

**AMANDA LUCÍA JIMÉNEZ SANZ**

**DETECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* EM CARNES DE SUÍNOS  
COMERCIALIZADOS EM AÇOUGUES DE CAMPOS DOS  
GOYTACAZES, RJ, ATRAVÉS DE PROVAS BIOLÓGICA E  
MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**ORIENTADOR Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira**

**CO-ORIENTADOR Dr. Edwards Frazão-Teixeira**

**Campos dos Goytacazes  
Fevereiro – 2011**

**AMANDA LUCÍA JIMÉNEZ SANZ**

**DETECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* EM CARNES DE SUÍNOS  
COMERCIALIZADOS EM AÇOUGUES DE CAMPOS DOS  
GOYTACAZES, RJ, ATRAVÉS DE PROVAS BIOLÓGICA E  
MOLECULAR**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.**

Aprovada em 21 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes – PhD - UFRRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Alba Lucínia Peixoto Rangel – DSc.- UENF

---

Pesquisador Edwards Frazão Teixeira – DSc. UENF

---

Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira – PhD - UENF

*A minha família*

*DEDICO*

## **AGRADECIMENTOS**

A meu Deus porque sempre me tem sustentado;

A meus pais, Jorge Luis Jiménez Toro (q.e.p.d.) e Maria Nohemy Sanz de Jiménez (q.e.p.d.) por ter semeado em mim o querer ir mais adiante;

A meus irmãos, Jorge Humberto, Nohelly, Fernando, Gloria Isabel, Luis Miguel, Diana Stella e Paula Andrea Jiménez Sanz por sua confiança, seu apoio incondicional e sempre estar presente quando mais necessito;

A meus sobrinhos, Luis Alejandro, Juan Sebastián, Sergio Enrique, Gabriel Alejandro, Laura Alejandra, Laura Isabel, David Camilo, Esteban, Santiago, Sara, Jorge Luis, Isabela e Tomás Felipe por seu amor, o que me faz ser uma pessoa melhor;

A Edgar Mauricio Mogollón Waltero por seu amor, confiança e por sempre acreditar em mim;

A Juanita Maria e Maria Salome Mogollón Ramírez por sua paciência e a oportunidade que me dão de melhorar a cada dia;

A Aquilino Mogollón, Olga Waltero, Luisa Marina Mogollón Waltero, Oscar Alfredo Villadiego, Sebastián, Santiago e Sergio Villadiego Mogollón por ser minha outra família na Colômbia;

Ao Brasil e especialmente à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por abrir suas portas para estudantes estrangeiros e brindar-lhes a oportunidade de ampliar seus conhecimentos;

Ao Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira que aceitou orientar-me sem conhecer-me e sempre disposto a ajudar-me no que fosse preciso;

Ao Prof. Edwards Frazão Teixeira por compartilhar seus conhecimentos, por sua paciência e por estar disponível sempre que eu precisava de seu apoio, não somente como co-orientador, senão como amigo;

À Prof<sup>a</sup>. Célia Raquel Quirino e ao seu esposo Emidio por brindar-me com seu carinho e amizade.

A Liliana Martínez, Sergio Gonzalez e sua família por ser mais que amigos, serem minha família no Brasil;

Aos colegas do laboratório por estarem no momento oportuno e por sua amizade.

## RESUMO

JIMENEZ-SANZ, Amanda Lucía, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2011. Detecção de *Toxoplasma gondii* em carnes de suínos comercializados em açougues de Campos dos Goytacazes, RJ, através de provas biológica e molecular. Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. Co-Orientador: Dr. Edwards Frazão Teixeira.

Trinta e duas amostras de carnes de suínos comercializadas nos açougues de Campos dos Goytacazes, 27 a fresco e cinco congeladas foram analisadas por prova biológica e PCR para detectar a presença de *T. gondii*. As amostras foram processadas por digestão péptica e inoculadas em camundongos com o objetivo de isolar formas viáveis do parasito. Três cepas de *T. gondii* foram isoladas. A frequência de carnes infectadas com parasitos viáveis foi de 9,38% (3/32). Um pequeno fragmento de cada amostra depois da trituração foi congelado e estocado até a realização da PCR. Com a PCR verificou-se a presença do parasito em 10 (31,25%) das 32 amostras. Em duas amostras foi confirmada a presença do parasito por prova biológica e PCR, oito amostras foram positivas somente para PCR e uma foi positiva unicamente por prova biológica. A PCR mostrou ser mais sensível que a prova biológica, mesmo utilizando uma menor quantidade de tecido e desta forma confirmada como mais uma ferramenta no estudo epidemiológico da toxoplasmose. Em conclusão, parasitos viáveis e DNA de *T. gondii* foram encontrados em carnes de suínos, o que confirma o caráter endêmico da doença, além de uma ampla distribuição do parasito no município, reiterando o risco de infecção humana por *T. gondii* através do consumo de carnes suínas nesta cidade.

Palavras-chave: Toxoplasmose, carnivorismo, *Sus scrofa*, prova biológica, PCR.

## ABSTRACT

JIMENEZ-SANZ, Amanda Lucía, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2011. Detection of *Toxoplasma gondii* in pork meats sold in butcherhouses of Campos dos Goytacazes, RJ, through biological and molecular assay. Advisor: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. Co-Advisor: Prof. Edwards Frazão Teixeira.

Thirty two pork samples sold in butcherhouses of Campos dos Goytacazes, 27 fresh and five frozen, were analyzed through bioassay and PCR to detect the presence of *T. gondii*. The samples were processed through peptic digestion and inoculated in mice in order to isolate viable infective forms of the parasite. Three *T. gondii* strains were isolated. The frequency of infected meat, containing viable parasites, was 9.38% (3/32). A small fragment of each sample was stored at -20°C until PCR was performed. Through PCR we verified the presence of the parasite in 10 (31.25%) of the 32 samples. In two samples it was confirmed the presence of the parasite through bioassay and PCR, eight samples were positive only through PCR and one was positive strictly through bioassay. The PCR demonstrated to be more sensible than the bioassay, even though we used a smaller piece of the tissue, thus confirmed as an additional tool for the epidemiological study of toxoplasmosis. On conclusion, viable parasites and *T. gondii* DNA were detected, which confirm the endemic characteristic of this disease, along with a wide distribution of the parasite in the Municipality, reinforcing the risk of human infection by the parasite through the consumption of pork meat in this Municipality.

Key-words: toxoplasmosis, carnivorous, *Sus scrofa*, bioassay, PCR.

## LISTA DE QUADRO

<b>Quadro 1.</b>	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos no mundo usando dois testes diferentes nas mesmas amostras.....	25
<b>Quadro 2.</b>	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos no mundo.....	26
<b>Quadro 3.</b>	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> viável de suínos naturalmente infectados.....	27
<b>Quadro 4.</b>	Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações primárias de nested PCRs realizadas em amostras de carnes suínas comercializadas no Município de Campos dos Goytacazes, RJ para detecção de fragmentos de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	37
<b>Quadro 5.</b>	Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações secundárias de nested PCRs realizadas em amostras de carnes suínas comercializadas no Município de Campos dos Goytacazes, RJ para detecção de fragmentos de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	37
<b>Quadro 6.</b>	Programa para as amplificações primárias e secundárias de nested PCRs realizadas em amostras de carnes suínas comercializadas no Município de Campos dos Goytacazes, RJ para detecção de fragmentos de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Detecção de parasitos viáveis de <i>Toxoplasma gondii</i> presentes em carnes suínas oriundas de açougues do Município de Campos dos Goytacazes, RJ.....	39
<b>Tabela 2.</b>	Detecção de fragmentos de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> presentes em carnes suínas oriundas de açougues do Município de Campos dos Goytacazes, RJ.....	40



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ciclo biológico do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	18
<b>Figura 2.</b>	Percentual de mortalidade dos camundongos infectados com cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> isoladas de carnes de suínos comercializadas em açougues do município de Campos dos Goytacazes, RJ.....	38
<b>Figura 3.</b>	Período de sobrevivência dos camundongos infectados com cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> isoladas de carnes de suínos comercializados em açougues do município de Campos dos Goytacazes, RJ.....	39
<b>Figura 4.</b>	Fragmentos de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> detectados em carnes suínas comercializadas nos açougues de Campos, RJ usando o marcador SAG3 (225 bp). Setas amostras positivas.....	41
<b>Figura 5.</b>	Mapa das áreas de coleta de carne suína no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APDL - Animal Parasitic Diseases Laboratory

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

DAI - Dias após a inoculação

DNA - Deoxyribonucleic acid ( Ácido desoxirribonucléico)

DT- Dye Test

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Reação Imunoenzimática)

EUA - Estados Unidos de América.

*g* – Força centrífuga

HIV - Human Immunodeficiency Virus ( Vírus da Imunodeficiência Humana)

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

IHA - Indirect Hemagglutination Antibody (Hemoaglutinação Indireta)

LAT- Latex agglutination Test (Teste de aglutinação em Látex)

MAT- Modified Agglutination Test (Teste de aglutinação modificado)

ml - Mililitros

NaCl - Cloreto de sódio

NUPAP - Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia

PBS - Phosphate buffered saline (Tampão salina fosfato)

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

TgPgBr – *Toxoplasma gondii* – Pig - Brazil

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
2.1. OBJETIVO GERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1. TAXONOMIA.....	15
3.2. HISTÓRICO.....	15
3.3. <i>Toxoplasma gondii</i> UM PARASITO RE-EMERGENTE.....	16
3.4. CICLO BIOLÓGICO.....	17
3.5. TOXOPLASMOSE NO MUNDO.....	20
3.6. TOXOPLASMOSE NO BRASIL.....	22
3.7. TOXOPLASMOSE EM CAMPOS DOS GOYTACAZES.....	23
3.8. INFECÇÃO EM SUÍNOS.....	24
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1. SELEÇÃO DOS AÇOUGUES E AQUISIÇÃO DAS CARNES.....	30
4.2. DIGESTÃO PÉPTICA DAS AMOSTRAS DE CARNES.....	30
4.3. PROVA BIOLÓGICA.....	31
4.3.1. <b>Inoculação</b> .....	31
4.3.2. <b>Isolamento do parasito</b> .....	32
a) Esfregaço de pulmão em lâminas.....	32
b) Teste de aglutinação modificado – MAT.....	32
4.3.3. <b>Eutanásia dos camundongos</b> .....	33
4.4. DETECÇÃO DO DNA DE <i>T. gondii</i> EM CARNES DE SUÍNOS.....	33
4.4.1. <b>Extração de DNA</b> .....	34
4.4.2. <b>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> .....	35
<b>5. RESULTADOS</b> .....	38
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular com ampla distribuição mundial; pode ser encontrado infectando todos os animais de sangue quente, incluindo o homem. Seu ciclo de vida é complexo, com duas formas de reprodução: uma assexuada, que é realizada em todos os animais parasitados considerados hospedeiros intermediários, e uma sexuada, realizada no intestino de felídeos (gato e felinos selvagens), os hospedeiros definitivos.

O parasito tem três formas infectantes: os taquizoítos, os bradizoítos e os esporozoítos. Os taquizoítos são de rápida multiplicação e podem ser encontrados no sangue, tecidos ou fluidos, e são os responsáveis pela fase aguda da doença. Os bradizoítos são de lenta multiplicação e se encontram dentro de cistos presentes em diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro durante a fase crônica da infecção. Os esporozoítos são formados dentro dos esporocistos após esporulação dos oocistos que são liberados juntamente com fezes dos felídeos, ao fim da etapa sexuada. Oocistos podem ser viáveis durante muito tempo em condições favoráveis de temperatura e umidade.

A infecção de animais e do homem pode ser devido à contaminação ambiental (alimentos ou água contaminada com oocistos esporulados), pelo consumo de carne crua ou mal cozida de animais infectados que apresentam cistos em seus tecidos e, também por transmissão vertical.

Em humanos a infecção pode ocorrer em qualquer período da vida. As manifestações podem ser leves ou assintomáticas, chegando a ser diagnosticada como uma gripe comum e tratada da mesma forma. As pessoas que adquirem a infecção ficam imunes, mas para gestantes que se infectam pela primeira vez as consequências podem ser muito graves, pois a toxoplasmose congênita pode causar abortamentos ou afetar o desenvolvimento fetal. Os principais problemas são hidrocefalia, encefalite ou retinocoroidite, mas podem ocorrer também retardo mental. Em muitos casos, os recém-nascidos não têm evidências da doença ao nascer e, estas alterações podem manifestar-se durante o crescimento. Logo, a toxoplasmose congênita é a forma mais grave de apresentação da doença.

Em pessoas HIV-positivas, que têm comprometido seu sistema imune, *T. gondii* causa graves problemas de saúde, como encefalite. Este quadro também pode ocorrer em pacientes que, por outro motivo, têm suprimido seu sistema imune, como no caso dos que receberam qualquer tipo de transplante, ou pessoas submetidas a tratamentos para o câncer e diálise renal. Por isso *T. gondii* é considerado um parasito oportunista.

