

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF**

**AMANDA LUCÍA JIMÉNEZ SANZ**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E GENÉTICA DE ISOLADOS DE  
*Toxoplasma gondii* de CARNES de SUÍNOS EM CAMPOS DOS  
GOYTACAZES, RJ**

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

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
Março – 2015**

**AMANDA LUCÍA JIMÉNEZ SANZ**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E GENÉTICA DE ISOLADOS DE  
*Toxoplasma gondii* de CARNES de SUÍNOS EM CAMPOS DOS  
GOYTACAZES, RJ**

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

Aprovada em 10 de março de 2015

BANCA EXAMINADORA

---

Helene Santos Barbosa - *D.Sc.* Fiocruz

---

Edwards Frazão Teixeira - *D.Sc.* Fiocruz

---

Alba Lucínia Peixoto Rangel - *D.Sc.* UENF

---

Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira - *D.Sc.* UENF

## RESUMO

Jiménez-Sanz, Amanda Lucía Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2015. Caracterização biológica e genética de isolados de *Toxoplasma gondii* em carnes de suínos em Campos dos Goytacazes, RJ. Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. Coorientador: Dr. Edwards Frazão-Teixeira.

A toxoplasmose é uma zoonose e o agente etiológico *Toxoplasma gondii* pode infectar aves e mamíferos incluindo, os seres humanos, através da ingestão de oocistos esporulados presentes em água ou alimentos contaminados e por cistos presentes em carnes e vísceras cruas ou malcozidas de animais infectados. Ainda, essa protozoose adquire grande importância em sua forma congênita, em que a gestante infectada pode transmitir o parasito ao feto. O município de Campos dos Goytacazes, RJ, tem alta prevalência deste protozoário em animais e seres humanos onde a carne de suínos pode ser considerada como uma importante fonte de infecção. O objetivo desta pesquisa foi verificar a importância das carnes suínas comercializadas em açougues de áreas centrais e distritos do município de Campos dos Goytacazes como fonte de infecção humana por *T. gondii* e as características biológicas e genéticas das cepas isoladas. Para tanto, 100 amostras de carnes de suínos comercializadas em açougues de diversos distritos do município foram submetidas à prova biológica onde as amostras de carne foram processadas por digestão péptica e inoculadas em camundongos para detectar a presença de *T. gondii*. Para confirmar a presença do parasito na carne dos suínos e nos camundongos infectados, amostras foram submetidas à PCR no intuito de amplificar o DNA do parasito. Não foi detectado DNA do parasito nas amostras de carne investigadas, no entanto, três cepas de *T. gondii* foram isoladas em camundongos. A frequência de carnes infectadas com parasitos viáveis foi de 3% (n=100). Dez marcadores moleculares foram usados para sequenciamento e genotipagem. As três cepas foram genotipicamente distintas entre si e também entre outros isolados obtidos de tecidos de suínos em outros estudos no Brasil. As mesmas também se apresentaram virulentas a camundongos e geneticamente atípicas, indicando uma estrutura populacional em suínos com alta recombinação gênica e confirmando a alta variedade genética dos parasitos nesta espécie animal. Conclui-se que cepas viáveis de *T. gondii* podem ser encontradas em carnes de suínos e são altamente virulentas a camundongos. Reitera-se o risco de infecção humana por este protozoário através do consumo destas carnes, podendo o suíno estar contribuindo para a alta prevalência da toxoplasmose humana e animal nesta cidade. Os alelos identificados circulam de forma proporcional na população do parasito encontrada em suínos, com predominância dos atípicos e escassez do tipo II; todavia, os mesmos estão distribuídos de forma aleatória nos 10 *loci* estudados.

Palavras-chave: Toxoplasmose, genotipagem, *Sus scrofa domestica*.

## ABSTRACT

JIMENEZ-SANZ, Amanda Lucía, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2015. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in pork in Campos dos Goytacazes, RJ. Advisor: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. Co-Advisor: Dr. Edwards Frazão Teixeira.

Toxoplasmosis is a zoonotic disease and the etiologic agent *Toxoplasma gondii* can infect birds and mammals including humans through ingestion of sporulated oocysts in contaminated water or food and cysts present in raw or undercooked meat and viscera of infected animals. Further, the protozoan of great importance in its congenital form in the infected pregnant woman may transmit the parasite to the fetus. The city of Campos dos Goytacazes, RJ, has high prevalence of this parasite in animals and humans where the meat of pigs may be considered as an important source of infection. The objective of this research was to verify the importance of pork sold in butcherhouses of central areas and districts of Campos dos Goytacazes municipality as a human infection source by *T. gondii* and the biological and genetic characteristics of the isolated strains. For this purpose, 100 samples of pig meat sold in butcherhouses of various districts of the city were submitted to biological test where the meat samples were processed by peptic digestion and inoculated into mice to detect the presence of *T. gondii*. To confirm the presence of the parasite in meat of pigs and inoculated mice, the samples were submitted to PCR with the aim of amplifying DNA of the parasite. No parasite DNA was detected in the investigated meat samples, however, three strains of *T. gondii* were isolated in mice. The frequency of meat infected with viable parasites was 3% (n=100). Ten molecular markers were used for sequencing genotyping. The three strains were genotypically distincts, even from strains isolated from pig tissues in other studies in Brazil. They were also virulent to mice and genetically atypical, pointing to a population structure in pigs with high genetic recombination and confirming the high genetic diversity of parasites in this animal species. In conclusion, viable *T. gondii* is found in pig meat and are highly virulent to mice. We emphasize the risk of human infection with this parasite by consuming these meats, the pig can be contributing to the high prevalence of toxoplasmosis human and animal in this city. The identified alleles circulate proportionally in the parasite population found in pigs, with predominance of atypical ones and shortage of type II. The alleles are, on the other hand, randomly distributed among these 10 studied *loci*.

