; HAMID, B.; FABIAN, B. T.; KLOTZ, C.; HARTMANN, S.; SEEGER, F. From Entry to Early Dissemination—*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter with Its Host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 9:46. 2019. Doi: 10.3389/fcimb.2019.00046

DE OLIVEIRA, P. R. F.; MELO, R. P. B.; SIERRA, T. O.; DA SILVA, R. A.; DE OLIVEIRA, J. E. S.; DE ALMEIDA, B. G.; MOTA, R. A. Investigation of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocyst in urban public environment, in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**.

Volume 79, 101715, ISSN 0147-9571, 2021. Doi:
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101715>.

DONG, H.; LU, Y. Y.; SUL, R. J.; WANG, Y. H.; WANG, M. Y.; JIANG, Y. B.; YANG, Y. R. Low prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from China's central region. **BMC Veterinary Research**. 14:315. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1629-3>

DUBEY, J. P. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**. 13: 199—211. 1983.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**. V. 126, p. 57–72. 2004.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. 139, 1375–1424. 2012. Doi:10.1017/S0031182012000765.

DUBEY, J. P.; MURATA, F. H. A.; CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; KWOK, O. C. H.; YANG, Y.; SU, C. *Toxoplasma gondii* infections in dogs: 2009-2020. **Veterinary Parasitology**. 2020a. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109223>

DUBEY, J. P.; CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; MURATA, F. H. A.; KWOK, O. C. H.; HILL, D.; YANG, Y. R.; SU, C. All about *Toxoplasma gondii* infections in pigs: the past decade. **Veterinary Parasitology**. 2020b. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109185>

DUBEY, J. P.; MURATA, F. H. A.; CERQUEIRA-CÉZAR, C. K.; KWOK, O. C. H. *Toxoplasma gondii* infections in horses, donkeys, and other equids: the last decade. **Research in Veterinary Science** 132, 492–499. 2020c.

DUBEY, J. P. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. **Parasites e Vectors**. 14:263. 2021. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04769-4>

EKMAN, C.C.J.; CHIOSSI, M.F.V.; MEIRELES, L.R.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; FIGUEIREDO, W.M.; MARCIANO, M.A.M. & LUNA, E.J.A. Case-control study of an outbreak of acute toxoplasmosis in an industrial plant in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 54(5): 239-44. 2012. Doi: doi: 10.1590/S0036-46652012000500001

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecalstages identified as coccidian oocysts. **Science**. v. 167, n. 919, p. 893-896. 1970.

GARCIA, G.; SOTOMAIOR, C.; NASCIMENTO, A. J.; NAVARRO, I. T.; SOCCOL, V. T. *Toxoplasma gondii* in goats from Curitiba, Paraná, Brazil: risks factors and epidemiology. **Parasitology. Veterinary**. 21 (1). 2012. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000100009>

GAZZONIS, A. L.; ZANZANI, S. A.; STRADIOTTO, K.; OLIVIERI, E.; VILLA, L.; MANFREDI, M. T. *Toxoplasma gondii* Antibodies in Bulk Tank Milk Samples of Caprine Dairy Herds. **Journal of Parasitology**. 17-44R2 AP. 2018.

GHAREKHANI, J.; YAKHCHALI, M.; AFSHARI, A.; ADABI, M. Herd-level

contamination of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* in milk of Iranian dairy farms. **Food Microbiology**. Volume 100. 103873, ISSN 0740-0020. 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103873>

GOMES, D. F. C.; KRAWCZAK, F. S.; OLIVEIRA, C. H. S.; FERREIRA JÚNIOR, Á.; FERNANDES, É. K. K.; LOPES, W. D. Z.; SEVÁ, A. P.; GENARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in cattle in Brazil: a review. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**. 1: e015719. 2020. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019106>

GOMES, D. F. C.; MENDES, L. A.; DIAS, J. M.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; DE OLIVEIRA, P. R. F.; MOTA, R. A.; ARNHOLD, E.; FIORAVANTI, M. C. S.; OLIVEIRA, C. H. S. Seroprevalence, spatial distribution and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection among cattle in a quilombola community in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. 30(1): e018720. 2021. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-296120201080>

GÓRSKA-WARSEWICZ, H.; REJMAN, K.; LASKOWSKI, W.; CZECZOTKO, M. Milk and Dairy Products and Their Nutritional Contribution to the Average Polish Diet. **Nutrients**. 11, 1771. 2019. Doi:10.3390/nu11081771

HIRAMOTO, R. M.; MAYRBAURL-BORGES, M.; GALISTEO, A. J.; MEIRELES, L. R.; MACRE, M. S.; ANDRADE JR, H. F. Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Revista de Saúde Pública**. 35, 113–118. 2001.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; BRAEKELEER, J. D.; 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**. 30: 69-75. 2000.

HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; BARANDIKA, J.; GARCÍA-PÉREZ, A. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary Parasitology* 102; 17–27. 2001.

IACOBUCCI, E.; TAUS, N. S.; UETI, M. W.; SUKHBAATAR, L.; BASTSUKH, Z.; PAPAGEORGIOU, S.; FRITZ, H. Detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* DNA within the milk of Mongolian livestock. **Parasitology Research**. 118:2005–2008. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06306-w>

KHAMES, M.; YEKKOUR, F.; FERNÁNDEZ-RUBIO, C.; AUBERT, D.; NGUEWA, P.; VILLENA, I. Serological survey of cattle toxoplasmosis in Medea, Algeria. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. S2405-9390(17)30216-2. 2018. Doi: 10.1016/j.vprsr.2018.02.009

KOETHE, M.; SCHADE, C.; FEHLHABER, K.; LUDEWIG, M. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simulated gastric fluid and cow's milk. **Veterinary Parasitology**. 15; 233: 111-114. 2017. Doi: 10.1016/j.vetpar.2016.12.010

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology**

and Evolution. 35 (6): 1547–1549. 2018. Doi:10.1093/molbev/msy096

LUPTAKOVA, L.; BENOVA, K.; RENCKO, A.; PETROVOVA, E. DNA detection of *Toxoplasma gondii* in sheep milk and blood samples in relation to phase of infection. **Veterinary Parasitology.** 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.002>

MARANA, E. R. M.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em rebanhos de bovinos de leite do norte do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias.** Londrina, v. 16, n. 1, p. 40-42. 1995.

MAREZE, M.; BENITEZ, A. D. N.; BRANDÃO, A. P. D.; Pinto-Ferreira, F.; MIURA, A. C.; MARTINS, F. D. C.; CALDART, E. T.; BIONDO, A. W.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil. **PLoS ONE.** 14 (2): e0212375. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212375>

MARINHO, G. L. O. C.; SILVA, J. E. M.; FARIAS, M. P. O.; SCHWARZ, D. G. G.; MONTEIRO, H. M. A.; ROMEIRO, E. T. Toxoplasmose Suína: Revisão De Literatura. **Revista Expressão Científica,** ISSN 2447-9209. 2020.