Em Campos dos Goytacazes, pesquisas realizadas têm comprovado a alta prevalência de *T. gondii*, chegando a 84% na população de baixa renda. Estudos feitos em galinhas de zonas rurais, suburbanas e urbanas do município demonstraram a alta contaminação ambiental. Trabalhos para a detecção de anticorpos anti- *T. gondii* em bovinos e suínos criados em regiões urbanas e arredores da cidade indicaram frequência de infecção alta nestes animais, e o isolamento de *T. gondii* de cérebros e corações de suínos comercializados a fresco no mercado municipal da cidade confirmam a importância epidemiológica do parasito na região e o risco de infecção humana. Sendo Campos dos Goytacazes um município no qual a toxoplasmose é endêmica, justificam-se as pesquisas direcionadas a encontrar a relação que existe entre as possíveis fontes de infecção e a doença causada por este parasito no homem.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença de *T. gondii* em carne suína comercializada nos açougues de Campos dos Goytacazes (Campos, RJ).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de *T. gondii* viável em carnes de suínos comercializadas em Campos, RJ, e
- Verificar a presença do DNA de *T. gondii* em carnes de suínos comercializadas em Campos, RJ.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. TAXONOMIA

A classificação taxonômica do agente etiológico da toxoplasmose, de acordo com Dubey (2009c) é:

Filo: Apicomplexa (LEVINE, 1970)

Classe: Sporozoa (LEUKART, 1879)

Subclasse: Coccidiasina (LEUKART, 1879)

Ordem: Eimeriorina (LEGER, 1911)

Família: Toxoplasmatidae (BIOCCA, 1956)

Gênero: *Toxoplasma* (NICOLLE E MANCEAUX, 1909)

Espécie: *Toxoplasma gondii* (NICOLLE E MANCEAUX, 1909)

#### 3.2. HISTÓRICO

No começo do século XX, quase ao mesmo tempo, Nicolle e Manceaux (1909) na Tunísia e Alfonso Splendore (1909) no Brasil, observaram em duas espécies diferentes de animais o mesmo parasito. Os primeiros encontraram o parasito em células do baço e fígado do roedor *Ctenodactylus gundi* e o segundo o observou em coelhos que ele usava em seus experimentos, dentro e fora das células de baço, pulmão e também em alguns leucócitos, mas não nos glóbulos vermelhos. Segundo Hill et al. (2005), pelas características morfológicas que apresentava (Toxo=arco; plasma=forma) e pela espécie onde foi encontrado (*C. gundi*) recebeu o nome de *Toxoplasma gondii* por Nicolle e Manceaux.

Desde seu descobrimento muitas pesquisas sobre *T. gondii* foram desenvolvidas com períodos de relativamente pouco progresso e outros onde as

investigações avançaram rapidamente (AJIOKA e MORRISSETTE, 2009). *T. gondii* é um parasito intracelular, se encontra amplamente distribuído em todo o mundo, infectando provavelmente todos os animais de sangue quente, inclusive o homem (TENTER et al., 2000). Tem grande importância veterinária e médica já que pode causar abortamentos e severas doenças congênitas nos hospedeiros intermediários (TENTER et al., 2000).

Em suínos é conhecida a alta prevalência de *T. gondii*, o qual tem sido reportado por diferentes estudos através do mundo relacionando-o como fonte de infecção humana (JACOBS et al., 1960; TENTER et al., 2000; DUBEY, 2009c). Feldman e Miller (1956) reportaram a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos, ovinos, caprinos e também em suínos (citado por JACOBS et al., 1960). Estes autores também citam a Van Thiel e Van Waaij em 1956 por sugerirem que “pseudocistos” na carne ou outros tecidos animais poderiam ser responsáveis pela infecção oral no homem e animais.

Em humanos o primeiro caso de toxoplasmose congênita foi reportado em Nova York em 1938, por três patologistas que identificaram o parasito em cérebro, medula espinhal e olhos de uma menina que apresentou convulsões e maculas em ambos os olhos aos três dias de idade; vindo ao óbito com um mês de idade (DUBEY, 2008; DUBEY, 2009a). Posteriormente, verificou-se que em casos de hospedeiros imunocomprometidos, como os portadores de câncer, pacientes que precisam de algum tipo de transplante ou HIV-positivos, pode haver desenvolvimento de encefalite, pneumonite e miocardite como manifestações da toxoplasmose (WEISS et al., 2009).

### 3.3. *Toxoplasma gondii*: UM PARASITO RE-EMERGENTE

Atualmente existe uma emergência e re-emergência de alguns patógenos, incluindo *T. gondii*. Muitos fatores estão correlacionados significativamente com o aparecimento dessas doenças, incluindo fatores socioeconômicos e ambientais (JONES et al., 2008). As mudanças decorrentes do aquecimento global, como aumento da temperatura, mudanças no período de chuvas e maior concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico afetam múltiplos processos biofísicos incluindo



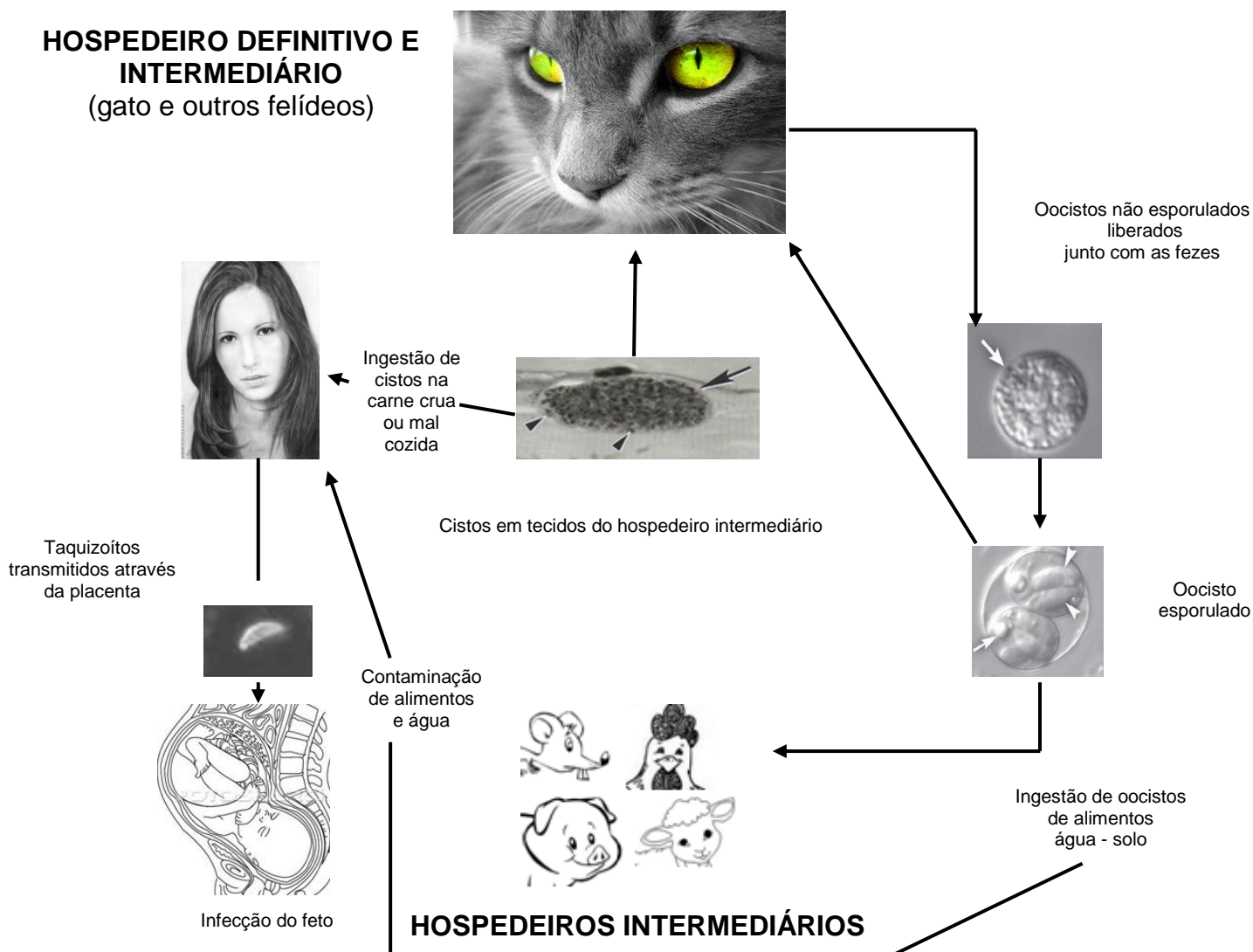
o ciclo de vida de vários patógenos. Todas estas mudanças no clima podem levar a maior sobrevivência de pequenos mamíferos, como os roedores jovens. Isto pode aumentar o risco deles transmitirem o parasito para os gatos (hospedeiros definitivos), levando ao aumento da prevalência do parasito no meio ambiente e resultando em casos de infecção humana e conseqüentemente aos animais de produção (hospedeiros intermediários) (MEERBURG e KIJLSTRA, 2009).

Outra possível causa desta emergência e re-emergência é a invasão humana do habitat selvagem ou o aumento da população selvagem no meio ambiente humano. Modificações do habitat natural por atividades humanas e o aumento da população de mascotes também estão associados com a emergência de zoonoses parasitárias, como é o caso da toxoplasmose (CHOMEL, 2008).

Fatores socioeconômicos como as mudanças nos sistemas de produção de animais de granjas podem resultar em uma maior interação entre animais selvagens e animais de produção. Observa-se ainda a reintrodução dos sistemas de criação livre, sob demanda da sociedade em prol do bem-estar dos animais, o que aumentou o risco de aquisição da infecção (MEERBURG e KIJLSTRA, 2009). Estes sistemas de criação chamados “orgânicos” possuem muitas similaridades com o tipo de criação rústico observado em Campos dos Goytacazes, e este seguramente é o principal fator associado à soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos no município (FRAZÃO-TEIXEIRA e DE OLIVEIRA, 2011).

### 3.4. CICLO BIOLÓGICO

Existem três formas infectantes de *T. gondii*: os taquizoítos (forma livre), os bradizoítos em cistos teciduais, e os esporozoítos em oocistos esporulados. (Figura 1). Os taquizoítos são de crescimento rápido e têm o tamanho aproximado de 2 x 6 µm. Entram na célula pela penetração ativa da membrana celular do hospedeiro e depois de entrar completamente na célula se forma o vacúolo parasitóforo, o qual é protegido dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Já, os taquizoítos se multiplicam de forma assexuada dentro das células hospedeiras por repetidas divisões até preencher totalmente a célula de parasitos (DUBEY et al., 1998; HILL et al., 2005), que se rompe ao liberá-los.



**Figura 1.** Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*. (Modificado de Dubey, 2009c)

Depois de poucas divisões *T. gondii* pode formar cistos teciduais, que variam de tamanho e permanecem intracelulares. Estes cistos podem conter centenas de parasitos que nesta etapa são conhecidos como bradizoítos. Os bradizoítos são menos susceptíveis à destruição pelas enzimas proteolíticas que os taquizoítos. Cistos teciduais contendo bradizoítos podem desenvolver-se em órgãos viscerais, incluindo pulmões, fígado, e rins. Eles têm maior tropismo pelo tecido muscular e neural, incluindo o cérebro, olhos, músculo esquelético e cardíaco. Cistos teciduais intactos podem não causar nenhum problema e persistir durante toda a vida. Quando cistos teciduais são ingeridos pelos gatos, a parede do cisto é rompida pelas enzimas proteolíticas estomacais que continuam atuando no intestino delgado e os bradizoítos liberados penetram as células epiteliais do intestino delgado e

iniciam o desenvolvimento de numerosas gerações de ciclos assexuados e sexuados de *T. gondii* (DUBEY et al., 1998; HILL et al., 2005; DUBEY, 2009a).

*T. gondii* se multiplica profusamente nas células intestinais dos felídeos (ciclo enteroepitelial) e estes estágios são conhecidos como esquizontes (Tipos A, B, C, D, e E). Alguns esquizontes provavelmente os de tipo D e E, liberam merozoítos que darão origem à formação de gametas. Em seguida o gameta feminino (macrogametócito) é fertilizado pelo gameta masculino (microgametócito) e começa a formação da parede do oocisto. Quando o oocisto está maduro há ruptura da célula epitelial liberando-o no lúmen intestinal, sendo então eliminado juntamente com as fezes dos felídeos (DUBEY et al., 1998; HILL et al., 2005; DUBEY, 2009a).

Dependendo da forma infectiva (taquizoítos, cistos teciduais, ou esporozoítos), os períodos pré-patentes dos felídeos podem variar. Os oocistos são liberados não esporulados, e esporulam fora do hospedeiro definitivo em um período de um a cinco dias dependendo da aeração, temperatura e umidade. Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos e estes por sua vez contêm quatro esporozoítos (DUBEY et al., 1998; HILL et al., 2005; DUBEY, 2009a; 2009c).

*T. gondii* pode parasitar seus hospedeiros intermediários ou definitivos sem causar doença clínica, ainda que haja relatos de graves manifestações clínicas. A maioria das infecções naturais ocorre provavelmente pela ingestão de carne infectada com cistos teciduais ou pela presença de oocistos em alimentos ou água contaminada com fezes de gato (TENTER et al., 2000; HILL et al., 2005). Os bradizoítos dos cistos teciduais ou esporozoítos dos oocistos penetram as células epiteliais intestinais e se multiplicam no intestino nas primeiras 24 horas da infecção (HILL et al., 2005).

A capacidade que tem *T. gondii* de atravessar barreiras biológicas é muito grande. Inicialmente, ele atravessa o epitélio intestinal e se dirige a sítios imunologicamente privilegiados, tal como a placenta e a barreira hemato-encefálica (BARRAGAN e SIBLEY, 2003). Nestes sítios, o parasito causa as mais severas patologias, e no caso da toxoplasmose congênita, diversas infecções no feto em desenvolvimento (ALVES et al., 1956; BOYER et al., 2005), complicações neurológicas em indivíduos imunocomprometidos (LUFT et al., 1993) e também patologias oculares em indivíduos sãos (ROBERTS e McLEOD, 1999).