Keywords: Toxoplasmosis, genotyping, *Sus scrofa domestica*.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos no mundo usando dois testes diferentes nas mesmas amostras (adaptado de Dubey, 2010).	22
<b>Quadro 2</b>	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos no mundo (adaptado de DUBEY, 2010).	23
<b>Quadro 3</b>	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> viável de suínos naturalmente infectados (adaptado de DUBEY et al., 2009b).	25
<b>Quadro 4</b>	Sequências de iniciadores utilizados para ampliações primárias e secundárias (“nested PCRs”) do DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de carnes suínas de açougues do município de Campos dos Goytacazes, RJ, após digestão péptica dos tecidos e inoculação em camundongos (prova biológica).	42
<b>Quadro 5</b>	Reagentes utilizados nas PCRs para detecção do elemento de repetição de 529pb do DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> e também para as reações primárias das nested-PCRs para genotipagem.	43
<b>Quadro 6</b>	Reagentes utilizados nas ampliações secundárias das “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> .	43
<b>Quadro 7</b>	PCRs para detecção do elemento de repetição de 529pb do DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> e também para as reações primárias e secundárias das nested-PCRs para genotipagem.	44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*. A. Taquizoitos (forma livre); B. Bradizoitos (seta preta) em cistos teciduais e C. Esporozóitos (seta branca) em oocistos esporulados. 17
- Figura 2** Percentuais de alelos atípicos e clonais para os isolados TgPgBr1-5 (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011) e TgPgBr17-19 (esta pesquisa). 49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Amostras de carne suína comercializada nos açougues de Campos dos Goytacazes e seus distritos avaliadas quanto à presença de <i>Toxoplasma gondii</i> através de digestão péptica e inoculação em camundongos (prova biológica) segundo Dubey, (1998).	32
<b>Tabela 2</b>	Tipo de corte e estado de conservação de amostras de carne suína comercializada nos açougues de Campos dos Goytacazes, RJ e seus distritos avaliadas quanto à presença de <i>Toxoplasma gondii</i> através da digestão péptica e inoculação em camundongos (prova biológica) segundo Dubey (1998).	32
<b>Tabela 3</b>	Infectividade e mortalidade de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados em carnes suínas oriundas de açougues do Município de Campos dos Goytacazes, RJ.	45
<b>Tabela 4</b>	Genótipos “multi-locus” de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de carne suína comercializada nos açougues do município de Campos dos Goytacazes, Brasil, através de sequenciamento de DNA.	47
<b>Tabela 5</b>	Caracterização genética de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> através da “multi-locus DNA sequencing” no Brasil.	48
<b>Tabela 6</b>	Nucleotídeos atípicos (em destaque) de <i>Toxoplasma gondii</i> ao marcador molecular L358 e detectados nas sequências de DNA de dois isolados de carne suína comercializada em açougues no município de Campos dos Goytacazes, RJ.	49
<b>Tabela 7</b>	Nucleotídeo atípico (em destaque) de <i>Toxoplasma gondii</i> ao marcador molecular SAG1 e detectado na sequência de DNA de um isolado de carne suína comercializada em açougues no município de Campos dos Goytacazes, RJ.	50
<b>Tabela 8</b>	Nucleotídeos atípicos (em destaque) de <i>Toxoplasma gondii</i> ao marcador molecular c22-8 e detectado na sequência de DNA de um isolado de carne suína comercializada em açougues no município de Campos dos Goytacazes, RJ.	50
<b>Tabela 9</b>	Nucleotídeos atípicos de <i>Toxoplasma gondii</i> ao marcador molecular PK1 e detectado nas sequências de DNA de um isolado de carne suína comercializada nos açougues no município de Campos dos Goytacazes, RJ.	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	“acquired immunodeficiency syndrome”
APDL	“Animal Parasitic Diseases Laboratory”
CCTA	Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Reação imunoenzimática)
<i>g</i>	Força centrífuga
g	Gramas
HCl	ácido clorídrico
IFAT	“Indirect Fluorescent Antibody” Test (Reação de imunofluorescência indireta)
IHA	“Indirect Hemagglutination test” (Teste de hemaglutinação indireta)
LAT	“Latex agglutination test” (Teste de aglutinação em látex)
MAT	“Modified Agglutination Test” (Teste de aglutinação modificado)
NaCl	Cloreto de sódio
NUPAP	Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia
LSA	Laboratório de Sanidade Animal
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCR-RFLP	“Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism”
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	GERAL.....	13
2.2	ESPECÍFICOS.....	13
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1	TAXONOMIA.....	14
3.2	HISTÓRICO.....	14
3.3	<i>Toxoplasma gondii</i> : UM PARASITO RE-EMERGENTE.....	16
3.4	CICLO BIOLÓGICO.....	17
3.5	INFECÇÃO EM HUMANOS.....	19
3.6	INFECÇÃO EM SUÍNOS.....	21
4	<b>MATERIAL É MÉTODOS</b> .....	31
4.1	LEVANTAMENTO E SELEÇÃO DOS AÇOUGUES.....	31
4.2	AQUISIÇÃO DAS CARNES.....	31
4.3	PROCESSAMENTO DOS TECIDOS.....	32
4.3.1	<b>Digestão das carnes</b> .....	33
4.4	PROVA BIOLÓGICA.....	34
4.4.1	<b>Manuseio dos camundongos</b> .....	34
4.4.2	<b>Inoculação em camundongo</b> .....	34
4.4.3	<b>Método de detecção do parasito em camundongo</b> .....	35
a)	Preparo de esfregaço de pulmão em lâminas.....	35
b)	Teste de aglutinação modificado – MAT para detecção de infecção...	36
c)	Observação direta de fragmento de encéfalos.....	37
4.5	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS.....	37
4.5.1	<b>Extração de DNA</b> .....	37
4.5.2	<b>Detecção de DNA de <i>T. gondii</i></b> .....	38
4.5.3	<b>Multi-locus DNA sequencing</b> .....	39