MELO, R. P.B.; OLIVEIRA, P. R. F.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; BARRETO, M. L. M.; MOURA, G. H. F.; OLIVEIRA, A. A. F.; MOTA, R. A. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in heart tissue from common marmoset (*Callithrix jacchus*) monitored for yellow fever and rabies in Pernambuco state, Northeastern of Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports.** Volume 21,

100447, ISSN 2405-9390. 2020. Doi:
<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100447>.

MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. **Journal of Parasitology**, v. 58, n. 5, p. 928-937. 1972.

NEGRI, D.; CIRILO, M. B.; SALVARANI, R. S.; NEVES, M. F. Toxoplasmose Em Cães E Gatos. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**. ISSN: 1679-7353. Disponível em
http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/Plnrs8cwK0Yc3nV_2013-6-13-15-16-0.pdf.

NOBUTO, K.; SUZUKI, K.; OMURA, M.; ISHII, S. Studies on toxoplasmosis in domestic animals. **National Institute of Animal Health**. 40, 32. 1960.

OLSEN, A.; BERG, R.; TAGEL, M.; MUST, K.; DEKSNE, G.; ENEMARK, H. L.; ALBAN, L.; JOHANSEN, M. V.; NIELSEN, H. V.; SANDBERG, M.; LUNDÉN, A.; STENSVOLD, C. R.; PIRES, S. M.; JOKELAINEN, P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs, sheep, cattle, wild boars, and moose in the Nordic-Baltic region: A systematic review and meta-analysis. **Parasite Epidemiology and Control**. 3 e00100. 2019. Doi:
<https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00100>

ORÉFICE, F.; FILHO, R. C.; BARBOZA, A. L.; ORÉFICE, J. L.; CALUCCI, D. Toxoplasmose ocular adquirida - Toxoplasmose ocular pós-natal. **Revista Brasileira de Oftalmologia**. 69 (3): 184-207. 2010.

OSSANI, R. A.; BORGES, H. A. T.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; MILETTI, L. C.; FEDERLE, M.; MOURA, A. B. *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on West mesoregion of Santa Catarina state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 69, n.5, p.1294-1300. 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9177>

PEREIRA, D. C.; DUBEY, J. P.; MATA, A.; NETO, H.; CARDOSO, L.; LOPES, A. P. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in domestic cattle, sheep, goats and pigs from São Tomé and Príncipe. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. 29(1): e014819. 2020. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019101>

REGO E SILVA, G. N.; BRANCO, M. R. F. C.; RORIGUES, Z. M. R.; DOS SANTOS, A. M.; PEREIRA, P. R. M.; DA SILVA, M. S.; NUNES, A.T. S.; JÚNIOR, A. R. G.; MEDEIROS, M. N. L.; DE AZEVEDO, C. M. P. S.; QUEIROZ, R. C. S.; JUNIOR, J. A. Toxoplasmosis outbreak in Brazil, 2006 – Revisited. **Parasite Epidemiology and Control**. Volume 7. e00117, ISSN 2405-6731. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00117>.

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**, vol. 29, núm. 3, pp. 693-706. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Brasil. 2008.

ROUATBI, M.; AMDOUNI, Y.; AMAIRIA, S.; RJEIBI, M. R.; SAMMOUDI, A.; REKIK, M.; GHARBI, M. Molecular detection and phylogenetic analyses of

Toxoplasma gondii from naturally infected sheep in Northern and Central Tunisia. **Veterinary Medicine and Science**. 3, pp. 22–31. 2017. Doi: 10.1002/vms3.53

SAH, R. P.; TALUKDER, M. H.; ANISUR RAHMAN, A.K.M.; ALAM, M. Z.; WARD, M. P. W. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in ruminants in selected districts in Bangladesh. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. Volume 11, Pages 1-5, ISSN 2405-9390. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.10.008>

SAH, R. P.; HASANUZZAMAN TALUKDER, M.; ANISUR RAHMAN, A. K. M.; ALAMA, M. Z.; TALUKDER, M. H. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in ruminants in selected districts in Bangladesh. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 11: 1–5. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.10.008>

SAMPAIO, B.; MEIRELES, L. R.; ANDRADE JÚNIOR, H. F. Standardization of dot-ELISA methodology for detection of IgG antibodies anti-*Toxoplasma gondii* in saliva. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 74 (4): 310-9. 2015.

SANTOS, E. J. F.; CUNHA, M. Interpretação Crítica dos Resultados Estatísticos de uma Meta-Análise: Estratégias Metodológicas. **Millenium**, 44. Pp. 85-98. 2013.

SANTOS, T. R.; MAIA, M. O.; GOMES, J. F.; SUZUKI, C. T. N.; COSTA, A. J.; BRESCIANI, K. D. S. Congenital Toxoplasmosis In Cattle. **Congenital Toxoplasmosis Human and Domestic Animals**, 122-129. 2016.

SANTOS SILVA, A. C.; DE BARROS, L. D.; BARROS, V. M. C.; ALCÂNTARA,

A. M.; ANDRADE, M. R.; GARCIA, J. L.; MOTA, R. A.; PORTO, W. J. N. Occurrence of Atypical and New Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Free-Range Chickens Intended for Human Consumption in Brazil. **Acta Parasitologica**. 65:774–778. 2020. Doi: <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00194-2>

SANTANA ROCHA, D.; SOUSA MOURA, R. L.; MACIEL, B. M.; GUIMARÃES, L. A.; O'DWYER, H. N. S.; MUNHOZ, A. D.; ALBUQUERQUE, G. R. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected sheep's milk. **Genetics and Molecular Research**. 14 (3): 8658-8662. 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.July.31.14>

SILVA, R. C; SILVA, A. V. **Toxoplasmose em animais domésticos. Doenças infecciosas em animais de produção e companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 1040-1053 p. 2016.

SILVA, J. G.; ALVES, B. H. L. S.; MELO, R. P. B.; KIM, P. C. P.; NETO, O. L. S.; BEZERRA, M. J. G.; SÁ, S. G.; MOTA, R. A. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep and goats of local breeds reared in Northeastern Brazil. **Acta Tropica**. 142; 145–148. 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.011>

SIMÕES, L.; FAVARON, P. O.; ANUNCIAÇÃO, A. R. A.; MIGLINO, M. A. *Toxoplasma gondii* and pregnancy: toxoplasmosis characteristics, clinical signs, diagnosis and the importance of the disease in public health – review. **Revista Científica De Medicina Veterinária**. ISSN:1679-7353. 2015.