A infecção também pode ocorrer por transfusões sanguíneas ou transplantes de órgãos. Nestas ocasiões deve-se ter especial cuidado com doadores pela emergência e re-emergência desta zoonose (CHOMEL, 2008).

### 3.5. TOXOPLASMOSE NO MUNDO

A infecção por *T. gondii* é encontrada em todos os continentes, incluindo a Antártida (DUBEY, 2009c). Em humanos a soroprevalência em nível mundial é alta (TENTER et al., 2000), e na América Latina é maior que na América do Norte e no Leste Asiático (DUBEY, 2009c), com títulos de anticorpos muito altos em alguns países como El Salvador, Costa Rica e Brasil (ARIAS, et al., 1996; REMINGTON et al., 1970; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). A toxoplasmose é mais comum em climas quentes e áreas baixas que em climas frios e regiões montanhosas, confirmando a influência das condições ambientais na sobrevivência dos oocistos (JONES et al., 2008; MEERBURG et al., 2009).

Em indivíduos imunocompetentes a infecção pode passar despercebida ou ser confundida com uma gripe comum (DUBEY, 2009c), mas, a literatura reporta casos de pessoas sãs que desenvolveram problemas de hepatite e encefalite pelo parasito (DOĞAN et al., 2007; HABEK et al., 2009) e casos fatais de toxoplasmose foram relatados na Guiana Francesa na América do Sul (DEMAR et al., 2007).

Pergola et al. (2010) relatam o caso de um homem de 32 anos que apresentava febre, adenopatias, artralgias, pericardite e miocardite aguda; também foram detectados crescimento rápido nos níveis de IgM e IgG, chegando à conclusão que a pericardite era por *T. gondii*, já que nenhuma outra causa óbvia de doença estava presente.

Outra complicação grave causada pela toxoplasmose são os problemas oftalmológicos que são encontrados, não só em casos de doença congênita (DUBEY, 2009c), mas também em indivíduos imunocompetentes como relatado por Nunura et al. (2010) no Peru. Neste relato, um homem sem sintomatologia aparente de 37 anos apresentou toxoplasmose severa caracterizada por pneumonia, retinocoroidite, hepatite e miosite.

Durante a última década a prevalência em geral de toxoplasmose diminuiu (DUBEY, 2009c), ainda que os problemas provocados por *T. gondii* em indivíduos imunocomprometidos sejam graves, principalmente em portadores do vírus HIV (LUFT et al., 1992; KHAN et al., 2005) os quais apresentam quadros severos de encefalite que podem levá-los ao óbito (LUFT et al., 1992). Pacientes soropositivos para *T. gondii* que têm sido submetidos a algum tipo de transplante podem sofrer reativação dos cistos presentes em seus tecidos durante a imunossupressão e desenvolver uma toxoplasmose aguda (SLAVIN, 2010), a qual alcança uma mortalidade de 60 a 90% (DEROUIN et al., 2008).

Ryan et al. (2010) reportaram um caso de uma paciente que foi submetida a transplante de células-tronco hematopoiéticas e 45 dias depois do transplante apresentou febre, fadiga e alterações da consciência. Um exame de fluido cérebro-espinhal revelou a presença de taquizoítos de *T. gondii*, mas, não tinha sorologias pré-operatórias para toxoplasmose.

Não só os pacientes imunocomprometidos vêm sendo alvo deste parasito, em estudos mais complexos relaciona-se a toxoplasmose com alterações do comportamento e personalidade (BROWN et al., 2005; MIMAN et al., 2010; BROWN et al., 2011). Hamidinejat et al. (2010) em um estudo realizado em 98 pacientes que sofriam esquizofrenia, encontraram uma soroprevalência maior que no grupo controle (57.1% e 29.2% respectivamente), chegando a conclusão que a exposição ao *T. gondii* pode levar à esquizofrenia.

Não se pode esquecer as graves consequências que traz a infecção durante a gravidez; a toxoplasmose congênita apresenta numerosas manifestações clínicas, incluindo calcificações intracraniais, convulsões, retardo psicomotor, estrabismo, retinocoroidite, microcefalia e hidrocefalia, que podem ser observadas na infância ou a uma idade avançada (SÁFADDI et al., 2003). Em muitos casos a infecção pode permanecer silenciosa durante todo o período gestacional, enquanto o parasito atravessa a placenta infectando o feto, ainda que a migração do parasito através desta barreira esteja mais frequentemente associada com toxoplasmose severa (BARRAGAN et al., 2003).

O diagnóstico da toxoplasmose congênita pode ser feito pela detecção do parasito em material coletado do recém-nascido (sangue do cordão umbilical e placenta) ou pela detecção de anticorpos específicos IgG persistentes a ano de

idade, sinal de hidrocefalia e calcificação à ultra-sonografia cerebral (NAESSENS et al., 1999; BESSIÈRES et al., 2001; CERMAKOVA et al., 2005; VAZ, 2006; FRICKER-HIDALGO et al., 2007). Casos de mulheres HIV-positivas que transmitem a toxoplasmose congênita a seus bebês são reportados na literatura. (AZEVEDO et al., 2010).

### 3.6. TOXOPLASMOSE NO BRASIL

Com a grande importância deste parasito em nível mundial e com as graves consequências que produz à saúde humana (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2009c), diferentes pesquisas vêm sendo realizadas no Brasil, as quais têm demonstrado uma alta prevalência de *T. gondii* tanto no homem como em animais.(GARCIA et al., 1999; DAGUER et al., 2004; DIAS et al., 2005; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2006; DUBEY et al., 2006; LOPES, et al., 2009; SROKA et al., 2010; ANDRE et al., 2010; SANTOS et al., 2010; FRAZÃO-TEIXEIRA e DE OLIVEIRA., 2011).

Spalding et al. (2003) em estudo realizado com 2.126 mulheres grávidas, atendidas em unidades do Sistema Único de Saúde da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, reportaram uma prevalência de infecção por *T. gondii* de 74.5%, sendo similar à encontrada no Rio de Janeiro (77,1%) por Meirelles Filho (1985). Prevalências muito altas, mas não tão altas como a reportada por Figueiró-Filho et al. (2005) onde a prevalência foi de 91,6% em gestantes do estado de Mato Grosso do Sul.

Os problemas oculares ocasionados por *T. gondii* parecem ser mais comuns e mais severos no Brasil que na Europa ou Norte da América (GILBERT et al., 2008). Em pesquisa realizada por Gilbert et al. (2008) compararam-se crianças do Brasil e da Europa que apresentavam problemas oculares por *T. gondii*, concluindo que *T. gondii* causa mais doenças oculares severas em crianças infectadas congenitamente no Brasil. Estas diferenças na frequência podem ser devido à infecção com mais genótipos virulentos que predominam no Brasil, mas são raramente encontrados em Europa.

Segundo revisão realizada por Millar et al. (2008b), a alta produção e o considerável consumo de carne suína no Brasil, tanto *in natura*, como em embutidos crus podem veicular *T. gondii* e tornar este alimento uma importante via de transmissão. No Brasil, em algumas localidades a ingestão de embutidos artesanais preparados com carnes desta espécie é uma via de transmissão importante, não só para os indivíduos que ingerem, mas também para aqueles que estão envolvidos com a sua preparação (DIAS et al., 2005). Estes autores demonstraram a presença de *T. gondii* em 13 das 149 amostras de linguiças tipo frescal, de diferentes fabricas da cidade de Londrina, Paraná, onde conseguiram isolar em um camundongo e os outros 12 foram soropositivos para o parasito pela Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

### 3.7. TOXOPLASMOSE EM CAMPOS DOS GOYTACAZES

Estudos realizados na região têm demonstrado a presença de *T. gondii* no meio ambiente e tecidos animais (da Da SILVA et al., 2003; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DUBEY et al., 2003; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). Bahia-Oliveira et al. (2003), encontraram uma soroprevalência de 84%, 62% e 23% na população de baixa, média e alta renda respectivamente, relacionando esta alta prevalência com o consumo de água não tratada, indicando a grande contaminação ambiental com oocistos.

Da Silva et al. (2003) em um estudo realizado em diferentes áreas do município, detectaram o parasito em corações e cérebros de galinhas; parasitos viáveis foram isolados de 61 (70,9%) de 86 galinhas. Dubey et al. (2003; 2008), reportaram grande variedade genética destes isolados. Galinhas são um bom indicador desta alta contaminação ambiental já que elas têm o hábito de ingerir porções de terra quando se alimentam e ciscam o solo, levantando pó e expondo também outros animais que convivem no mesmo espaço à infecção.

Frazão-Teixeira et al. (2006) em pesquisa realizada com cérebros de suínos comercializados no município, isolaram *T. gondii* de 6 (50%) das 12 amostras coletadas. Frazão-Teixeira et al. (2011), reportaram a alta diversidade genética de isolados de *T. gondii* de amostras de cérebros e corações de suínos coletados nos

açougues da cidade e Frazão-Teixeira e De Oliveira (2011) analisaram soros de bovinos e suínos a procura de anticorpos anti-*T. gondii* e encontraram uma soropositividade de 49,4%(38 de 77) e 11,5% (7 de 61), respectivamente, com alta soropositividade em suínos criados livremente (20,6%; 7 de 34). Isto confirma a extensa distribuição do parasito nesta região.

Abreu (2003) reportou uma prevalência de toxoplasmose congênita de uma entre 435 crianças nascidas vivas em estudo realizado entre 1999 e 2002. Fernandes et al. (2009) reportaram o caso de transmissão vertical de HIV e *T. gondii* por reativação em uma mulher grávida infectada cronicamente.

### 3.8. INFECÇÕES EM SUÍNOS

A prevalência de infecção por *T. gondii* em suínos (Quadro 1) depende do método usado na obtenção dos dados, os quais também têm variação entre países e entre as diferentes granjas em um mesmo país (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2009b; DUBEY, 2009c).

**Quadro 1.** Anticorpos anti-*Toxoplasma. gondii* em suínos no mundo usando dois testes diferentes nas mesmas amostras. (adaptado de Dubey, 2009c)

Local	Autor	n	%	Teste	Título
Chile	Tamayo et al. (1990)	1.474	28,1	DT	1:16
		1.474	30,1	IHA	-
Taiwan	Chang et al. (1990)	3.880	27,5	LAT	-
		3.880	47,1	ELISA	-
Suíça	Ljungström et al. (1994)	60	50	RIFI	-
		60	50	MAT	-
Brasil(Amazonas)	Cavalcante et al. (2006)	80	37,5	MAT	1:25
		80	43,7	RIFI	1:64
Alemanha	Damriyasa et al. (2005)	2.041	18,5	ELISA	-
		2.041	16,5	RIFI	-
EUA	Dubey et al. (2008)	48	25	ELISA	-
		48	70,83	MAT	-

ELISA = Reação Imunoenzimática. RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta. IHA = Hemoaglutinação Indireta. LAT = Teste de Aglutinação em Látex. MAT = Teste de aglutinação modificado.



Estudos epidemiológicos têm sido realizados em diferentes países para verificar a soroprevalência de anticorpos contra este parasito em suínos (Quadro 2).

**Quadro 2.** Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos no mundo (adaptado de DUBEY et al., 2009c).

Local	Autor	n	%	Teste	Título
Argentina	Venturini et al. (2004)	230	37,8	MAT	1:25
Austria	Edelhofer et al. (1994)	113	43,4	RIFI	1:16
Brasil	Guimarães et al. (1992)	198	90,4	RIFI	1:16
	Azevedo et al. (2009)	130	36,2	RIFI	1:50
	Frazão-Teixeira et al. (2011)	34	20,6	ELISA	-
Canadá	Poljak et al. (2008)	6.048	0,74	ELISA	-
Costa Rica	Arias et al. (1994)	496	43,8	RIFI	1:20
Polônia	Sroka et al. (1994)	106	26,4	MAT	-
Holanda	Kijlstra et al. (2008)	406	10,9	ELISA	-
Ghana	Arko-Mensah et al. (2000)	641	40,6	ELISA	-
Malasia	Chandrawathani et al. (2008)	100	0	RIFI	1:200
Alemanha	Fehlhaber et al. (2003)	1005	20,5	ELISA	-
EUA	Dubey et al. (2002)	55	92,7	MAT	1:10
	Gebreyes et al. (2008)	616	4,1	ELISA	-

ELISA = Reação Imunoenzimática. RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta. IHA = Hemoaglutinação Indireta. LAT = Teste de Aglutinação em Látex. MAT = teste de aglutinação modificado.

Os fatores de risco têm sido estudados e levam em conta a idade, o gênero, os sistemas de criação, a procedência dos animais, o acesso de animais ao cocho de ração e ao reservatório da água e ao não controle de roedores (DIDERRICH et al., 2000; BEZERRA et al., 2009; MILLAR et al., 2008a; PIASSA et al., 2010; GARCIA-BOCANEGRA et al., 2010b; HILL et al., 2010; GARCIA-BOCANEGRA et al., 2010a). Alguns estudos observaram diferenças significativas quanto ao sexo, sistema de criação e à procedência dos animais (BEZERRA et al., 2009; GARCIA-BOCANEGRA et al., 2010a), enquanto outros não observaram diferenças significativas quanto ao sexo e à idade dos animais (MILLAR et al., 2008a; AZEVEDO et al., 2010).

Os suínos são os que apresentam maior quantidade de cistos teciduais e, por conseguinte, mais *T. gondii* viáveis em seus tecidos (TENTER et al., 2000). Tem-se isolado parasitos de cérebro, coração, língua, diafragma e lombo de suínos

infectados naturalmente ou mesmo de embutidos feitos com carne ou de outras partes dos suínos (Quadro 3).