5	<b>RESULTADOS</b> .....	45
5.1	DETECÇÃO DO DNA DE <i>Toxoplasma gondii</i> NOS TECIDOS.....	45
5.2	PROVA BIOLÓGICA EM CAMUNDONGO.....	45
5.3	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA POR SEQUENCIAMENTO.....	46
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	57
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular, com ampla distribuição mundial, encontrado na maioria dos animais de sangue quente, incluindo o homem (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2010). A infecção pode ocorrer por ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos liberados junto com as fezes de felídeos e por ingestão de carne crua ou malpassada contendo cistos teciduais (TENTER et al., 2000; VELMURUGAN et al., 2009; DUBEY, 2010; LASS et al., 2011). Em seus hospedeiros pode causar ou não sinais clínicos a depender do estado imunológico do individuo e, em estados de imunossupressão, pode causar severas manifestações clínicas (LUFT et al., 1993; BOWIE et al., 1997; DE MOURA et al., 2006; DUBEY, 2010). Quando se adquire a toxoplasmose esta permanece latente no hospedeiro por toda a vida, podendo em casos de imunossupressão reativar-se e levar à infecção aguda (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2010).

No homem a toxoplasmose pode ser adquirida ou congênita, sendo a primeira transmitida por consumo de água ou alimentos contaminados e também através de transplante de órgãos infectados e transfusões (CHOMEL, 2008; DUBEY, 2010); a segunda é transmitida verticalmente, quando a mulher se infecta durante a gravidez e o parasito atravessa a placenta infectando o feto. O grau de severidade depende do trimestre em que se encontra a mulher grávida quando é infectada; no primeiro trimestre o risco de infecção congênita é baixo (10% - 15%), mas os fetos são severamente afetados podendo ocorrer abortamento ou natimortos e no segundo e terceiro trimestre o risco de transmissão ao feto é maior (60% - 90%) apresentando-se grande quantidade de crianças infectadas em diversos graus, principalmente lesões oculares e neurológicas (TENTER et al., 2000; GIANNOULIS, 2008; DUBEY, 2010).

Surtos de toxoplasmose têm aparecido em diferentes regiões do mundo e é grande o interesse dos pesquisadores de encontrar as fontes de infecção, tanto para os animais como para o homem (KEAN et al., 1969; MASUR et al., 1978; BOWIE et al., 1997; CHOI et al., 1997; BONAMETTI et al., 1997; DE MOURA et al., 2006). Entre as zonas endêmicas em nível mundial para toxoplasmose se encontra o município de Campos dos Goytacazes, RJ

(BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Uma de cada 436 crianças nasce com toxoplasmose neste município (ABREU, 2003), mas ainda não se conhece exatamente qual é a fonte de infecção que leva a uma soroprevalência tão alta. Desta forma, outros estudos vêm demonstrando a possível fonte de infecção humana (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DA SILVA et al., 2003; DUBEY et al., 2003; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006, FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011).

A caracterização genética do *T. gondii* levou à identificação de três linhagens com diferentes graus de patogenicidade a camundongos (HOWE et al., 1995), mas estudos feitos no Brasil têm reportado grande diversidade genética do parasito (FERREIRA et al., 2008; KHAN et al., 2006; PENA et al., 2008; DUBEY et al., 2008b; VAUDAUX et al., 2010; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; BEZERRA et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2012; MACIEL et al., 2014). Devido a esta diversidade, a técnica antes utilizada para caracterização genética de *T. gondii*, a “multi-locus PCR-RFLP”, foi considerada falha para diferenciar genótipos da América do Sul, em especial do Brasil (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). Segundo estes mesmos autores, para estes genótipos somente o sequenciamento é capaz de demonstrar alelos divergentes e então corretamente classificar e comparar os genótipos existentes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Verificar a importância das carnes suínas comercializadas em açougues de áreas centrais e distritos do município de Campos dos Goytacazes como fonte de infecção humana por *T. gondii* e as características biológicas e genéticas das cepas isoladas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Isolar formas infectantes de *T. gondii* em amostras de carne *in natura* comercializadas em açougues do município de Campos dos Goytacazes, RJ através da prova biológica em camundongos;

Detectar DNA do parasito nos tecidos suínos coletados, comparando as sensibilidades das técnicas biológica e molecular para detecção de *T. gondii* em amostras de carne suína;

Inferir sobre a virulência das cepas de *T. gondii* isoladas através do registro da infectividade, da mortalidade e do tempo de sobrevivência dos camundongos inoculados;

Determinar as características genéticas das cepas de *T. gondii* circulantes em populações de suínos do município de Campos dos Goytacazes, RJ.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 TAXONOMIA

A classificação taxonômica do agente etiológico da toxoplasmose de acordo com “The National Center for Biotechnology Information” (2014):

Filo: Apicomplexa,

Classe: Coccidia,

Ordem: Eucoccidiorida,

Família: Sarcocystidae,

Gênero: *Toxoplasma*,

Espécie: *Toxoplasma gondii*.