STELZER, S.; BASSO, W.; BENAVIDES SILVÁN, J.; ORTEGA-MORA, L. M.;

MAKSIMOV, P.; GETHMANN, J.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. **Food and Waterborne Parasitology**. 12:e00037. 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037>.

SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Review article: Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**. 137, 1–11. 2010.doi:10.1017/S0031182009991065

TIALLA, D.; DAHOUROU, L. D.; GBATI, O. B. Seroprevalence and factors associated with bovine and swine toxoplasmosis in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. **Veterinary World**. 12(10): 1519-1523. 2019. DOI: 10.14202/vetworld.2019.1519-1523

TIGNON, M.; DE BAERE, M.; HANON, J. B.; GOOLAERTS, A.; HOUTAIN, J. Y. V.; DELOOZ, L.; CAY, A. B. Characterization of three commercial ELISA kits for detection of BOHV-1 gE specific antibodies in serum and milk samples and applicability of bulk milk for determination of herd status. **Journal of Virological Methods**. 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.03.015>

VAZ, R. S.; RAULI, P.; MELLO, R. G.; CARDOSO, M. A. Toxoplasmose Congênita: Uma Doença Negligenciada? Atual política de saúde pública brasileira. **Field Actions Science Reports**. Special Issue 3. 2011.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**. 1; 39(8): 895–901. 2009.

doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.004.

WITTER, R.; PENA, H. F. J.; MAIA, M. O.; DE MAGALHÃES, A. O.; A. O.;
MORGADO, T. O.; COLODEL, E. M.; BARROS, D. A.; IGARASHI, M.; GENNARI,
S. M.; PACHECO, R. C. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in the
Midwestern Brazil revealed high genetic diversity and new genotypes. **Acta
Tropica** 212, 105681. 2020.

MANUSCRITO

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

Comparison of molecular techniques for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* in samples of raw bovine milk

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Diagnosis; Milk; One Health; Toxoplasmosis; Zoonosis; Bulk Tank Milk
Corresponding Author:	Suzane Manzini, M.D Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Faculdade de Medicina Campus de Botucatu Botucatu, São Paulo BRAZIL
First Author:	Suzane Manzini, M.D
Order of Authors:	Suzane Manzini, M.D
	Thainá Valente Bertozzo
	Isabella Neves Aires
	Nássarah Jabur Lot Rodrigues
	Amanda Bezerra Bertolini
	Marcela Alexandrino
	Jackieline Sampaio Steinle
	Andresa Xavier Frade Gomes
	Maria Eduarda Cavalheiro
	Renata Pimentel Bandeira de Melo
	Rinaldo Aparecido Mota
	Maria Izabel Merino de Medeiros
	Virgínia Bodelão Richini-Pereira
	Simone Baldini Lucheis
Abstract:	Toxoplasmosis is a zoonosis caused by the protozoan <i>Toxoplasma gondii</i> (<i>T. gondii</i>). In this study, the presence of <i>T. gondii</i> was verified in bovine milk samples from 102 bulk tank milk collected from small family farms in different municipalities in Sao Paulo state, Brazil. The Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed with the primers TOX4/TOX5 for cPCR (Conventional PCR) and TgNP1/TgNP2 gene for Nested PCR. As a result, it was possible to detect <i>T. gondii</i> DNA in 18 (17.65%) milk samples from the 102 tanks, corresponding to 3.92% for cPCR and 12.74% for Nested PCR. The results show that the TgNP1 and TgNP2 gene were more efficient to detect <i>T. gondii</i> DNA, as well as indicate an alert for the importance of raw bovine milk as a source of infection of this protozoan for humans.

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1: Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo (CEUA/FMB/Unesp).

CERTIFICADO Nº 1367/2020 – CEUA					
Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012					
Certificamos que o projeto intitulado: "Pesquisa Molecular de Toxoplasma Gondii em amostras de leite bovino de tanques de expansão encaminhados para laticínios da região centro-oeste do Estado de São Paulo e análise espacial", conduzido pela Pesquisadora: Suzane Manzini – Orientador – Profa. Dra. Simone Baldini Luchesi – Coordenadoras: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira e Dra. Maria Izabel Merno de Medeiros, registrada com o nº CEUA 1367/2020, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 26 de agosto de 2020.					
Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica				
Vigência da autorização	31/08/2022				
Espécie/Linhagem/Raça	Amostras de Leite				
Nº de animais	ZERO				
Idade/Peso					
Origem	CEUA 51/2016 FMVZ				
Sara Rosa Stanley Sampaio Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP			Prof. Dra. Bertina Furlan Polegato Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP		
Doutor Rubião Junior, s/nº – Botucatu – SP, CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3890.1880 – E-mail Secretarias: ceua@fmb.unesp.br					

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

1. Em um microtubo de 1,5 mL, adicionar 900µL da amostra de leite.
2. Centrifugar a 14.000g por 2 minutos.
3. Eliminar o sobrenadante por inversão, deixando o pellet. Retirar a gordura da parede do tubo com swab estéril (individual)
4. Adicionar ao pellet 40 µL de tampão de lisozima e misturar imediatamente em vórtex.
5. Adicionar 10 µL de lisozima (10mg/mL) e misturar em vórtex.
6. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, agitando-se ocasionalmente.
7. Adicionar 10 µL da proteinase K (20mg/mL) e agitar em vórtex.
8. Incubar a 56°C por 15 a 30 minutos, agitando-se ocasionalmente
9. Prosseguir com a adição de 400 µL da Lysis Solution no microtubo. Homogeneize bem com vórtex por 15 segundos.
10. Incube o microtubo em temperatura ambiente por 10 minutos com homogeneização intermitente para lise adicional.
11. Centrifugue rapidamente a 5000 g (rcf) por 1 minuto (ou 7000 rpm em 1 minuto) para levar as amostras para baixo.
12. Monte uma mini-coluna sobre o tubo de coleta fornecido. Use colunas individuais para amostras individuais. Estas colunas são descartáveis.

13. Abra a tampa da coluna e transfira o lisado completo (450 µL) para a coluna usando a micropipeta.

14. Feche a tampa da coluna e transfira-a para uma microcentrífuga. Centrifugue a 11.000g por 1 minuto (ou a 10.400 rpm por 1 minuto).

15. Remova o tubo da coleta contendo o líquido cuidadosamente, sem tocar a base da coluna. Descarte esse líquido.

16. Adicione 500 µL da Lysis Solution na coluna e centrifugue a 11.000g por 1 minuto. Este passo adicional garante a completa lise das células e desnatura qualquer proteína residual.