**Quadro 3.** Isolamento de *Toxoplasma gondii* viável de suínos naturalmente infectados (citado por DUBEY et al., 2009b).

País	Tipo de suíno	n	Positivos (%)	Tecidos analisados	Referências
Argentina	Terminado	109	14 (12,8) <sup>a</sup>	Diafragma	Omata et al. (1994)
Áustria	Terminado	253	1 (0,4) <sup>a</sup>	Cérebro, coração, diafragma	Edelhofer (1994)
Brasil	Terminado	28 <sup>b</sup>	7 (25)	Coração, cérebro, língua	Dos Santos et al. (2005)
	Terminado	12	6 (50) <sup>a</sup>	Cérebro	Frazão-Teixeira et al. (2006)
	Linguiças	149	13 (8,7) <sup>a</sup>	Lingüiça	Dias et al. (2005)
República Tcheca	Terminado	2.447	29 (1,1) <sup>a</sup>	Cérebro, diafragma	Hejlíček e Literak (1993)
Portugal	Terminado	37 <sup>b</sup>	15 (40,5)	Coração, cérebro	de Sousa et al. (2006)
EUA	Terminado	38 <sup>b</sup>	14 (36,8) <sup>a</sup>	Coração	Dubey et al. (2008); Velmurugan et al. (2009)
	Porcas	1.000	170 (17) <sup>a</sup>	Coração	Dubey et al. (1995a) and Velmurugan et al. (2009)
	Terminado	300	29 (9,6) <sup>c</sup>	Coração	Velmurugan et al. (2009)
	Terminado	55	51 (92,7) <sup>c</sup>	Coração, língua	Dubey et al. (2002), Lehmann et al. (2003)
	Varejo	2.094	7 (0,3) <sup>c</sup>	Lombo	Velmurugan et al. (2009) Dubey et al. (2005)

<sup>a</sup> Isolamento em camundongos

<sup>b</sup> Soropositivo

<sup>c</sup> Isolamento em gatos

Cistos teciduais foram encontrados em 24% de 50 suínos, 9,2% de 86 tecidos de ovinos, e nenhum de 60 bovinos em Maryland (EUA) (JACOBS 1960, citado por DUBEY e JONES 2008b).

*T. gondii* viáveis foram isolados de 51 de um total de 55 suínos destinados para consumo humano em Massachusetts (EUA). A presença do parasito foi confirmada quando corações e línguas dos suínos abatidos serviram de refeição para 55 gatos livres do parasito e foram verificados oocistos nas fezes (DUBEY et al., 2002).

A prevalência de *T. gondii* foi pesquisada em uma granja de Maryland (EUA) na qual os suínos eram criados livremente. Estes apresentavam um estado nutricional baixo e condições higiênicas deploráveis. Amostras de tecidos de 48 dos

100 suínos estavam disponíveis para o estudo e corações de 16 suínos com títulos altos à sorologia foram usados para prova biológica em gatos, dos quais 11 apresentaram oocistos em suas fezes. Corações de 22 suínos autolisados foram inoculados em camundongos e *T. gondii* foi isolado de três destes 22 suínos (DUBEY et al., 2008b).

O primeiro isolamento de *T. gondii* de suínos em Portugal foi reportado por de Sousa et al. (2006), onde amostras de cérebro e/ou coração de 37 suínos soropositivos foram digeridos em pepsina e inoculados em camundongos, isolando-se *T. gondii* de 15 suínos.

Nas décadas de 70 e 80 a prevalência de *T. gondii* diminuiu significativamente em suínos pela tecnificação nos sistemas de produção e medidas adequadas de higiene (TENTER et al., 2000; DIDERRICH et al., 2000). Atualmente, os consumidores demandam uma criação de suínos mais naturais, aumentando, portanto o risco de adquirir *T. gondii*, como apresenta um estudo realizado nos EUA, no qual são comparados dois sistemas de produção, um aberto e um fechado. Ao pesquisar a soropositividade para *T. gondii*, foi encontrada uma diferença significativa entre os dois sistemas com uma soroprevalência de 7% e 1% nos sistemas aberto e fechado, respectivamente (GEBREYES et al., 2008).

No Brasil, vários estudos têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar a presença de *T. gondii* em diferentes regiões. No Paraná, Millar et al. (2008a) estudaram a soroprevalência em 408 suínos criados e abatidos para consumo humano. As amostras foram examinadas por meio RIFI e a frequência encontrada foi de 25,5% de soropositivos. Na Bahia, Bezerra et al. (2009) coletaram amostras de sangue de 465 suínos de diferentes criações do Estado, para a pesquisa de anticorpos usando a técnica ELISA. Desses, 85 (18,27%) foram positivos para *T. gondii*.

Os estudos mencionados até agora contrastam com um estudo realizado na Malásia, onde foram tomadas amostras de diferentes espécies animais incluindo 100 suínos, mas, nenhum estava positivo para anticorpos anti-*T. gondii*; o teste usado foi RIFI (CHANDRAWATHANI et al., 2008).

No Brasil em 2005 foi reportado o primeiro isolamento de *T. gondii* viável de suínos terminados. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 49 (17%) de 286 suínos antes do abate, usando o MAT. Amostras de coração, cérebro e língua foram coletadas de 28 suínos soropositivos, digeridas em pepsina e inoculadas em cinco

camundongos por suíno. *T. gondii* viável foi isolado de sete suínos, todos os isolados foram letais para camundongo (dos SANTOS et al., 2005).

Em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Frazão-Teixeira et al. (2006) isolaram *T. gondii* de encéfalos de suínos comercializados no município, encontrando uma porcentagem de 50% dos cérebros positivos de uma amostragem de 12.

A maioria das infecções em suínos apresenta-se de maneira subclínica e infecção transplacentária é menos comum que infecção pós-natal. Ainda que abortamentos relacionados ao *T. gondii* sejam incomuns, eles podem ocorrer em fêmeas suínas infetadas durante a prenhez (DUBEY 1986, citado por KIM et al., 2009).

Na Coréia do Sul foi reportado um surto de abortamentos suínos associados com *T. gondii*, no qual as fêmeas suínas apresentavam sinais clínicos que incluíam febre alta, anorexia gradual, vômito, depressão, prostração, abortamento e algumas chegaram ao óbito (KIM et al., 2009). Soros de 12 fêmeas que sofreram abortamentos e cinco fêmeas normais foram submetidos a exames, das 17 sorologias sete foram positivas para *T. gondii* pelo LAT. Foram encontrados múltiplos focos necróticos no pulmão, fígado, nodos linfáticos e cérebro em amostras de duas fêmeas que morreram e cinco fetos abortados da mesma ninhada e microscopicamente, taquizoítos estavam presentes nas lesões. (KIM et al., 2009).

Nos EUA, a carne de suínos é considerada como a fonte de infecção de *T. gondii* mais importante para o homem. Estudos genéticos têm sido feitos para comparar cepas isoladas de suínos com as provenientes de infecções humanas, com o objetivo de entender as vias de transmissão deste parasito (DUBEY, 2009c). Em um estudo feito por Velmurugan et al. (2009), 182 isolados de *T. gondii* de suínos domésticos de varias fontes nos EUA foram genotipados usando 10 marcadores, concluindo que existe predominância dos tipos clonais II e III, e pouca diversidade de linhagens de *T. gondii* não reconhecida previamente circulando entre os suínos domésticos usados para consumo humano.

Dos Santos et al. (2005) no Brasil verificaram que de sete isolados de suínos, dois foram tipo I e cinco foram tipo III, usando o marcador SAG2. De Sousa et al. (2006) trabalhando com isolamento de *T. gondii* em suínos em Portugal verificaram que de 15 isolamentos realizados 11 foram tipo II, e quatro tipo III usando SAG2 e seis marcadores micro-satélites. Da Silva et al. (2005) reportaram a presença do

parasito em 19 (27,14%) de 70 amostras de linguiças comercializadas nos estabelecimentos da cidade de Botucatu, SP, sendo 14 cepas genotipadas como tipo I e cinco como tipo II usando somente o marcador SAG2. Belfort-Neto et al. (2007) amplificaram diretamente DNA do parasito de 50 amostras de língua e 50 de diafragma, sendo positivas 33 (66%) amostras de língua e 17 (34%) de diafragma, encontrando que de quatro amostras positivas, todas foram do tipo I para o marcador SAG2, mas quando outros marcadores foram analisados, estas cepas tinham tipo III para os marcadores BTUB, SAG3 e GRA6, sugerindo que genótipos incomuns de *T. gondii* são encontrados no Brasil.

Frazão-Teixeira et al. (2011) ao analisar geneticamente cinco cepas de *T. gondii* isolados de corações e cérebros de suínos comercializados nos açougues da cidade de Campos dos Goytacazes, RJ, identificaram quatro genótipos, mas não foi detectado qualquer genótipo clonal, confirmando a ampla diversidade genética dos isolados de *T. gondii* no Brasil.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. SELEÇÃO DOS AÇOUGUES E AQUISIÇÃO DAS CARNES

Foram selecionados para o estudo estabelecimentos populares que comercializam carne suína para consumo humano no município de Campos, RJ. Foi realizado um levantamento e mapeamento dos estabelecimentos para a coleta das amostras através de marcação *in loco* com GPS (Garmin Nüvi w200). Trinta e duas amostras de tecidos musculares de suínos foram adquiridas em 18 açougues do município, 27 amostras a fresco e cinco congeladas. As amostras foram mantidas em refrigeração com temperatura em torno de 4 a 8°C, com o processamento até 2 horas após a coleta. O tipo de tecido muscular adquirido dependeu da disponibilidade no estabelecimento comercial (Costela, Lombo e Pernil) e a quantidade de cada tecido foi de 500 g.

### 4.2. DIGESTÃO PÉPTICA DAS AMOSTRAS DE CARNES

A aplicação das técnicas de digestão péptica e prova biológica baseou-se em protocolos previamente estabelecidos por Dubey (1998; 2009c) com adaptações de acordo com Frazão-Teixeira (2009). Os procedimentos foram realizados no NUPAP.

Cada tecido foi triturado por inteiro e separadamente, utilizando-se para isso um liquidificador de uso doméstico. Durante a trituração se adicionou um volume mínimo de PBS para facilitar o procedimento. Foram então retirados 40 g de cada homogeneizado, que foram armazenados individualmente em frascos de 200 ml devidamente identificados. Completou-se o conteúdo com solução de pepsina ácida até o volume de 200 ml. A pepsina ácida foi preparada com a adição de 2,6 g de pepsina, 5 g de cloreto de sódio e 7 ml de ácido clorídrico, completando-se com água destilada até atingir um volume total de 500 ml. Com o auxílio de um peagâmetro, estabilizou-se o pH com Hidróxido de sódio entre 1,1 e 1,2.

O processo de digestão foi realizado com o uso de um agitador orbital termostatizado (Incubadora “Shaker” Nova Técnica NT- 712), programado para uma temperatura de 37°C durante uma hora. Após este período, o material digerido foi passado em tamis com gaze dupla, o filtrado distribuído em quatro tubos de 50 ml e então centrifugado a 1300g por 10 minutos.

Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, restando apenas uma fração de aproximadamente 5 ml no interior de cada tubo. Completou-se o conteúdo com solução neutralizadora até atingir um volume final de 10 ml. Para o preparo da solução neutralizadora (bicarbonato de sódio 1,2%) adicionaram-se 12g de bicarbonato de sódio e água destilada até atingir um litro. O pH da solução final foi estabilizado em 8,3.

O conteúdo total de cada um dos quatro tubos foi reunido em um único tubo de 50 ml. Este foi centrifugado e processado a 1300g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 5 a 10 ml de solução antibiótica, deixando agir à temperatura ambiente por 30 minutos. A solução antibiótica foi preparada com a adição de 100 µg/ml de estreptomicina e 1000 UI de penicilina (Pencivet®, 1mg/ml). O volume utilizado para inoculação em camundongos foi de 1 ml/cada.

### 4.3. PROVA BIOLÓGICA

#### 4.3.1. Inoculação

Foram utilizados camundongos albinos suíços, pesando entre 20 e 25 g, oriundos do Biotério da UENF. Uma dose de um ml da suspensão contendo o produto da digestão péptica foi inoculada via subcutânea em três camundongos. Outros três camundongos receberam inóculo contendo apenas tampão salina fosfato (PBS) e serviram como controle para cada dia de inoculação.

### 4.3.2. Isolamento do parasito

Cada grupo de camundongos inoculados, referente a um tecido analisado, foi mantido em uma caixa devidamente identificada e recebeu ração própria para a espécie e água *ad libitum*. Os animais foram observados durante seis semanas. Aqueles que morreram foram examinados para eventual presença do parasito em esfregaço de pulmão em lâminas, através da observação em microscópio óptico. Os soros dos camundongos que não morreram ao fim do período de observação foram testados quanto à presença de anticorpos anti-*T. gondii* através do MAT.

A nomenclatura dos isolados de *T. gondii* obtidos nesta pesquisa baseou-se em designações previamente descritas por Frazão-Teixeira et al. (2011), e a numeração foi estabelecida a partir do último número citado nas pesquisas com isolados do parasito em suínos até esta data.

#### a) Esfregaço de pulmão em lâminas

Daqueles animais que morreram foram colhidas amostras de pulmão. Para a realização de esfregaços pulmonares, um pedaço de aproximadamente 5 mm do pulmão foi espremido sobre uma lâmina de microscopia comum com o auxílio de uma pinça para liberação de fluido e células. Foi colocada uma gota de solução salina (NaCl 0,9%) sobre o esfregaço, homogeneizando-se com o próprio pedaço de tecido. Uma lamínula foi colocada sobre o esfregaço e observada ao microscópio óptico sob objetiva de 40x em busca de taquizoítos de *T. gondii*. Quando dois ou mais taquizoítos foram encontrados, a amostra foi considerada positiva.