#### 3.2 HISTÓRICO

No começo do século XX, quase ao mesmo tempo, Nicolle e Manceaux (1908) na Tunísia e Alfonso Splendore (1908) 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, *Oryctolagus cuniculus*, que ele usava em seus experimentos, dentro e fora das células de baço, pulmão e também em alguns leucócitos, mas não nos glóbulos vermelhos. Nicolle e Manceaux (1909) propuseram o nome *Toxoplasma gondii* pelas características morfológicas que apresentava (Toxo=arco; plasma=forma) e pela espécie onde foi encontrado, *C. gundi*.

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), como no caso dos pacientes HIV positivos, em que as encefalites

desenvolvidas pelos mesmos estavam relacionadas com a reativação de infecções crônicas causadas pelo *T. gondii* (LUFT e REMINGTON, 1992). *T. gondii* 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, 2010). 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 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 nos animais.

Em humanos, o primeiro caso de toxoplasmose congênita foi reportado por Janků (1927) em um menino de onze meses de idade que sofria de hidrocefalia severa. Torres (1927) descreveu um caso similar no Brasil em uma criança que morreu com convulsões aos dois dias de idade (revisto por WEISS e DUBEY, 2009). Ainda que Janků e Torres não conseguissem fechar o diagnóstico de toxoplasmose congênita, sugere-se que ambos os casos foram devido a *T. gondii*. Já em 1939, Wolf, Cowen, e Paige foram os primeiros em dar um diagnóstico conclusivo de *T. gondii* como causa de doença humana (revisto por WEISS e DUBEY, 2009). Posteriormente, verificou-se que em casos de hospedeiros imunocomprometidos, como os portadores de câncer, pacientes transplantados ou HIV-positivos, pode haver desenvolvimento de encefalite, pneumonite e miocardite como manifestações da toxoplasmose (WEISS e DUBEY, 2009).

Estudos têm mostrado como pacientes imunocompetentes têm desenvolvido a doença, apresentando pneumonia, hepatite e encefalite (LEAL et al., 2007; DOĞAN et al., 2007; HABEK et al., 2009), problemas oculares (NUNURA et al., 2010), também pericardite e miocardite aguda (PERGOLA et al., 2010), até casos fatais como o relatado na Guiana Francesa, na América do Sul (DEMAR et al., 2007).

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

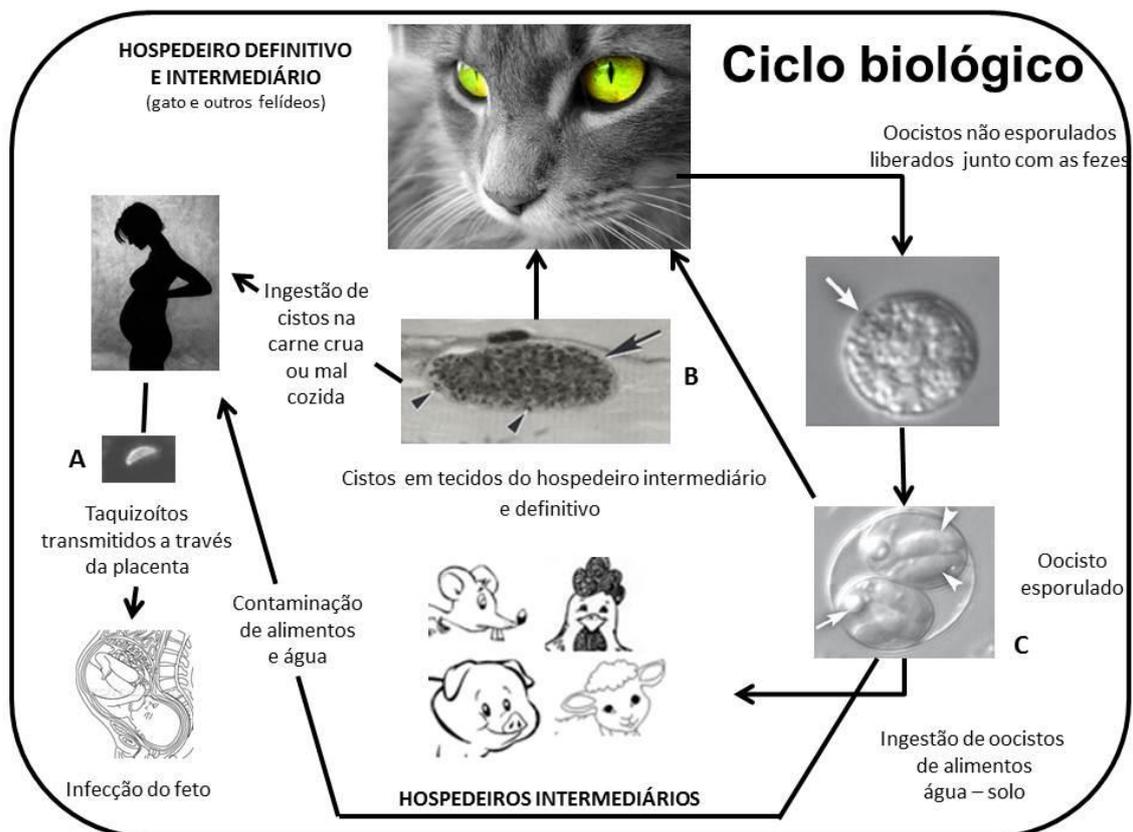
Atualmente observa-se uma emergência e reemergência de alguns patógenos, incluindo *T. gondii*. Muitos fatores estão correlacionados significativamente com o aparecimento dessas doenças, incluindo fatores socioeconômicos e ambientais (JONES et al., 2008). As mudanças decorrentes do aquecimento global, 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. No caso em particular do *T. gondii* isto pode aumentar o risco deles transmitirem o parasito para os gatos (hospedeiros definitivos), levando a uma maior prevalência do parasito no meio ambiente e resultando em casos de infecção humana e, conseqüentemente, aos animais (hospedeiros intermediários), inclusive os de produção (MEERBURG e KIJLSTRA, 2009).