17. Descarte o líquido.

18. Adicione 500 µL de Wash Buffer à coluna e centrifugue a 11.000g por 3 minutos.

19. Descarte o tubo de coleta com o líquido.

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

20. Transfira a coluna de purificação para um microtubo novo.

21. Adicione 200 µL do Elution buffer (tampão de eluição) pré-aquecido a 70°C diretamente na coluna.

22. Incube a coluna por 1 minuto em temperatura ambiente.
23. Centrifugue a 11.000g por 1 minuto para recuperar o DNA.
24. O DNA eluído está pronto para as aplicações seguintes. Armazenar a -20°C.

10.3 Anexo 3: Quantificação de DNA a partir da extração das amostras de leite de tanque de expansão.

AMOSTRAS	RELAÇÃO 260/280	DNA AMOSTRA (ng/ul)
1	2.927	8.1
2	2.060	15.6
3	1.882	17.5
4	2.234	15.3
5	2.437	12.6
6	2.148	16.0
7	2.630	12.1
8	2.036	17.0
9	6.080	7.6
10	2.060	20.5
11	1.900	13.3
12	1.963	26.5
13	2.368	10.3
14	2.289	9.5
15	2.215	13.4
16	2.185	16.5
17	2.152	17.0
18	2.171	16.5
19	2.080	14.3
20	2.176	18.5
21	2.020	14.9
22	2.036	17.0
23	2.242	18.5
24	2.090	18.5
25	2.256	22.0
26	2.374	16.5
27	2.379	16.6
28	2.143	21.0
29	1.741	121.0

30	2.312	18.5
31	3.051	6.0
32	2.404	5.7
33	1.980	4.9
34	2.011	18.0
35	1.648	21.5
36	2.222	17.0
37	1.809	18.0
38	1.727	21.5
39	1.600	76.00
40	2.020	20.0
41	1.860	15.9
42	1.457	102.0
43	2.112	8.5
44	1.965	11.3
45	2.571	7.2
46	1.632	6.2
47	1.534	56.0
48	2.143	12.8
49	2.539	11.3
50	2.559	13.1
51	2.268	9.3
52	1.898	28.0
53	2.062	26.5
54	2.124	27.5
55	1.835	25.5
56	1.485	50.5
57	2.147	24.5
58	2.168	22.0
59	1.212	31.5
60	2.204	20.5
61	2.018	22.5
62	1.905	20.0
63	1.866	10.5

64	1.986	14.4
65	2.071	8.8
66	1.984	12.6
67	1.553	8.0
68	2.229	7.8
69	2.246	6.9
70	2.012	8.2
71	1.955	8.6
72	1.783	8.2
73	1.571	9.4
74	1.104	18.0
75	1.199	8.5
76	1.092	7.7
77	1.664	9.4
78	1.676	8.8
79	1.569	9.1
80	1.773	9.8
81	1.469	9.4
82	1.811	10.1
83	1.720	13.5
84	1.756	18.0
85	1.303	12.1
86	1.316	15.6
87	1.378	12.4
88	1.174	8.8
89	1.169	12.5
90	1.297	12.7
91	1.879	11.7
92	1.204	5.6
93	1.880	4.7
94	2.054	5.8
95	1.016	12.6
96	1.831	5.4
97	1.147	7.4

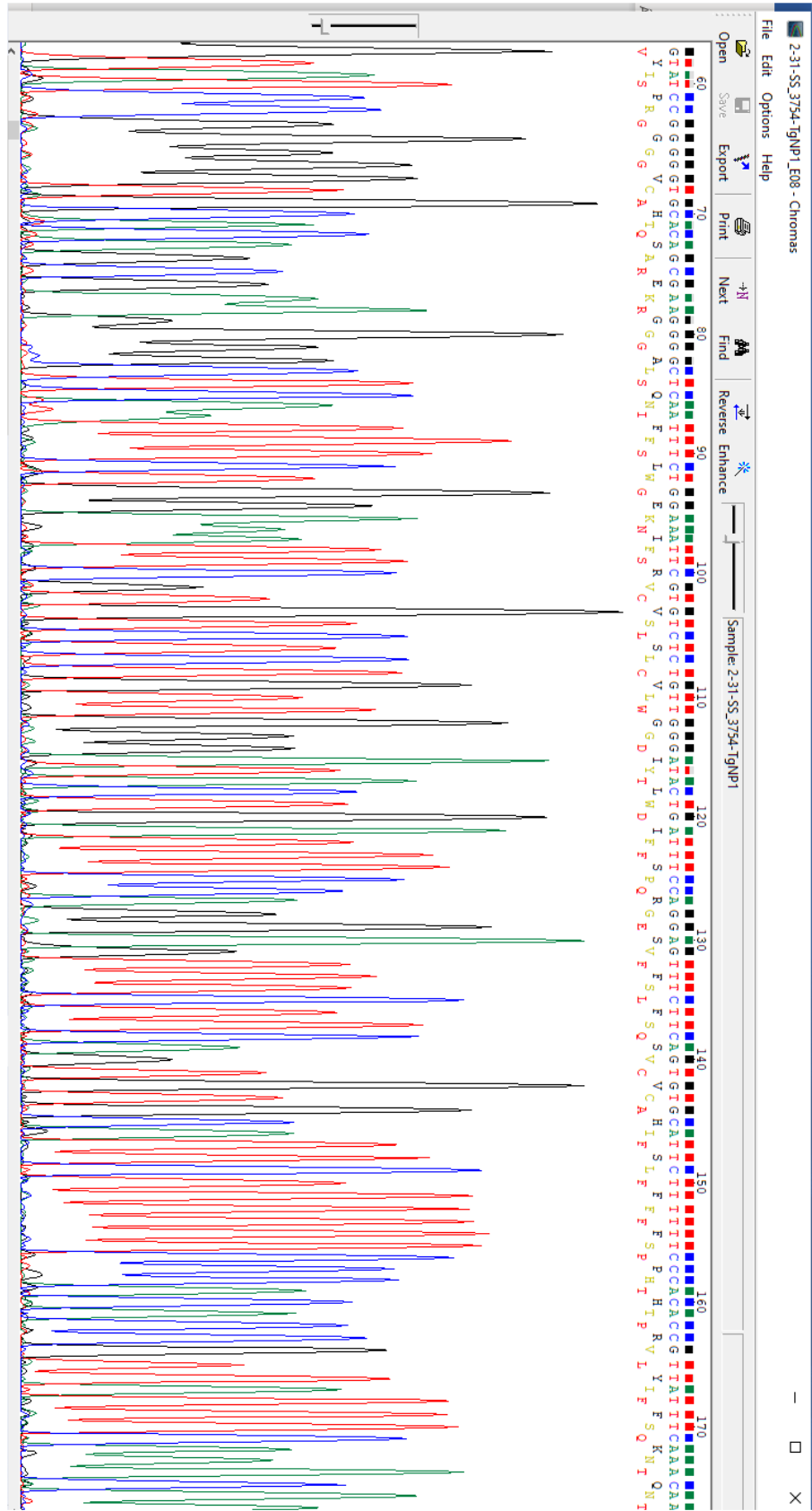
98	1.643	92.0
99	1.707	9.9
100	1.694	9.4
101	1.851	9.4
102	1.873	5.9