#### b) Teste de Aglutinação Modificado - MAT

A técnica para a detecção dos anticorpos anti-*T. gondii* em soros dos camundongos inoculados foi realizada como descrita por Dubey e Desmouts (1987).



A suspensão de antígeno foi composta de 2,5 ml de tampão borato pH 8,95 contendo 0,4% de albumina sérica bovina (BSA), 35 µl de 2-mercaptoetanol, 50 µl de azul de Evans a 2mg/ml e 100 µl da suspensão de taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH inativados com formalina, obtidos do estoque do Animal Parasitic Diseases Laboratory (APDL). Em cada poço da placa foram adicionados 25 µl da solução de antígeno e 25 µl dos soros previamente diluídos a 1:25. O soro controle positivo foi diluído em série nos oito poços da fileira 12 da placa como segue: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, e 1:3200, a placa foi coberta com uma fita adesiva transparente e incubada a 37°C por 12 horas. A leitura da reação baseou-se no perfil de sedimentação da suspensão de taquizoítos, onde a formação de uma teia indica a presença de anticorpos e a formação de um ponto azul no fundo do poço indica a ausência de anticorpos.

#### **4.3.3. Eutanásia dos camundongos**

A manutenção e o manuseio dos animais, incluindo o procedimento de eutanásia, seguiram os princípios éticos em pesquisa com animais de experimentação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2008), e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UENF, número de protocolo 108.

#### **4.4. DETECÇÃO DO DNA DE *Toxoplasma gondii* EM CARNES DE SUÍNOS**

Depois da trituração da carne, foram retirados pelo menos 50 mg de cada homogeneizado, que foram armazenados a – 20°C individualmente em tubos de 2 ml até seu processamento para PCR a procura de DNA de *T. gondii*.

#### 4.4.1 Extração do DNA

A extração foi realizada utilizando-se o kit DNeasy<sup>®</sup> da Qiagen, de acordo com o protocolo do fabricante com modificações preconizadas por Frazão-Teixeira (2009).

Foi utilizado o protocolo spin-column para tecidos animais (os reagentes citados a seguir foram fornecidos pelo fabricante). Dos 50 mg do triturado de carne retirou-se 25 mg que foram colocados em um tubo de centrífuga de 1,5 ml. Foram adicionados 180 µl do tampão ATL e 20 µl de proteinase K, homogeneizado vortex (Biomixer<sup>®</sup> QL-901) e incubados sob agitação em banho-maria a 56°C (Nova Técnica<sup>®</sup> NT- 248) até que o tecido tivesse sido completamente lisado, o que aconteceu em 2 horas. Os tubos foram homogeneizados em vortex por 15 segundos, adicionaram-se 200 µl do tampão AL e novamente foram homogeneizados em vortex. Foram adicionados 200 µl de etanol (96 a 100%), homogeneizados em vortex novamente. É importante adicionar o tampão AL e o etanol à amostra e misturá-los imediatamente através do vórtex ou pipetagem para permitir que haja uma solução homogênea.

A mistura é então pipetada (incluindo qualquer precipitado) na coluna mini spin, acoplada a um tubo coletor de 2ml (fornecidos pelo fabricante). Os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm (Minispin Eppendorf<sup>®</sup> AG 5452) e em seguida descartaram-se os filtrados e os tubos coletores. As colunas mini spin foram acopladas a novos tubos coletores, adicionaram-se 500 µl de tampão AW1 e foram centrifugadas durante um minuto a 13.200 rpm. Novamente os filtrados e os tubos coletores foram descartados. As colunas mini spin foram acopladas a novos tubos coletores, foram adicionados 500 µl de tampão AW2 e centrifugados durante três minutos a 13.200 rpm para secar a membrana DNeasy<sup>®</sup>. Foram descartados os filtrados e os tubos coletores e as colunas mini spin acopladas a um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml (Axygen Scientific<sup>®</sup>; não fornecido pelo fabricante). Foram adicionados 50 µl de tampão AE (diluído 1:10 em água para PCR) diretamente à membrana DNeasy<sup>®</sup>. A solução foi incubada à temperatura ambiente por um minuto e centrifugada também por um minuto a 13.200 rpm para eluição. Foram removidos os mesmos 50 µl e aplicados à mesma coluna novamente, utilizando-se o mesmo tubo eppendorf.

O conteúdo foi incubado à temperatura ambiente por um minuto e centrifugado também por um minuto a 13.200 rpm para eluição. Os tubos foram identificados apropriadamente e mantidos a -20°C até a realização da PCR.

#### **4.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

O DNA produto da extração das carnes de suínos foi amplificado para um marcador genético, SAG3, através de duas reações: Primária (Iniciador F: CAACTCTCACCATTCCACCC e Iniciador R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA) e Secundária (Iniciador F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA e Iniciador R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA). Os volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados para o preparo das soluções nas amplificações primária e secundária estão contidos nos quadros 4 e 5.

Para a reação primária foram pipetados (Gilson<sup>®</sup>) 47 µl da solução mix (Quadro 5) e posteriormente adicionados 3 µl de cada amostra de DNA em cada um dos microtubos devidamente identificados, completando 50 µl de solução final. A enzima Taq DNA polimerase foi previamente mantida em recipiente com gelo e adicionada somente quando da adição das amostras. O programa da amplificação primária ao termociclador (Eppendorf<sup>®</sup> MastercyclerPersonal 5332) foi estabelecido como no quadro 6.

Para a reação de amplificação secundária (Quadro 5) o produto da reação primária foi utilizado no lugar da amostra de DNA original. Foram então adicionadas 49 µl destas soluções para cada microtubo de 0,2 ml. Em seguida foi adicionado 1 µl do produto da respectiva reação primária. Os microtubos foram devidamente identificados para cada amostra, e inseridos no termociclador para incubação de acordo com a mesma programação descrita para a reação de amplificação primária (Quadro 4).

**Quadro 4.** Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações primárias de nested PCRs realizadas em amostras de carnes suínas comercializadas no Município de Campos dos Goytacazes, RJ para detecção de fragmentos de DNA de *Toxoplasma gondii*

Reagente	1 reação	Especificações
Tampão 10X (com MgCl <sub>2</sub> )	5 µl	MP Biomedicals®
dNTPs (2mM)	5 µl	MP Biomedicals®
Iniciador F (50 pmol)	0,5 µl	Eurofins®
Iniciador R (50 pmol)	0,5 µl	Eurofins®
Taq polimerase (5 U/µl)	0,5 µl	MP Biomedicals®
Amostra de DNA	3 µl	-
Água para PCR	35,5 µl	Gibco®

**Quadro 5.** Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações secundárias de nested PCRs realizadas em amostras de carnes suínas comercializadas no Município de Campos dos Goytacazes, RJ para detecção de fragmentos de DNA de *Toxoplasma gondii*.

Reagente	1 reação	Especificações
Tampão 10X (com MgCl <sub>2</sub> )	5 µl	MP Biomedicals®
dNTPs (2mM)	5 µl	MP Biomedicals®
Iniciador F (50 pmol)	0,5 µl	Eurofins®
Iniciador R (50 pmol)	0,5 µl	Eurofins®
Taq polimerase (5 U/µl)	0,5 µl	MP Biomedicals®
Produto da reação primária	1 µl	-
Água para PCR	37,5 µl	Gibco®

**Quadro 6.** Programa para as amplificações primárias e secundárias de nested PCRs realizadas em amostras de carnes suínas comercializadas no município de Campos dos Goytacazes, RJ para detecção de fragmentos de DNA de *Toxoplasma gondii*

Número de ciclos	Temperatura	Período
1	94°C	4 minutos
35	94°C	40 segundos
	58°C	40 segundos
	72°C	40 segundos
1	72°C	10 minutos
1	4°C	∞

Os produtos da nested PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio e imerso em tampão TAE 10X em cuba horizontal por 45 minutos a 100mV.

## 5. RESULTADOS

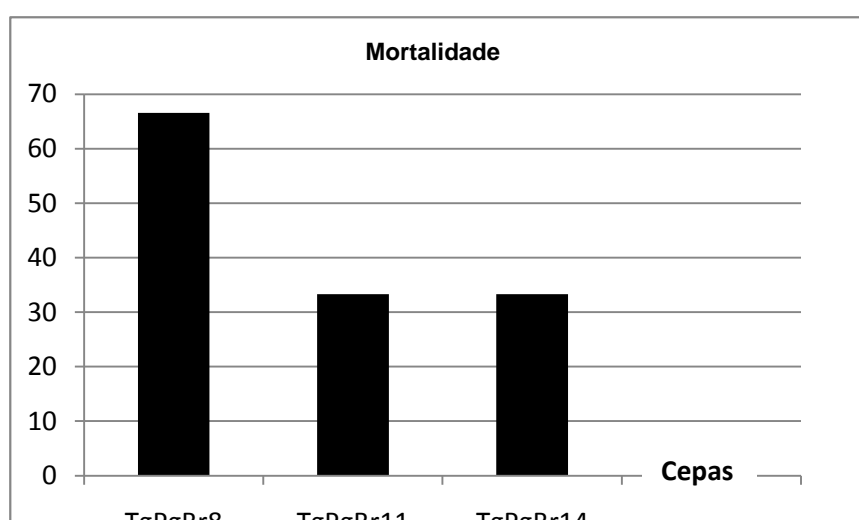
Três cepas viáveis de *T. gondii* (9,38%) foram detectadas nas 32 amostras de carne de suínos analisadas; estes isolados foram designados TgPgBr8, TgPgBr11 e TgPgBr14. Os dados a respeito da infectividade e mortalidade em camundongos podem ser observados na tabela 1.

**Tabela 1.** Detecção de parasitos viáveis de *Toxoplasma gondii* presentes em carnes suínas oriundas de açougues do Município de Campos dos Goytacazes, RJ

Número da amostra	Tecido	Conservação	Data da coleta	Prova biológica	Cepa
9	Pernil	a fresco	09/07/10	(3/3/2) <sup>a</sup>	TgPgBr8
20	Pernil	a fresco	03/09/10	(3/2/1) <sup>a</sup>	TgPgBr11
26	Lombo	a fresco	08/09/10	(3/3/1) <sup>a</sup>	TgPgBr14

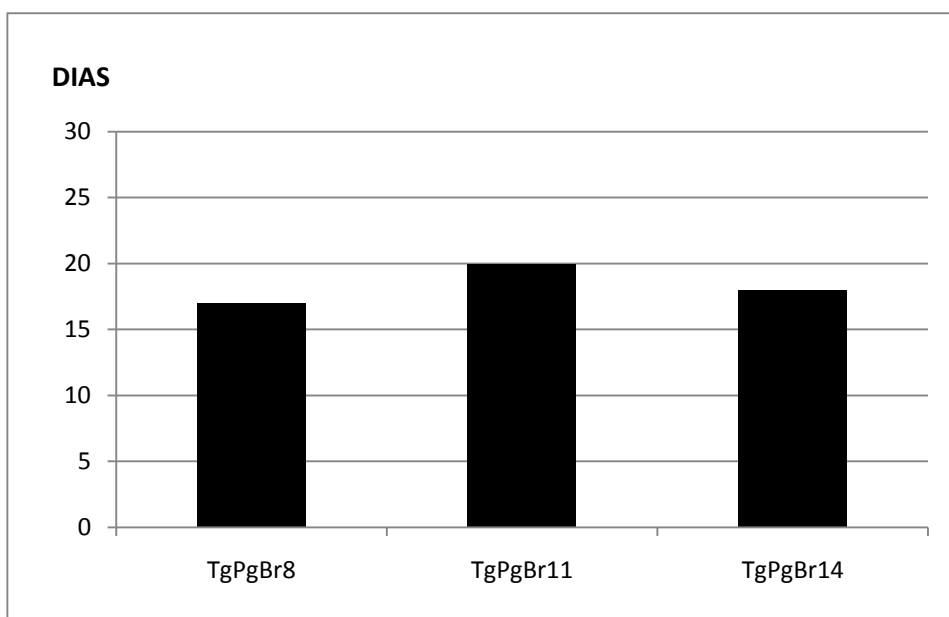
<sup>a</sup> Número de camundongos inoculados/infectados/mortos

Dois destes isolados foram obtidos de pernil de suíno (TgPgBr8 e TgPgBr11) e um de lombo (TgPgBr14). Todos os isolados foram obtidos de tecidos comprados de diferentes açougues do município de Campos, RJ. O isolado TgPgBr8 foi letal em 66,66% dos camundongos infectados primariamente. Os isolados TgPgBr11 e TgPgBr14 foram letais em 33,33% dos camundongos infectados primeiramente (Figura 2).



**Figura 2.** Percentual de mortalidade dos camundongos infectados com cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de carnes de suínos comercializados em açougues do município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Os camundongos que apresentaram sinais clínicos da doença com o isolado TgPgBr8 morreram 17 dias após a inoculação (DAI) (Figura 3). Para estes, foram feitos esfregaços de pulmão verificando a presença de taquizoítos. O camundongo que não morreu durante o período de observação foi testado pelo MAT e considerado positivo (título  $\geq 1:25$ ). Para o isolado TgPgBr11, um camundongo morreu ao 20° DAI (Figura 3), verificando-se a presença de taquizoítos em esfregaço de pulmão. Para os dois camundongos que não morreram foi realizado MAT, sendo considerado um camundongo positivo e o outro negativo. Para o isolado TgPgBr14, um camundongo morreu ao 18° DAI (Figura 3), verificando-se a presença de taquizoítos em esfregaço de pulmão e os camundongos que não morreram também foram considerados positivos pelo MAT. Os camundongos inoculados com as demais 29 amostras sobreviveram ao período de observação e foram negativos para o MAT.