Outra provável causa dessa reemergência 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; THOMPSON et al., 2009).

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; DUBEY et al., 2012; VAN LOO et al., 2012). Estes sistemas de criação chamados “orgânicos” possuem muitas similaridades com o tipo de criação rústico observado em Campos dos Goytacazes, RJ e isso indica fortemente ser 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 rápida multiplicação e têm o tamanho aproximado de 2 x 6 µm. Estes penetram ativamente na célula do hospedeiro durante a invasão, formando o vacúolo parasitóforo, onde ficam protegidos dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Ali se multiplicam de forma assexuada dentro das células hospedeiras por repetidas divisões até preencherem totalmente a célula de parasitos e, por mecanismos ainda não bem esclarecidos, evadem da célula, caracterizando assim o ciclo lítico (DUBEY et al., 1998).



**Figura 1** Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*. A. Taquizoítos (forma livre); B. Bradizoítos (cabeça de seta preta) em cistos teciduais (seta preta) e C. Esporozoítos (cabeça de seta branca) em oocistos esporulados (seta branca).

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 que os taquizoítos à destruição pelos ácidos e pelas enzimas proteolíticas na digestão. Cistos teciduais contendo bradizoítos podem desenvolver-se em órgãos viscerais, incluindo pulmões, fígado e rins. Eles têm maior tropismo pelo tecido muscular esquelético e cardíaco além do neural, incluindo o cérebro e olhos. 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 pelos ácidos e pelas enzimas proteolíticas estomacais que continuam atuando no intestino delgado. Alguns parasitos alcançam a lâmina própria do intestino, se diferenciam em taquizoítos e se multiplicam e se disseminam para outros tecidos através do sangue e da linfa. Alguns outros bradizoítos penetram as células epiteliais do intestino delgado (enterócitos) e iniciam o desenvolvimento de numerosas gerações de ciclos assexuados, onde são chamados esquizontes até a formação de gametas femininos e masculinos (DUBEY e FRENKEL, 1972; revisto por DUBEY et al., 1998).

Em seguida, o gameta feminino é fertilizado pelo gameta masculino (reprodução sexuada) formando o zigoto e começa a formação da parede do oocisto. Quando o oocisto está maduro é liberado juntamente com as fezes dos felídeos ao ambiente externo. 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 que, ingeridos pelos hospedeiros, fecham o ciclo de vida deste parasito (Dubey et al., 1970; revisto por DUBEY et al., 1998).

*Toxoplasma 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; AUBERT e VILLENA, 2009).

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 hematoencefálica (BARRAGAN e SIBLEY, 2003; LAMBERT e BARRAGAN, 2010). 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; NUNURA et al., 2010).

A infecção também pode ocorrer por transfusões sanguíneas ou transplantes de órgãos (MARTINA et al., 2011). Nestas ocasiões deve-se ter especial cuidado com doadores pela emergência e reemergência desta zoonose (CHOMEL, 2008). 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).

### 3.5 INFECÇÃO EM HUMANOS

A infecção com *T. gondii* em humanos pode ocorrer quando mulheres grávidas são infectadas pela primeira vez e transmitem a infecção para o feto. Após o nascimento, o homem pode adquirir a infecção pela ingestão de oocistos contidos no solo, na água ou nos alimentos contaminados com fezes de gato. Ainda, a infecção pode ocorrer pela ingestão de cistos teciduais em carne infectada pouco cozida (TENTER et al., 2000; ASPINALL et al., 2002; HILL e DUBEY, 2002; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DUBEY et al., 2005; HILL et al., 2005; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006, 2011; SILVA et al., 2007; DA COSTA et al., 2008; JONES et al., 2008; MILLAR et al., 2008b; LIN et al., 2008; DUBEY e JONES, 2008; LASS et al., 2009), transplantes de órgãos infectados

ou transfusões sanguíneas ( LUFT et al., 2001; DUBEY e JONES, 2008), ainda que nenhum teste identifique a fonte de infecção no homem ( HILL et al., 2005).