TgNP2

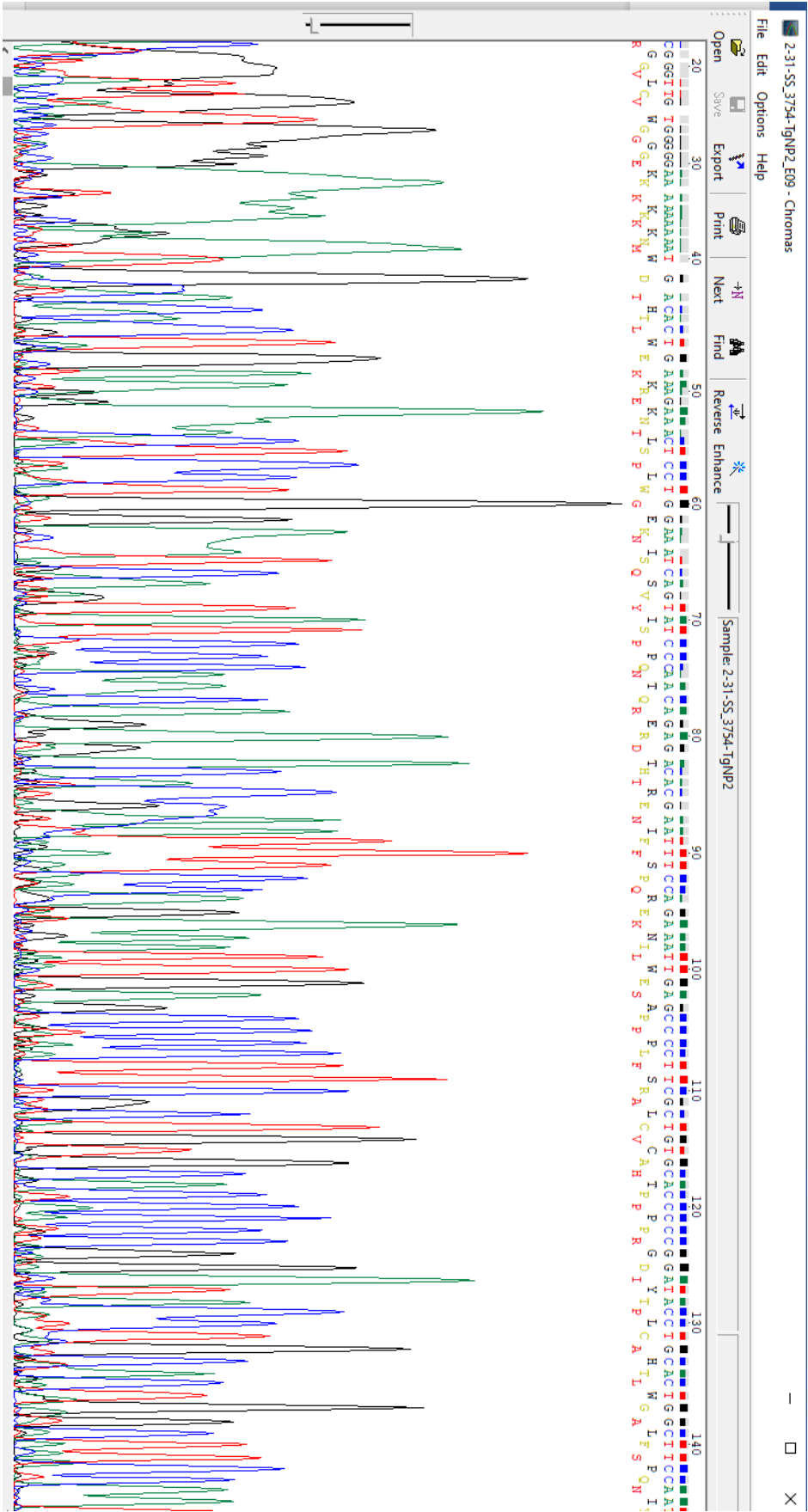


10.4.2 Amostra 31 (primers TgNP1 e TgNP2)

TgNP1



TgNP2



10.4.3 Amostra 32 (primers TgNP1 e TgNP2)

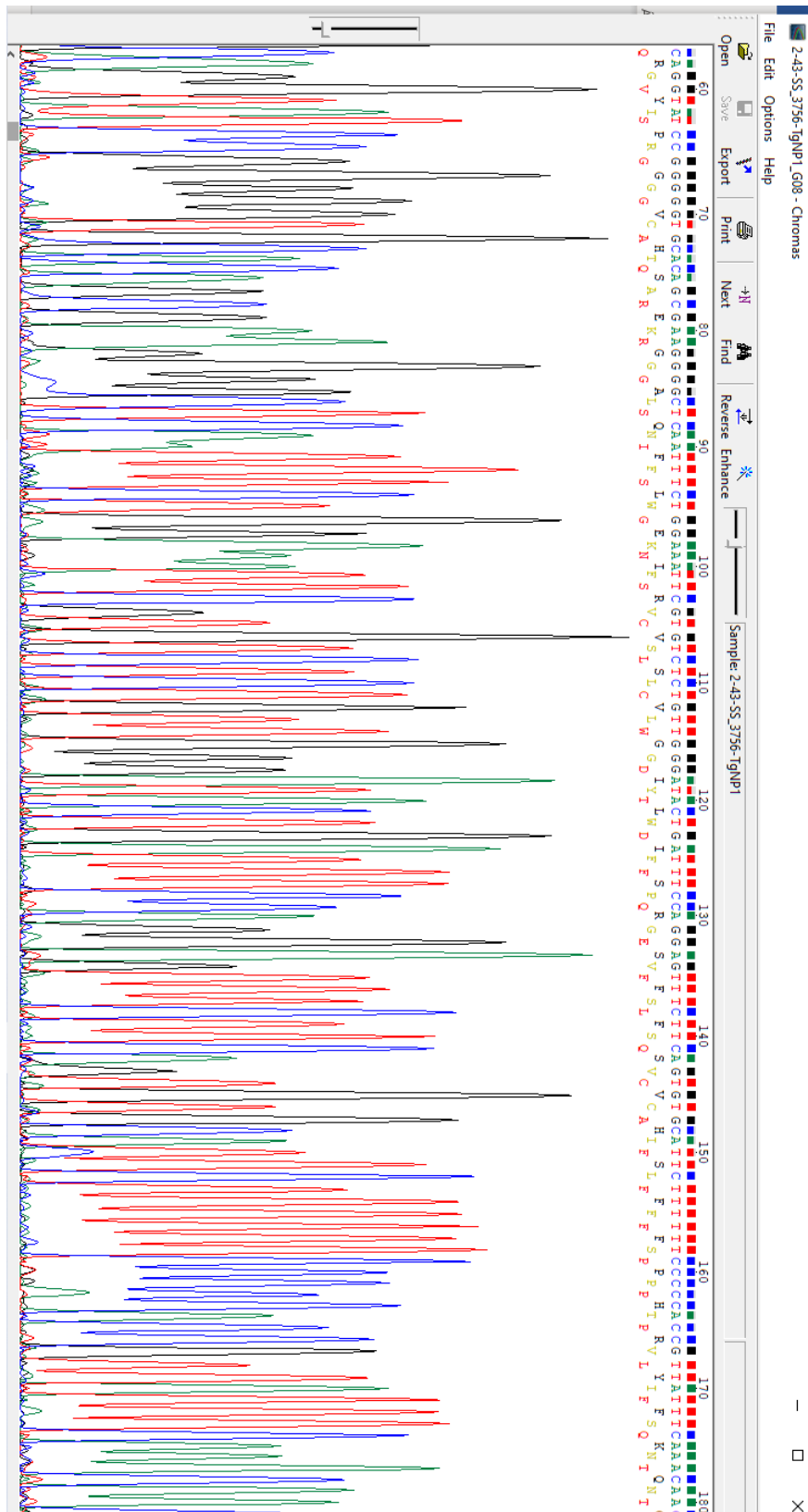
TgNP1



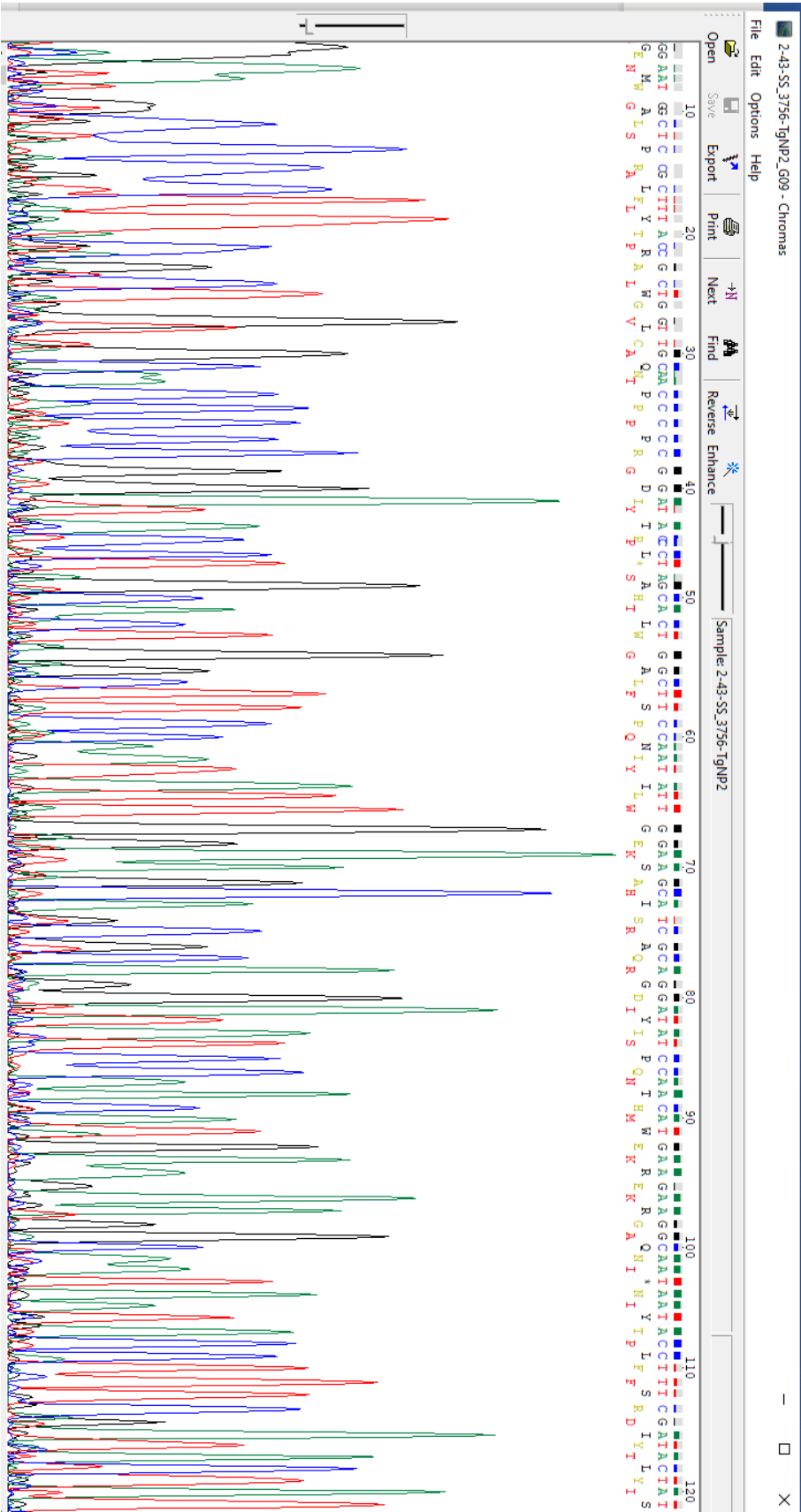


10.4.4 Amostra 43 (*primers* TgNP1 e TgNP2)

TgNP1

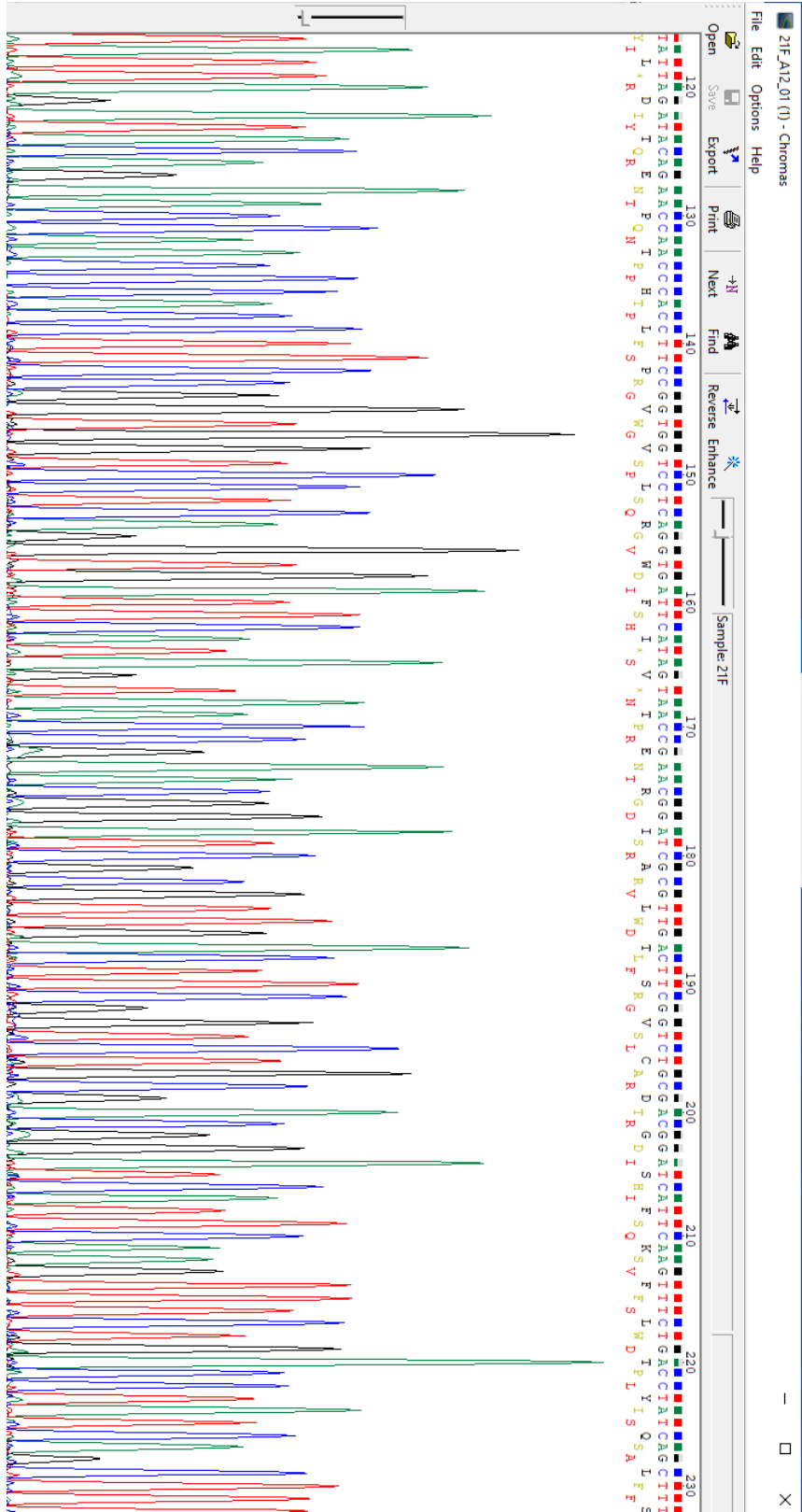


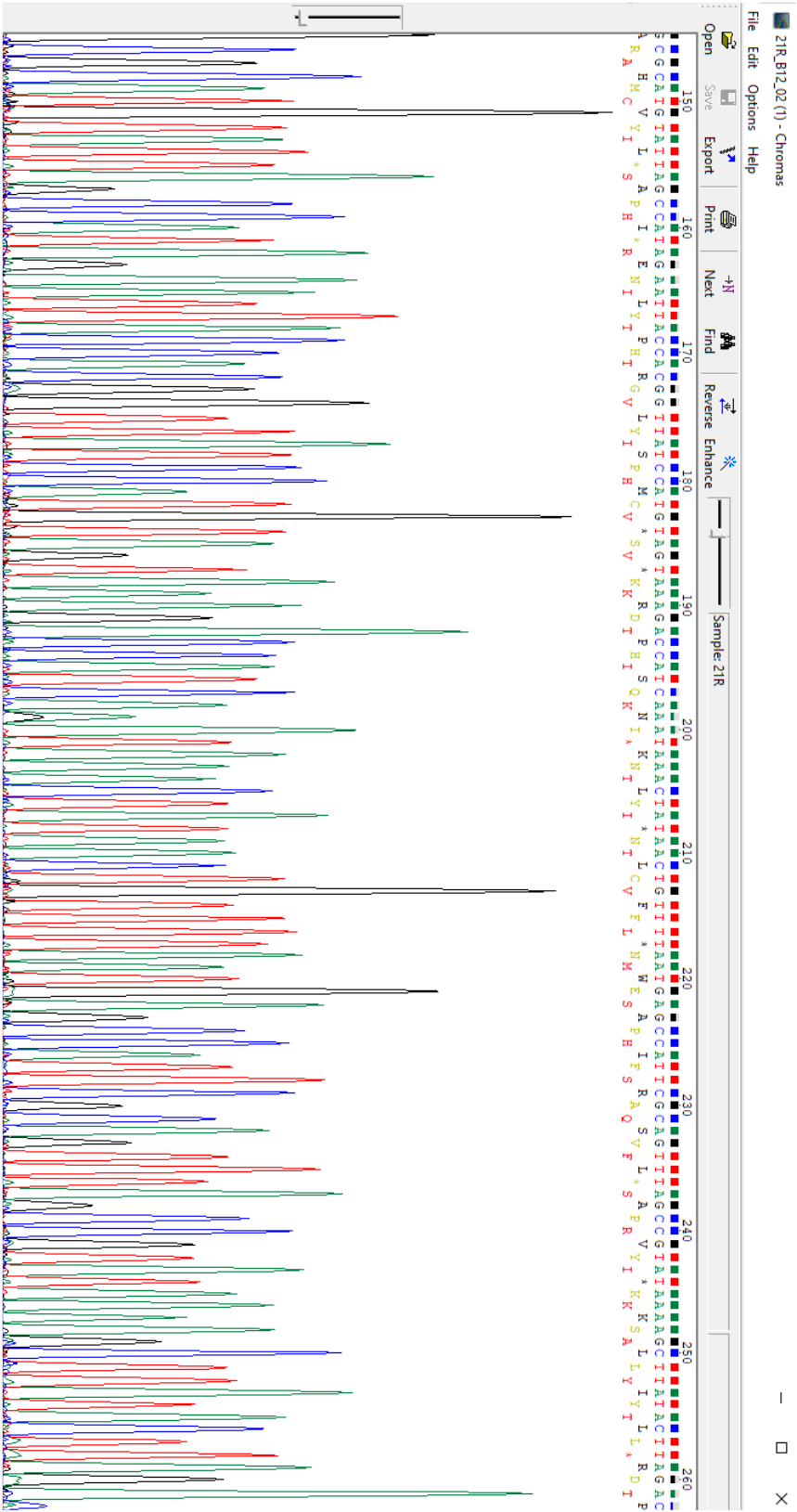
TgNP2



10.4.5 Amostra 21 (primers Tg18s58F e Tg18s348R)

Tg18s58F





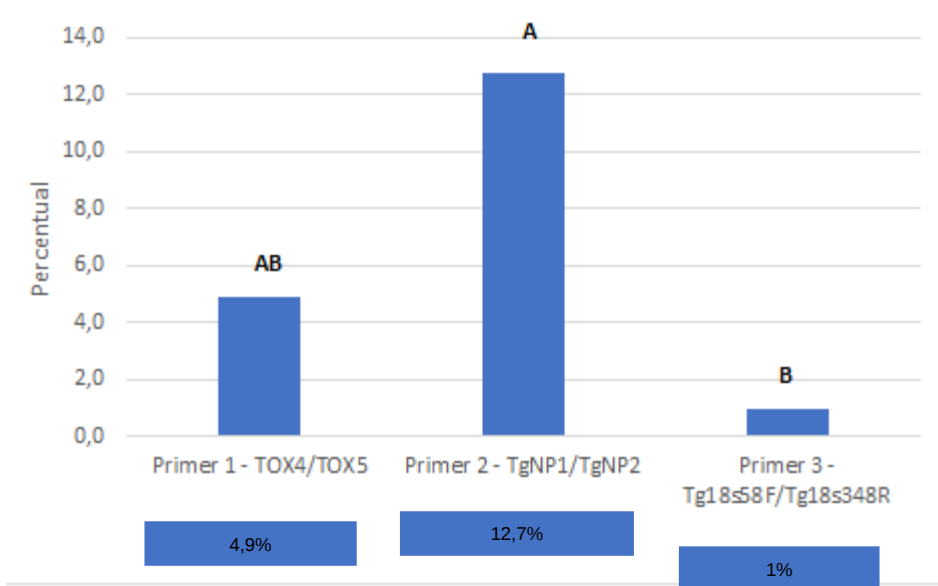
10.4 Anexo 5: Teste Q de Cochran como análise estatística

Amostras	Primer 1 - TOX4/TOX5	Primer 2 - TgNP1/TgNP2	Primer 3 - Tg18s58F/Tg18s348R
1	Negativa	Positiva	Negativa
2	Negativa	Negativa	Negativa
3	Negativa	Positiva	Negativa
4	Negativa	Negativa	Negativa
5	Negativa	Negativa	Negativa
6	Negativa	Negativa	Negativa
7	Negativa	Negativa	Negativa
8	Negativa	Negativa	Negativa
9	Negativa	Negativa	Negativa
10	Negativa	Negativa	Negativa
11	Negativa	Negativa	Negativa
12	Negativa	Negativa	Negativa