**Figura 3..** Período de sobrevivência dos camundongos infectados com cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de carnes de suínos comercializadas em açougues do município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Os resultados da PCR para as 32 amostras de carne suína são reportados na tabela 2. O número de amostras positivas somente por PCR foi de oito (25%), nomeadas TgPgBr6, TgPgBr7, TgPgBr9, TgPgBr10, TgPgB12, TgPgBr13, TgPgBr15 e TgPgB16; no total foram detectados fragmentos de DNAs de *T. gondii*

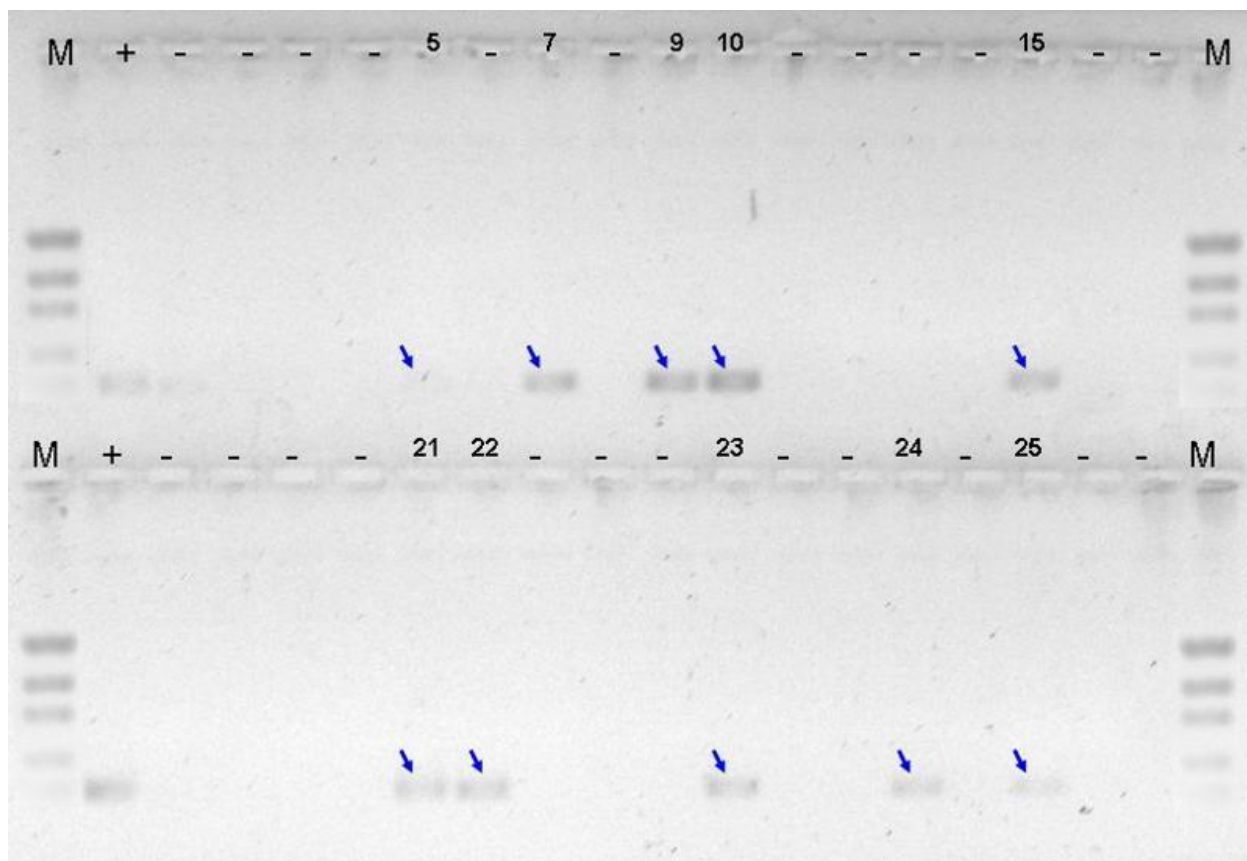
em 10 amostras (31,25%) Figura 4, sendo sete de lombo (36,84%) e três de pernil (37,5%). Na amostra número 20 a detecção do *T. gondii* foi realizada somente pela prova biológica, embora nas amostras números nove e 26 o parasito tenha sido detectado por PCR e prova biológica. No total, 11 (34,38%) das 32 amostras de carnes de suínos provenientes de açougues do município de Campos foram positivas para *T. gondii*.

**Tabela 2.** Detecção de fragmentos de DNA de *Toxoplasma gondii* presentes em carnes suínas oriundas de açougues do município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Amostra	Tecido	Conservação	Açougue	Data da coleta	PCR	Designação
1	Costela	a fresco	1(C)*	18-05-10	-	
2	Lombo	a fresco	2(C)*	21-05-10	-	
3	Costela	a fresco	3(C)*	21-05-10	-	
4	Lombo	a fresco	4(C)*	07-06-10	-	
5	Lombo	a fresco	1(C)*	07-06-10	+	TgPgBr6
6	Lombo	a fresco	5(C)*	07-06-10	-	
7	Pernil	a fresco	6(D)*	06-07-10	+	TgPgBr7
8	Lombo	congelada	7(E)*	09-07-10	-	
9	Pernil	a fresco	8(J)*	09-07-10	+	TgPgBr8
10	Lombo	a fresco	9(K)*	09-07-10	+	TgPgBr9
11	Lombo	a fresco	10(H)*	09-07-10	-	
12	Lombo	congelada	11(B)*	17-08-10	-	
13	Pernil	congelada	12(B)*	17-08-10	-	
14	Lombo	congelada	13(A)*	23-08-10	-	
15	Lombo	a fresco	14(I)*	23-08-10	+	TgPgBr10
16	Lombo	a fresco	15(F)*	25-08-10	-	
17	Lombo	a fresco	16(G)*	25-08-10	-	
18	Lombo	congelada	17(G)*	25-08-10	-	
19	Lombo	a fresco	4(C)*	03-09-10	-	
20	Pernil	a fresco	1(C)*	03-09-10	-	TgPgBr11
21	Lombo	a fresco	2(C)*	03-09-10	+	TgPgBr12
22	Lombo	a fresco	3(C)*	03-09-10	+	TgPgBr13
23	Lombo	a fresco	5(C)*	03-09-10	-	
24	Lombo	a fresco	18	05-09-10	-	
25	Lombo	a fresco	4(C)*	08-09-10	-	
26	Lombo	a fresco	2(C)*	08-09-10	+	TgPgBr14
27	Pernil	a fresco	1(C)*	08-09-10	-	
28	Pernil	a fresco	5(C)*	08-09-10	-	
29	Pernil	a fresco	1(C)*	14-09-10	+	TgPgBr15
30	Lombo	a fresco	4(C)*	14-09-10	-	
31	Lombo	a fresco	5(C)*	14-09-10	+	TgPgBr16
32	Pernil	a fresco	2(C)*	14-09-10	-	

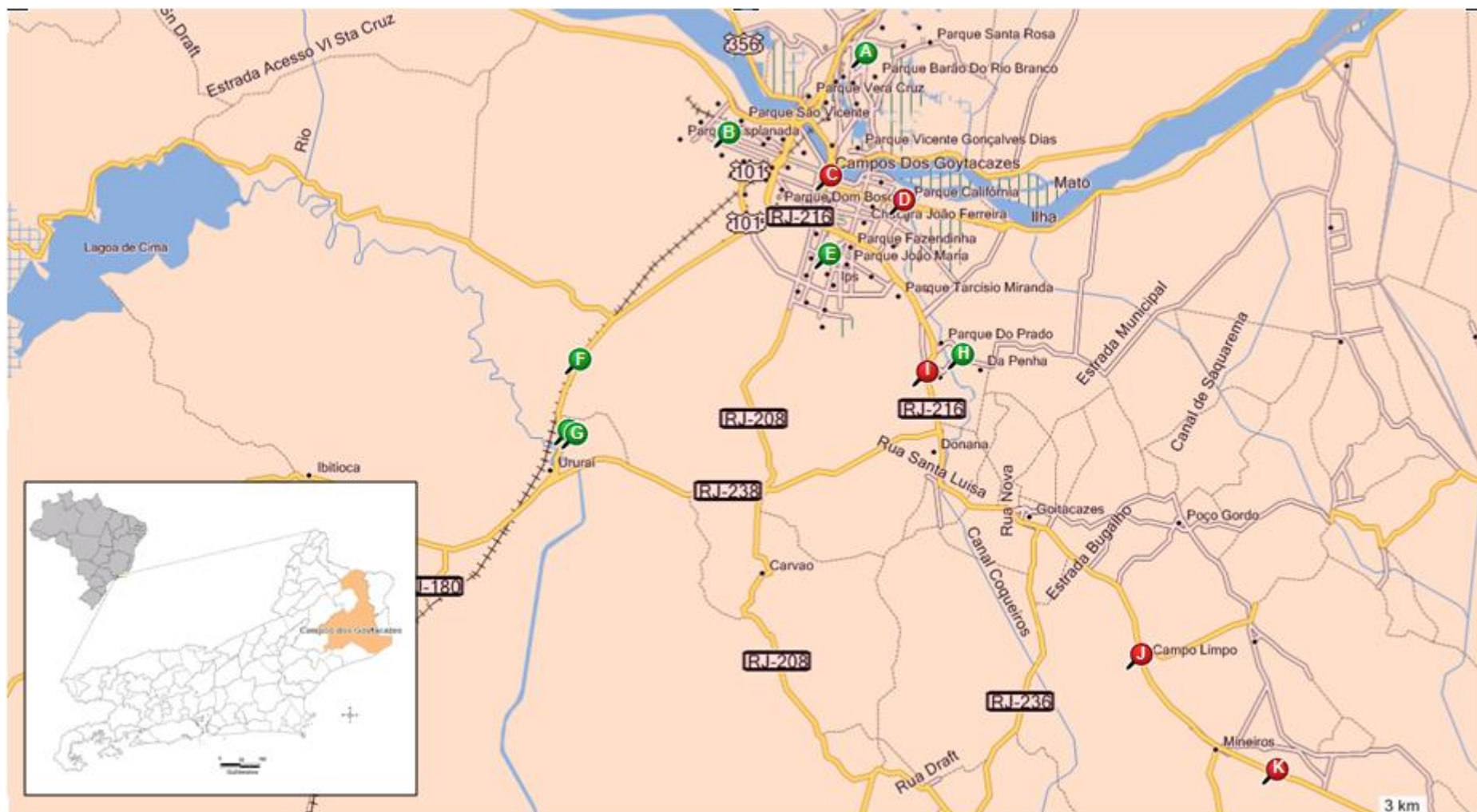
\* Localização dos açougues na figura 2.





**Figura 4.** Fragmentos de DNA de *Toxoplasma gondii* detectados em carnes suínas comercializadas nos açougues de Campos, RJ usando o marcador SAG3 (225 bp). Setas amostras positivas.

A localização dos açougues dos quais foram coletadas as amostras de carne de suínos a fresco ou congeladas em Campos, RJ pode ser observada na figura 3.



**Figura 5.** Mapa das áreas de coleta de carne suína no município de Campos dos Goytacazes. Em vermelho, áreas que contêm açougues cujas carnes foram consideradas infectadas por *Toxoplasma gondii*.

## 6. DISCUSSÃO

Em estudos anteriores realizados em Campos, RJ se detectou a presença de *T. gondii* em encéfalos de suínos (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006; 2011), o que é indicio da presença de cistos em outros tecidos. No presente estudo, parasitos viáveis foram encontrados em cortes suínos pernil e lombo, confirmando o risco real de infecção que existe com o consumo de carne crua ou mal cozida de suíno (SUAREZ-ARANDA et al., 2000) neste município.

Dubey et al. (1984) estudaram a persistência de cistos de *T. gondii* em tecidos de suínos infectados experimentalmente. Oito suínos foram infectados com oocistos (100 a 10.000) e, após eutanásia nos dias 38, 38, 91, 126, 168, 169, 170 e 171, realizou-se prova biológica em camundongos, isolando-se *T. gondii* de cérebro e coração dos oito suínos, de língua de sete, de pernil de cinco, do diafragma de quatro, de rins, fígado e intestino delgado de dois, e de glândulas salivares e olhos de um suíno. Concluiu-se então, que *T. gondii* pode persistir em tecidos comestíveis ao menos 171 dias, podendo infectar tanto animais como humanos.

Em outro estudo feito por Dubey (1988), 16 suínos foram alimentados com oocistos, resultando soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii* 14 suínos. Após eutanásia entre os dias 103 e 875 após inoculação, *T. gondii* foi isolado do cérebro de 12 suínos, de coração de 11, de língua de 10, de diafragma de seis e de cortes comerciais (paleta, pernil, costela, lombo, bacon e rabo) de cinco suínos infectados, existindo uma correlação positiva entre os resultados sorológicos e a presença de cistos. As pesquisas acima citadas foram realizadas em suínos infectados experimentalmente com oocistos, mas no presente estudo os suínos estavam naturalmente infectados, sendo real o risco de infecção a qual esta exposta a população. O presente trabalho reforça, portanto, a hipótese de Frazão-Teixeira et al. (2011), que afirmam que a alta soroprevalência verificada em suínos criados extensivamente no município de Campos, RJ pode representar presença do parasito na carne e conseqüentemente risco de infecção à população humana.