Muitas pessoas infectadas não apresentam sintomas, outras podem desenvolver uma doença leve, ou ainda manifestarem sintomas mais severos. Uma vez infectados, os humanos permanecem com o parasito durante toda a vida (DUBEY e JONES, 2008). Os sintomas podem incluir febre, linfadenopatias, cefaleias, mialgias, anorexia, náuseas, convulsão, dor nos olhos e dor abdominal (HILL e DUBEY, 2002; DUBEY, 2009a). Nos casos mais raros pessoas saudáveis podem desenvolver quadros severos e ainda fatais, comprometendo os pulmões e múltiplas vísceras (DEMAR et al., 2007).

Indivíduos com imunossupressão, como nos casos de pacientes HIV positivos, ou pacientes que receberam algum tipo de transplante, doenças autoimunes pode ocorrer reativação de cistos teciduais latentes, apresentando-se encefalites com cefaleias, convulsão, debilidade motora e febre, e se não for tratada pode progredir até a morte (LUFT et al., 1993; SCHAFFNER, 2001; DUBEY e JONES, 2008; SLAVIN, 2010).

Em indivíduos imunocompetentes a infecção pode passar despercebida ou ser confundida com uma gripe comum (DUBEY, 2010), mas a literatura reporta casos de pessoas sãs que desenvolveram problemas de pneumonia, hepatite e encefalite pelo parasito (DOĞAN et al., 2007; LEAL et al., 2007; HABEK et al., 2009) e casos fatais de toxoplasmose, como relatados na Guiana Francesa, América do Sul (DEMAR et al., 2007). Anand et al. (2012) descrevem quatorze casos de toxoplasmose aguda em viajantes imunocompetentes que visitaram países com alta prevalência de *T. gondii* (América do sul e central, África e França) com sintomas não específicos especialmente febre, linfadenopatias e fadiga.

Pergola et al. (2010) relatam o caso de um homem de 32 anos que apresentava febre, adenopatias, artralguas, pericardite e miocardite aguda; também foram detectados aumento 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 encontrados não só em casos de doença congênita, (GILBERT et al., 2008; DUBEY, 2010) 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.

Uma das formas mais severas da toxoplasmose em humanos é a toxoplasmose congênita que se apresenta quando as mulheres grávidas adquirem pela primeira vez a infecção e podem transmiti-la ao feto. Abreu (2003), em estudo feito em 435 crianças nascidas vivas em Campos dos Goytacazes, RJ, detectou uma com toxoplasmose congênita. Fernandes et al. (2009) reportaram o caso de transmissão vertical de HIV e *T. gondii* por reativação de cisto em uma mulher grávida infectada cronicamente.

### 3.6 INFECÇÃO EM SUÍNOS

A prevalência de infecção por *T. gondii* em suínos (Quadro 1) depende do método empregado para a detecção do parasito, os quais também têm variação entre países e entre as diferentes granjas em um mesmo país (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2009b; DUBEY, 2010). Dubey et al.(2008), usando os testes ELISA e MAT nas mesmas amostras, relataram uma soroprevalência de 25 e 70,83 %, respectivamente, enquanto Dubey et al. (2012), usando os mesmos testes em outras amostras, encontraram a mesma soroprevalência em ambos os testes (90,9 %).

**Quadro 1** Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos no mundo usando dois testes diferentes nas mesmas amostras (adaptado de Dubey, 2010).

PAÍSES	FREQUÊNCIA				AUTORES
	n <sup>a</sup>	%	Teste	Título	
Chile	1.474	28,1	DT <sup>b</sup>	1:16	Tamayo et al.(1990)
	1.474	30,1	IHA <sup>c</sup>	-	
Taiwan	3.880	27,5	LAT <sup>d</sup>	-	Chang et al.(1990)
	3.880	47,1	ELISA <sup>e</sup>	-	
Suíça	60	50	IFAT <sup>f</sup>	-	Ljungström et al.(1994)
	60	50	MAT <sup>g</sup>	-	
Brasil	80	37,5	MAT	1:25	Cavalcante et al.(2006)
	80	43,7	IFAT	1:64	
Alemanha	2.041	18,5	ELISA	-	Damriyasa et al.(2005)
	2.041	16,5	IFAT	-	
Estados Unidos	48	25	ELISA	-	Dubey et al.(2008)
	48	70,83	MAT	-	
	33	90,9	ELISA	-	Dubey et al. (2012)
	33	90,9	MAT	1:25	

<sup>a</sup>Número de amostras testadas.

<sup>b</sup>Sabin–Feldman dye test.

<sup>c</sup>Indirect haemagglutination test (Hemoaglutinação Indireta).

<sup>d</sup>Latex agglutination test (Teste de Aglutinação em Látex).

<sup>e</sup>The enzyme-linked immunosorbent assay (Reação Imunoenzimática).

<sup>f</sup>Immunofluorescence antibody test (Reação de Imunofluorescência Indireta).

<sup>g</sup>The Modified Agglutination Test (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). As soroprevalências podem encontrar-se desde 0%, como no caso da Malásia (CHANDRAWATHANI et al., 2008), até 95,8 % no México (ORTEGA-PACHECO et al., 2013).