13	Negativa	Negativa	Negativa
14	Negativa	Negativa	Negativa
15	Negativa	Negativa	Negativa
16	Negativa	Negativa	Negativa
17	Negativa	Negativa	Negativa
18	Negativa	Negativa	Negativa
19	Negativa	Negativa	Negativa
20	Negativa	Negativa	Negativa
21	Negativa	Positiva	Positiva
22	Negativa	Positiva	Negativa
23	Positiva	Positiva	Negativa
24	Negativa	Negativa	Negativa
25	Negativa	Negativa	Negativa
26	Negativa	Negativa	Negativa
27	Negativa	Positiva	Negativa
28	Negativa	Negativa	Negativa
29	Negativa	Positiva	Negativa
30	Positiva	Negativa	Negativa
31	Negativa	Positiva	Negativa
32	Positiva	Positiva	Negativa

33	Negativa	Negativa	Negativa
34	Negativa	Negativa	Negativa
35	Negativa	Negativa	Negativa
36	Negativa	Negativa	Negativa
37	Negativa	Negativa	Negativa
38	Negativa	Negativa	Negativa
39	Negativa	Negativa	Negativa
40	Negativa	Negativa	Negativa
41	Negativa	Negativa	Negativa
42	Negativa	Negativa	Negativa
43	Negativa	Positiva	Negativa
44	Negativa	Negativa	Negativa
45	Negativa	Positiva	Negativa