Frazão-Teixeira et al. (2011) encontraram uma soroprevalência para anticorpos anti-*T. gondii* de 20,6% em suínos mantidos sob sistema de criação domiciliar em Campos, RJ e isolaram *T. gondii* em seis (50%) de 12 amostras de

cérebros (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006), também foram isolados parasitos em dois de 16 amostras de corações e em três de 19 amostras de cérebros de suínos de cinco açougues do mercado municipal da cidade (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). Na atual pesquisa, a presença de *T. gondii* em carnes de suínos comercializadas nos açougues de Campos, RJ foi de 34,38%, sendo 9,38% detecções por prova biológica e 31,25% por PCR. Muitos açougueiros adquirem sua carne de suínos criados em propriedades familiares da cidade, mas em muitos casos estes animais são criados pelo próprio açougueiro no quintal de sua residência (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). Estes dados encontrados levam a inferir que existe um risco real de adquirir toxoplasmose pelo consumo de carne crua ou mal cozida de suínos em Campos, RJ, já que tem presença de parasitos viáveis nas carnes que podem ser consumidas por animais e pelo homem. Por outro lado a detecção do parasito por PCR demonstra a presença do parasito, mas algum procedimento de conservação levou o parasito à morte e, por conseguinte a possibilidade de infecção foi eliminada (KOTULA et al., 1991; TENTER et al., 2000) ou ainda a quantidade de parasito não foi suficiente para ser detectada em prova biológica utilizando camundongo (NAVARRO et al., 1992; DUBEY et al., 2005).

*T. gondii* pode estar presente em qualquer órgão ou tecido de suínos (DUBEY, 1986; DUBEY et al., 2002), os quais são distribuídos *in natura*, como as amostras coletadas no presente trabalho, ou são usados para elaboração de embutidos, aumentando o risco de infecção, como foi reportado por Dias et al., (2005). Estes autores verificaram a presença de *T. gondii* em lingüiças de origem suína na cidade de Londrina, PR., uma região onde estes produtos são produzidos em grande escala e não raramente consumidos mal cozidos ou mesmo crus. Um suíno infectado pode ser fonte de infecção para muitos humanos (DUBEY, et al., 2008b).

Na pesquisa realizada por Navarro et al. (1992), foi realizada uma coleta de 117 amostras de carne e 36 amostras de cérebros de suínos em diferentes açougues da região de Londrina, PR. Isolou-se *T. gondii* em quatro amostras de carne (3,42%), mas, das amostras de cérebro não houve nenhum isolamento direto, encontrando-se oito amostras com títulos positivos na RIFI nos camundongos inoculados. Comparando com o presente trabalho de 32 amostras de carnes de suínos, isolou-se *T. gondii* em três amostras (9,38%), um percentual maior de isolados, ainda que o número de amostras tenha sido menor. Tem que considerar

que em trabalhos desta natureza pode-se falhar na tentativa de identificar tecidos contaminados, já que a quantidade de amostra é pequena, há possibilidade de perdas durante a digestão péptica e há diferenças na concentração de *T. gondii* em diferentes tecidos suínos (NAVARRO et al., 1992; DUBEY et al., 2005)

Dubey (2002) reportou a presença de *T. gondii* em 51 de 55 suínos destinados para consumo humano; gatos livres de infecção foram alimentados com corações e línguas e suas fezes analisadas a procura de oocistos. Dois dos gatos que liberaram oocistos foram alimentados com tecidos de suínos que estavam negativos em diferentes testes sorológicos (Sabin–Feldman dye test, o MAT e o Western blot), indicando que o parasito pode estar presente em suínos, mas podem existir falhas em sua detecção. No presente estudo foram usadas duas técnicas para detectar *T. gondii* em carne de suínos e conseguiu isolar com a prova biológica três cepas (9,38%) e detectar com PCR 10 amostras positivas (31,25%). A PCR tem sido usada para detectar infecção por *T. gondii* (GROVER et al., 1990; FRICKER-HIDALGO et al., 1998). Warnekulasuriya et al. (1998), detectaram uma (1,5%) amostra positiva de 67 amostras de carne curada analisadas com PCR, sendo confirmada a viabilidade do parasito com cultura de células. Aspinall et al. (2002) no Reino Unido analisaram 71 amostras de carne de diferentes animais com PCR à procura de *T. gondii*, detectando a presença do parasito em 27 (38%), similar ao encontrado no presente estudo. É provável que um número significativo destes parasitos detectados estivesse viável como em nosso estudo, onde 2 amostras foram positivas tanto na prova biológica como na PCR.

Yai et al. (2003) avaliaram a infecção experimental em suínos por prova biológica em camundongos e PCR. Todos os suínos inoculados (oito) foram previamente atestados soropositivos por RIFI, confirmando a infecção com *T. gondii*, amostras de cérebro, coração, língua e retina foram usadas para a prova biológica e PCR e quatro dos oito suínos foram positivos pela prova biológica (nenhum de cérebro) e amostras de cinco dos oito suínos inoculados estavam positivas para PCR. Quando ambas prova biológica e PCR, foram positivos para o mesmo suíno, o *T. gondii* não foi detectado no mesmo tecido. Os autores atribuem esta discrepância a fatores como a quantidade de tecido analisado, a distribuição pouco densa dos parasitos nos tecidos, e o baixo número de cistos teciduais em suínos infectados; menos de um cisto por 50g de tecido infectado. No atual trabalho, uma amostra deu positiva para prova biológica, mas não foi detectada na PCR. Neste estudo, usou-se

uma quantidade de 25 mg de tecido para PCR, sendo um tamanho de amostra muito pequeno e que pode ou não conter DNA do parasito.

Tsutsui et al. (2007) avaliaram a presença de *T. gondii* em cortes comerciais de carne suína (pernil, lombo, costela e paleta), por meio de prova biológica e PCR, em animais experimentalmente inoculados. Todos os suínos inoculados apresentaram-se positivos em pelo menos um dos testes de diagnóstico ou em ambos. A prova biológica foi capaz de detectar *T. gondii* em 27/40 (67,5%) amostras e a PCR em 9/40 (22,5%). Ainda que as amostras usadas no atual estudo sejam de suínos infectados naturalmente, nossos resultados mostram que a PCR detectou mais amostras positivas para *T. gondii*. Oito amostras foram positivas só com a PCR, sendo negativas para prova biológica, mas não se pode esquecer que nos processos de digestão e inoculação é possível que ocorram perdas de parasitos viáveis. No entanto, talvez o cenário que melhor explique este grupo de resultados seja a inativação dos parasitos infectantes por algum procedimento durante a estocagem da carne, provavelmente o congelamento. Não se pode afirmar que a PCR seja melhor que a prova biológica, ou vice-versa, mas sim que o uso das duas técnicas juntas melhora a sensibilidade na detecção de *T. gondii*. (YAI et al., 2003).

A contaminação ambiental com *T. gondii* na cidade de Campos é muito alta (DA SILVA et al., 2003), o que reforça a possibilidade de alto nível de recombinação genética do parasito devido às grandes quantidades de hospedeiros intermediários que podem ser infectados e servirem como uma fonte de infecção a gatos (DUBEY et al., 2008c; PENA et al., 2008). Dentre estes hospedeiros intermediários estão os suínos. A presença de formas infectivas viáveis do parasita nestes animais é uma evidência importante para a participação desta espécie animal na dispersão do protozoário na região. O número de gatos de rua nesta cidade é alto, o que motivou o Centro de Controle de Zoonoses a iniciar um programa de controle populacional destes animais. O aumento do número de gatos favorece uma maior concentração de oocistos no meio ambiente. Ainda, de acordo com Bahia-Oliveira et al. (2003), esta cidade sofre com constantes enchentes causadas pelo alto índice de chuvas, o que pode levar a uma disseminação dos oocistos a diferentes áreas da cidade e, portanto, infectar diferentes espécies animais. De fato, como se observa na figura 2, *T. gondii* foi encontrado infectando carnes de suínos em diferentes pontos do município, distantes vários quilômetros um do outro. Isto complementa os dados da epidemia de toxoplasmose em suínos, descrita por Frazão-Teixeira e De Oliveira

(2011) e constata que, certamente, humanos correm risco de adquirir a infecção através da ingestão de carne crua ou mal cozida de suínos neste município.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

A alta frequência de parasitismo em carne suína comercializada nos diversos açougues da cidade de Campos, RJ reforça a importância desta espécie animal na cadeia epidemiológica da toxoplasmose neste município.

A PCR parece ser mais eficiente na detecção de fragmentos de DNA do parasito em tecidos e vem a ser mais uma ferramenta para mensurar a prevalência de parasitismo tecidual em suínos.



## REFERENCIAS

ABREU, A. **Toxoplasmose Congênita: Aspectos Epidemiológicos Clínicos e Imunológicos da Infecção em Campos dos Goytacazes, RJ.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2003.

AJIOKA, J. W.; MORRISSETTE, N. S. A century of *Toxoplasma* research. Editorial. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 859–860, 2009.

ALVES, R.; NERY, F.; PINTO, A. Toxoplasmose congênita. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 54, n. 3, p. 571- 586, 1956.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H.; SILVA, K. F.; JUSI, M. M.; MACHADO, S. T.; DE BORTOLLI, C. P.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; ALEGRETTI S. M.; FELIPPE, P. A.; MACHADO, R. Z. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 5, p. 1007-9. 2010.

ASPINALL, T. V.; MARLEE, D.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 9, p. 1193-1199, 2002.

ARIAS, M. L.; CHINCHILLA, M.; REYES, L.; LINDER, E. Seroepidemiology of toxoplasmosis in humans: possible transmission routes in Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 44, n. 2A, p. 377-81, 1996.

AZEVEDO, K. M.; SETÚBAL, S.; LOPES, V. G.; CAMACHO, L. A.; OLIVEIRA, S. A. Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 186-9. 2010.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55-62, 2003.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426- 430, 2003.

BELFORT-NETO, R.; NUSSENBLATT, V.; RIZZO, L.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; USSENBLATT, R.; KHAN, A.; SIBLEY, L. D.; BELFORT-Jr., R. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 111-114, 2007.

BESSIÈRES, M. H.; BERREBI, A.; ROLLAND, M.; BLOOM, M. C.; ROQUES, C.; CASSAING, S.; COURJAULT, C.; SÉGUÉLA, J. P. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 94, n. 1, p. 37–45, 2001.

BEZERRA, R.; PARANHOS, E.; DEL'ARCO, A.; ALBUQUERQUE, G. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 78-80, 2009.

BOYER, K. M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N.; SWISHER, C.; MACK, D.; REMINGTON, J.; WITHERS, S.; MEIER, P.; McLEOD, R. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, n. 2, p. 564-571, 2005.

BROWN, A. S. The environment and susceptibility to schizophrenia. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 1, p. 23-58, 2011.

BROWN, A. S.; SCHAEFER, C. A.; QUESENBERRY, C. P.; LIU, L.; BABULAS, V. P.; SUSSER, E. S. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. **The American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 4, p. 767–773, 2005.

CAVALCANTI, G. T.; AGUIAR, D. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B.; ANDRADE, H. F.; MEIRELLES, L. R.; DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 647-649, 2006.

CERMAKOVA, Z.; PRASIL, P.; RYSKOVA, O. Congenital toxoplasmosis: possibilities for laboratory diagnosis. **Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie**, v. 54, n. 2, p. 75-77, 2005.

CHANDRAWATHANI, P.; NURULAINI, R.; ZANIN, C.; PREMAALATHA, B.; ADNAN, M.; JAMNAH, O.; KHOR, S.; KHADIJAH, S.; LAI, S. Z.; SHAIK, M.; SEAH, T.; ZATIL, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs, goats, cattle, dogs and cats in peninsular Malaysia. **Tropical Biomedicine**, v. 25, n. 3, p. 257–258, 2008.

CHOMEL, B. Control and prevention of emerging parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1211–1217, 2008.

DA SILVA, D. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; LEHMANN, T.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in Southern Brazil highly endemic to humans. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 394-396, 2003.

DA SILVA, A. V.; MENDONÇA, A.; PEZERICO, S. B.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 60, n. 1-2, p. 65 - 68, 2005.

DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; VIRMOND, M. P.; HAMANN, W.; AMENDOEIRA, M. R. R. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34 , n. 4, p. 1133 -1137, 2004.

DA SILVA, D. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; LEHMAN, T.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from a area in southern Brazil Highly Endemic to Humans. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 394-396, 2003.

DE SOUSA, S.; AJZENBERG, D.; CANADA, N.; FREIRE, L.; DA COSTA, J. M.; DARDÉ, M. L.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 133-136, 2006.

DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; MAUBON, D.; DJOSSOU, F.; PANCHOE, D.; PUNWASI, W.; VALERY, N.; PENEAU, C.; DAIGRE, J. L.; AZNAR, C.; COTTRELLE, B.; TERZAN, L.; DARDÉ, M. L.; CARME, B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 7, p. e88–95, 2007.

DEROUIN F.; PELLOUX H. ESCMID Study Group on Clinical Parasitology. Prevention of toxoplasmosis in transplant patient. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 12, p. 1089-1101, 2008.

DIAS, R. A. F.; NAVARRO, I. T.; RUFFOLO, B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, M. V.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 185-189, 2005.