**Quadro 2** Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos no mundo (adaptado de Dubey, 2010).

PAÍSES	FREQUÊNCIA				AUTORES
	n <sup>a</sup>	%	Teste	Título	
Argentina	230	37,8	MAT <sup>b</sup>	1:25	Venturini et al.(2004)
Áustria	113	43,4	IFAT <sup>c</sup>	1:16	Edelhofer et al.(1994)
Brasil	198	90,4	IFAT	1:16	Guimarães et al.(1992)
	130	36,2	IFAT	1:50	Azevedo et al.(2010)
	34	20,6	ELISA <sup>d</sup>	-	Frazão-Teixeira e Oliveira (2011)
	406	7,64	IFAT	1:64	Luciano et al.(2011)
	305	12,5	IFAT	1:64	Samico Fernandes et al.(2012)
	190	19,5	IFAT	1:64	Feitosa et al.(2014)
	143	25,5	ELISA	-	De Sousa et al.(2014)
	100	36	IFAT	1:64	Cademartori et al.(2014)
Canadá	6.048	0,74	ELISA	-	Poljak et al.(2008)
Costa Rica	496	43,8	IFAT	1:20	Arias et al.(1994)
Polônia	106	26,4	MAT	-	Sroka et al.(2008)
Holanda	406	10,9	ELISA	-	Kijlstra et al.(2008)
Gana	641	40,6	ELISA	-	Arko-Mensah et al.(2000)
Malásia	100	0	IFAT	1:20	Chandrawathani et al.(2008)
Alemanha	1005	20,5	ELISA	-	Fehlhaber et al.(2003)
Estados Unidos	55	92,7	MAT	1:10	Dubey et al.(2002)
	616	4,1	ELISA	-	Gebreyes et al.(2008)
Sérvia	488	9,2	MAT	-	Klun et al.(2011)
China	3558	24,5	ELISA	-	Tao et al.(2011)
	813	53,4	ELISA	-	Yu et al.(2011)
	427	22,72	MAT	1:25	Wu et al.(2012a)
	908	30,6	IHA <sup>e</sup>	1:64	Wu et al.(2012b)
	1164	12	IHA	-	Liu et al.(2012)
	1040	4,6	IHA	-	Chang et al.(2013)
	1232	22,9	IHA	1:64	Jiang et al.(2014)
	1191	31,3	IHA	1:64	Xu et al.(2014)
República Checa	551	36	ELISA	-	Bártová e Sedlák.(2011)
México	1.074	12,7	MAT	1:25	Alvarado-Esquivel et al.(2011)
	525	11,23	MAT	1:25	Alvarado-Esquivel et al.(2012)
	429	95,8	ELISA	-	Ortega-Pacheco et al.(2013)
	402	45,3	MAT	1;25	Alvarado-Esquivel et al.(2014)
Suíça	270	23,3	ELISA	-	Berger-Schoch et al.(2011)
Chile	340	8,8	ELISA	-	Muñoz-Zanzi et al.(2012)
Irlanda	317	4,7	LAT <sup>f</sup>	-	Halová et al.(2013)
Romênia	3595	23,1	IFAT	1:32	Paștiu et al.(2013)
Látvia	803	4,2	ELISA	-	Deksne et al.(2013)
Portugal	254	9,8	MAT	1:20	Lopes et al.(2013)
	97	20,6	MAT	-	Coelho et al.(2014)
	381	7,1	MAT	-	Esteves et al.(2014)
Japão	115	5,2	LAT	1:64	Matsuo et al.(2014)

<sup>a</sup>Número de amostras testadas.

<sup>b</sup>The Modified Agglutination Test (Teste de aglutinação modificado).

<sup>c</sup>Immunofluorescence antibody test (Reação de Imunofluorescência Indireta).

<sup>d</sup>Enzyme-linked immunosorbent assay (Reação Imunoenzimática).

<sup>e</sup>Indirect haemagglutination test (Hemoaglutinação Indireta).

<sup>f</sup>Latex agglutination test (Teste de Aglutinação em Látex).

Os fatores de risco para a infecção 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 bem como ao reservatório da água e ao não controle de roedores (DIDERRICH et al., 2000; MILLAR et al., 2008a; BEZERRA et al., 2009; PIASSA et al., 2010; GARCIA-BOCANEGRA et al., 2010a; 2010b; HILL et al., 2010; TAO et al., 2011; ORTEGA-PACHECO et al., 2011; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2011; YU et al., 2011; BERGER-SCHOCH et al., 2011; KLUN et al., 2011; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2012; HALOVÁ et al., 2012; PAȘTIU et al., 2013; ORTEGA-PACHECO et al., 2013; DEKSNE et al., 2013; LOPES et al., 2013; CHANG et al., 2013; DE SOUSA et al., 2014). Alguns estudos observaram diferenças significativas quanto ao sexo, ao sistema de criação e à procedência dos animais (BEZERRA et al., 2009; GARCIA-BOCANEGRA et al., 2010a; TAO et al., 2011; ORTEGA-PACHECO et al., 2011; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2011; YU et al., 2011; BERGER-SCHOCH et al., 2011; KLUN et al., 2011; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2012; HALOVÁ et al., 2012; PASTIU et al., 2013; ORTEGA-PACHECO et al., 2013; DEKSNE et al., 2013; LOPES et al., 2013; CHANG et al., 2013), enquanto outros não observaram diferenças significativas quanto ao sexo e à idade dos animais (MILLAR et al., 2008a; AZEVEDO et al., 2010; DE SOUSA et al., 2014).