46	Negativa	Positiva	Negativa
47	Negativa	Negativa	Negativa
48	Negativa	Negativa	Negativa
49	Negativa	Negativa	Negativa
50	Negativa	Negativa	Negativa
51	Negativa	Negativa	Negativa
52	Negativa	Negativa	Negativa
53	Negativa	Negativa	Negativa
54	Negativa	Negativa	Negativa
55	Negativa	Negativa	Negativa
56	Negativa	Negativa	Negativa
57	Negativa	Negativa	Negativa
58	Negativa	Negativa	Negativa
59	Negativa	Positiva	Negativa
60	Negativa	Negativa	Negativa
61	Negativa	Negativa	Negativa
62	Negativa	Negativa	Negativa
63	Negativa	Negativa	Negativa
64	Negativa	Negativa	Negativa
65	Negativa	Negativa	Negativa
66	Negativa	Negativa	Negativa
67	Negativa	Negativa	Negativa
68	Negativa	Negativa	Negativa
69	Negativa	Negativa	Negativa

70	Negativa	Negativa	Negativa
71	Negativa	Negativa	Negativa
72	Negativa	Negativa	Negativa
73	Negativa	Negativa	Negativa
74	Negativa	Negativa	Negativa
75	Negativa	Negativa	Negativa
76	Negativa	Negativa	Negativa
77	Negativa	Negativa	Negativa
78	Negativa	Negativa	Negativa