DIDERRICH, V.; WANG, T.; FAULKNER, C.; McCORD, R.; BUSH, E.; HALLUM, A.; ZIMMERMAN, J.; KLIEBENSTEIN, J.; PATTON, S. National Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and swine. Production Management in 1995 nahms swineherds. **Proceedings of the 9th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, 2000.**

DOĞAN, N.; KABUKÇUOĞLU, S.; VARDARELİ, E. Toxoplasmic Hepatitis in an Immunocompetent Patient. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v. 31, n. 4, p. 260-263, 2007.

DOS SANTOS, C.; DE CARVALHO, A.; RAGOZO, A.; SOARES, R.; AMAKU, M.; YAI, L.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 3-4, p. 207-211, 2005.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Association**, v. 2, p. 166-79, 1986.

DUBEY, J. P. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 910-3, 1988.

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 75-77, 1998.

DUBEY, J.P. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. The **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877-882, 2009a.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in pigs – The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 89-103, 2009b.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis of animals and humans. Second edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313 p. 2009c.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 4, p. 337–339, 1987.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, 2008a.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D.; SPEER, C. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

DUBEY, J. P.; GAMBLE, H.; HILL, D.; SREEKUMAR, C.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. High Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1234–1238, 2002.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DA SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003.

DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.; VIANNA, M.C.; MARCET, P.L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 36-40, 2006.

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

DUBEY, J. P.; HILL, D.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G.; BANDINI, L.; KWOK, O.; PIERCE, V.; KELLY, K.; DULIN, M.; THULLIEZ, P.; IWUEKE, C.; SU, C. Endemic Toxoplasmosis in pigs on a farm in Maryland: Isolation and Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 36–41, 2008b.

DUBEY, J. P.; MURREL, K. D.; FAYER, R. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 10, p. 1941-3, 1984.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H. F. J.; NUNES de OLIVEIRA, L.; LEIFER, C. A.; GENNARI, S. M.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3-4, p. 299-305, 2008c.

FERNANDES, R. C.; VASCONCELLOS, V.; DE ARAÚJO, L.; MEDINA-ACOSTA, E. Vertical Transmission of HIV and *Toxoplasma* by Reactivation in a Chronically Infected Woman. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 70-71, 2009.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; LOPES, A. H. A.; DE ALMEIDA SENEFFONTE, F. R.; DE SOUZA, V. G.; BOTELHO, C. A.; FIGUEIREDO, M. S.; DUARTE, G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 8, p. 442-9, 2005.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; DE OLIVEIRA, F. C. R.; PELISSARI-SANT'ANA, V.; LOPES, C. W. G. *Toxoplasma gondii* em encéfalos de suínos comercializados no município de Campos dos Goytacazes. Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 33-36, 2006.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E. **Caracterização genética de *Toxoplasma gondii* em suínos de Campos dos Goytacazes-RJ: Comparação das técnicas multilocus pcr-rflp e seqüenciamento**. Tese de Doutorado em Ciência Animal – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2009.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; DE OLIVEIRA, F.C.R. Antibodies anti *Toxoplasma gondii* in cattle and pigs in a highly endemic area for human toxoplasmosis in Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 44-7, 2011.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J. P.; GRIGG, M. E.; DE OLIVEIRA, F.C.R. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 33–39, 2011.

FRICKER-HIDALGO, H.; PELLOUX, H.; RACINET, C.; GREFFENSTETTE, I.; BOST-BRU, C.; GOULLIER-FLEURET, A.; AMBROISE-THOMAS, P. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 Placentae from Infected Women by Polymerase Chain Reaction, In Vivo, and In Vitro Cultures. **Placenta**, v. 19, n. 7, p. 545-549, 1998.

FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M.; SCHAAL, J.; EQUY, V.; BOST-BRU, C.; PELLOUX, H. Value of *Toxoplasma gondii* detection in One hundred thirty-three placentas for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 26, n. 9, p. 845-846, 2007.

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

GARCÍA-BOCANEGRA, I.; DUBEY, J. P.; SIMON-GRIFÉ, M.; O. CABEZÓN, O.; CASAL, J.; ALLEPUZ, A.; NAPP, S.; ALMERÍA, S. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 1, p. 85–87, 2010a.

GARCÍA-BOCANEGRA, I.; SIMON-GRIFÉ, M.; DUBEY, J. P.; CASAL, J.; MARTÍN, G. E.; CABEZÓN, O. PEREA, A.; ALMERÍA, S.; Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. **Parasitology International**, v. 59, n. 3, p. 421-6, 2010b

GEBREYES, W.; BAHNSON, P.; FUNK, J.; MCKEAN, J.; PATCHANEE, P. Seroprevalence of *Trichinella*, *Toxoplasma*, and *Salmonella* in Antimicrobial-Free and Conventional Swine Production Systems. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 2, p. 199-203, 2008.

GILBERT R. E.; FREEMAN K.; LAGO E. G.; BAHIA-OLIVEIRA L. M. G.; TAN H. K. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. e277, 2008.

GROVER, C. M.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J. S.; BOOTHROYD, J. C. Rapid Prenatal Diagnosis of Congenital *Toxoplasma* Infection by Using Polymerase Chain Reaction and Amniotic Fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 10, p. 2297-2301, 1990.

HABEK, M.; OZRETIĆ, D.; ŽARKOVIĆ, K.; DJAKOVIĆ, V.; MUBRIN, Z. Unusual cause of dementia in an immunocompetent host: toxoplasmic encephalitis. **Neurological Sciences**, v. 30, n. 1, p. 45–49, 2009.

HAMIDINEJAT, H.; GHORBANPOOR, M.; HOSSEINI, H.; ALAVI, S.M.; NABAVI, L.; JALALI, M.H.; BOROJENI, M.P.; JAFARI, H.; MOHAMMADALIGOL, S. *Toxoplasma gondii* infection in first-episode and inpatient individuals with schizophrenia. **International Journal of infectious diseases**, v. 14, n. 11, p. e978-81, 2010.

HILL, D.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 41–61, 2005.

HILL, D.E.; HALEY, C.; WAGNER, B.; GAMBLE, H.R.; DUBEY, J.P. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 53-9, 2010.

JACOBS, L.; REMINGTON J. S.; MELTON, M. L. A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. **Journal of Parasitology**, v. 46, p. 23-28, 1960.

JONES, K.; PATEL, N.; LEVY, M.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 45, p. 990-993, 2008.

KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G. A.; CLIFFORD, D. B.; SIBLEY, L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5881–5887, 2005.

KIM, J.; KANG, K.; KANG, W.; SOHN, H.; JEAN, Y.; PARK, B.; KIM, Y.; KIM, D. Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. **Journal of Veterinary Science**, v.10, n. 2, p. 147-151, 2009.



KOTULA, A. W.; DUBEY, J. P.; SHARAR, A. K.; ANDREWS, C. D.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D. S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 9, p. 687-90, 1991.

LOPES, W. D.; SANTOS, T. R.; Da Silva R DOS S.; ROSSANESE, W. M.; DE SOUZA, F. A.; DE FARIA RODRIGUES, J. D.; DE MENDONÇA, R. P.; SOARES, V. E.; COSTA, A. J. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 104-6, 2009.

LUFT, B.; HAFNER, R.; KORZUN, A.; LEPORT, C.; ANTONISKIS, D.; BOSLER, E.; BOURLAND, D.; UTTAMCHANDANI, R.; FUHRER, J.; JACOBSON, J.; MORLAT, P.; VILDE, J.; REMINGTON, J. Toxoplasmic Encephalitis In Patients With The Acquired Immunodeficiency Syndrome. **The New England of Journal Medicine**, v. 329, n. 14, p. 995-1000, 1993.

MEERBURG, B.; KIJLSTRA, A. Changing climate—changing pathogens: *Toxoplasma gondii* in North-Western Europe. **Parasitology Research**, v. 105, n. 1, p. 17–24, 2009.

MEIRELLES FILHO, J. Toxoplasmose e gravidez: inquérito sorológico em gestantes e seus recém-nascidos na maternidade-escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 95, n. 9, p. 393-401, 1985

MIMAN, O.; MUTLU, E. A.; OZCAN, O.; ATAMBAY, M.; KARLIDAG, R.; UNAL, S. Is there any role of *Toxoplasma gondii* in the etiology of obsessive–compulsive disorder? **Psychiatry Research**, v. 177, n. 1-2, p. 263–265, 2010.

MILLAR, P.; DAGUER, H.; VICENTE, R.; DA COSTA, T.; SOBREIRO, L.; AMENDOEIRA, M. *Toxoplasma gondii*: estudo soro-epidemiológico de suínos da região Sudoeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n.1, p.15-18, 2008a.

MILLAR, P.; GATTI, L.; FÁBREGAS, I.; AMENDOEIRA, M. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n.3, p. 693-706, 2008b.

NAESSENS, A.; JENUM, P.; POLLAK, A.; DECOSTER, A.; LAPPALAINEN, M.; VILLENA, I.; LEBECH, M.; STRAY-PEDERSEN, B.; HAYDE, M.; PINON, J.; PETERSEN, E.; FOULON, W. Diagnostic of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: A multicenter evaluation. **The Journal of Pediatrics**, v. 135, n. 6, p. 714- 719, 1999.

NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* Isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 13, n. 1, p. 32-34, 1992.

NICOLLE, MM. C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Archives de L' insstitut Pasteur de Tunis**. Février 1909.

NICOLLE, MM. C.; MANCEAUX, L. On a new protozoan in gundis (*Toxoplasma N. Gen*); **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n. 2, p. 1-3, 2009.

NUNURA, J.; VÁSQUEZ, T.; ENDO, S; SALAZAR, D.; RODRIGUEZ, A.; PEREYRA, S.; SOLIS, H.; CASE REPORT : Disseminated toxoplasmosis in an immunocompetent patient from Peruvian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 107-110, 2010.

PENA, H. F. G.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PERGOLA, G.; CASCONI, A.; RUSSO, M. Acute pericarditis and myocarditis by *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man: a case report Un caso di pericardite e miocardite da *Toxoplasma gondii* in un giovane immunocompetente. **Le Infezioni in Medicina**, n. 1, p. 48-52, 2010.

PIASSA, F. R.; ARAÚJO, J. B.; DA ROSA, R. C.; MATTEI, J.; SILVA, R. C.; LANGONI, H. SILVA, R. V. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in certified and non-certified pig breeding farms in the Toledo microregion, PR, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 152-156, 2010.

REMYNTOON, J. S.; EFRON, B.; CAVANAUGH, E.; SIMON, H. J.; TREJOS, A. Studies on toxoplasmosis in El Salvador. Prevalence and incidence of toxoplasmosis as measured by the Sabin-Feldman dye test. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 2, p. 252–267, 1970.

ROBERTS, F.; McLEOD, R. Pathogenesis of Toxoplasmic Retinochoroiditis. **Parasitology Today**, v. 15, n. 2, p. 51-57, 1999.

RYAN, L. J.; FERRIERI, P.; PAMBUCCIAN, S. E. *Toxoplasma gondii* in the Cerebrospinal Fluid of a Hematopoietic Stem Cell Recipient. **Diagnostic Cytopathology**, v. 00, n. 00. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). 2010.

SÁFADI, M. A.; BEREZIN, E. N.; FARHAT C. K.; CARVALHO, E. S. Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 325-31. 2003.

SANTOS, S. L.; DE SOUZA COSTA, K.; GONDIM, L. Q.; DA SILVA, M. S.; UZÊDA, R. S.; ABE-SANDES, K.; GONDIM, L. F. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia sp.*, and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 457-61, 2010

SLAVIN, M. Toxoplasmosis and allogeneic stem cell transplantation: can we do better? **Leukemia & Lymphoma**, v. 51, n. 8, p. 1395–1396, 2010.

SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA, M. R.; RIBEIRO, L. C.; SILVEIRA, C.; GARCIA, A. P.; CAMILLO-COURA, L.; Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 483-491, 2003.

SPLENDRE, A. Sopra um nuovo protozoo parasita. **Revista da sociedade scientifica de São Paulo**, v. IV. Abril-Agosto 1909.

SPLENDRE, A. A new protozoan parasite in rabbits. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 861–862, 2009.

SROKA, S.; BARTELHEIMER, N.; WINTER, A.; HEUKELBACH, J.; ARIZA, L.; RIBEIRO, H.; OLIVEIRA, F. A.; QUEIROZ, A. J.; ALENCAR, C. J. R.; LIESENFELD, O. Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, Northeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 528-33, 2010.

SUARÉZ-ARANDA, F.; GALISTEO Jr. A. J.; HIRAMOTO, R. M.; CARDOSO, R. P. A.; MEIRELES, L. R.; MIGUEL, O.; ANDRADE Jr. H. F. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Veterinary Parasitology**, v. 91, n. 1-2, p. 23–32, 2000.

TENTER, A.; HECKEROTH, A.; WEISS, L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217–1258, 2000.

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

VAZ, R. **Diagnóstico Sorológico, Isolamento e Caracterização Molecular de *Toxoplasma gondii* (Nicole & Manceaux, 1909) em mulheres gestantes atendidas pelo serviço público na cidade de Curitiba.** Curitiba-PR, 2006. 211 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná. Setor Tecnológico. Pósgraduação em Processos Biotecnológicos.

VELMURUGAN, G. V.; SU, C.; DUBEY, J. P. Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 95–99, 2009.

WARNEKULASURIYA, M. R.; JOHNSON, J. D.; HOLLIMAN, R. E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 211–215, 1998.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895–901, 2009.

YAI, L. E. O.; VIANNA, M.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R. L.; RICHTZENHAIN, L. J.; GENNARI, S. M. Avaliação da infecção experimental por *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceuax, 1909) em suínos pelas provas de bioensaio em camundongos e reação em cadeia pela polimerase. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 227-234, 2003.