79	Negativa	Negativa	Negativa
80	Negativa	Negativa	Negativa
81	Negativa	Negativa	Negativa
82	Negativa	Negativa	Negativa
83	Negativa	Negativa	Negativa
84	Negativa	Negativa	Negativa
85	Negativa	Negativa	Negativa
86	Negativa	Negativa	Negativa
87	Negativa	Negativa	Negativa
88	Negativa	Negativa	Negativa
89	Negativa	Negativa	Negativa
90	Negativa	Negativa	Negativa
91	Positiva	Negativa	Negativa
92	Negativa	Negativa	Negativa
93	Negativa	Negativa	Negativa
94	Negativa	Negativa	Negativa
95	Negativa	Negativa	Negativa
96	Negativa	Negativa	Negativa
97	Negativa	Negativa	Negativa
98	Negativa	Negativa	Negativa
99	Positiva	Negativa	Negativa
100	Negativa	Negativa	Negativa
101	Negativa	Negativa	Negativa
102	Negativa	Negativa	Negativa

Gráfico 1: Percentual de positividade segundo *primer* ($P < 0,0001$).



A: valor maior de percentual de positividade segundo *primers*.

B: valor menor de percentual de positividade segundo *primers*.

AB: valor intermediário de percentual de positividade segundo *primers*.