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). A carne suína é amplamente consumida em nível mundial (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2011; BERGER-SCHOCH et al., 2011; YU et al., 2011) e tem sido relacionada com infecções pelo *T. gondii* em humanos (CHOI et al., 1997; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2010). 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 (adaptado de DUBEY et al., 2009b)

PAÍS	Origem	FREQUÊNCIA		Amostras	AUTORES
		n	%		
Argentina	Terminado	109	(12,8) <sup>a</sup>	Diafragma	Omata et al.(1994)
Austria	Terminado	253	(0,4) <sup>a</sup>	Cérebro, coração, diafragma	Edelhofer et al.(1994)
Brasil	Terminado	28 <sup>b</sup>	(25)	Coração, cérebro, língua	Dos Santos et al.(2005)
	Terminado	12	(50) <sup>a</sup>	Cérebro	Frazão-Teixeira et al.(2006)
		35	(14,3) <sup>a</sup>	Cérebro e coração	Frazão-Teixeira et al.(2011)
	Embutido	149	(8,7) <sup>a</sup>	Linguiça	Dias et al.(2005)
	Terminado	20	(25) <sup>a</sup>	Cérebro e língua	Bezerra et al.(2012)
	Terminado	37	(35,1) <sup>a</sup>	Cérebro, coração e língua	Feitosa et al.(2014)
	Terminado	36 <sup>b</sup>	(47,2) <sup>a</sup>	Cérebro e coração	Cademartori et al.(2014)
Republica Tcheca	Terminado	2.447	(1,1) <sup>a</sup>	Cérebro, diafragma	Hejlícek e Literak(1993)
Portugal	Terminado	37 <sup>b</sup>	(40,5)	Coração, cérebro	De Sousa et al.(2006)
Estados Unidos	Terminado	38 <sup>b</sup>	(36,8) <sup>a</sup>	Coração	Dubey et al.(2008)Velmurugan et al.(2009)
	Porcas	1.000	(17) <sup>a</sup>	Coração	Dubey et al.(1995a) e Velmurugan et al.(2009)
	Terminado	300	(9,6) <sup>c</sup>	Coração	Velmurugan et al.(2009)
	Terminado	55	(92,7) <sup>c</sup>	Coração, língua	Dubey et al.(2002)Lehmann et al.(2003)Velmurugan et al.(2009)
	Varejo	2.094	(0,3) <sup>c</sup>	Lombo	Dubey et al.(2005)
	Terminado (orgânico)	33	(51,5) <sup>a</sup>	Coração	Dubey et al.(2012)
Espanha	Varejo	50	(8) <sup>a</sup>	Vários	Bayarri et al.(2012)
China	Varejo	14	(7,1) <sup>a</sup>	Músculo	Wang et al.(2012)

<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 2008).

*Toxoplasma 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 foram disponibilizadas 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. Coração de 22 suínos autolisados foi inoculado em camundongos e *T. gondii* foi isolado de três destes (DUBEY et al., 2008a).

O primeiro isolamento de *T. gondii* de suínos em Portugal foi reportado por de Sousa et al. (2006), onde amostras de cérebro e coração de 37 suínos soropositivos foram digeridas em pepsina e inoculadas 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 por medidas adequadas de higiene (TENTER et al., 2000; DIDERRICH et al., 2000). Atualmente, os consumidores demandam uma criação de suínos mais natural (VAN LOO et al., 2012) aumentando, portanto o risco de adquirir *T. gondii*. Um estudo realizado nos EUA, comparando os dois sistemas de produção, um aberto e um fechado aponta essa observação. 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). Dubey et al. (2012) encontraram uma alta prevalência em 33 suínos criados de forma orgânica no norte dos EUA. No referido estudo, primeiro realizou-se a sorologia por meio dos testes de ELISA e MAT nas mesmas amostras, sendo relatada uma soroprevalência de 91% em ambos os testes. Em seguida, realizou-se a prova

biológica em camundongos com amostras de coração com o isolamento de *T. gondii* em 17 (51,5%).

Em vários países europeus o consumo de carne de animais de caça está sendo cada vez mais comum (BERAL et al., 2012). Uma espécie popular é o javali, cuja carne é muito apreciada (JOKELAINEN et al., 2012; PAȘTIU et al., 2013). Berger-Schoch et al. (2012) analisaram suco de carne de 150 porcos selvagens encontrando uma soroprevalência de 6,7%, diferentemente de Paștiu et al. (2013) na Romênia, que relataram uma soroprevalência de 16% (24/150), bem como de Beral et al. (2012) na França, onde a soroprevalência foi de 23% (215/938) e Coelho et al. (2014), em Portugal, com soroprevalência de 20,6% (20/97).

Existem granjas de criação de javali na Finlândia, onde Jokelainen et al. (2012) detectaram uma soroprevalência de 33% (65/197) em porcos selvagens provenientes de várias granjas. Os dados encontrados nestes animais tornam esta espécie um risco potencial para a transmissão zoonótica da toxoplasmose, particularmente no atual contexto do incremento do consumo de carne de caça malcozida (BERAL et al., 2012)

No Brasil, vários estudos têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar a presença de *T. gondii* em suínos de diferentes regiões. No Paraná, Millar et al. (2008a) estudaram a soroprevalência em 408 animais criados e abatidos para consumo humano. As amostras foram examinadas por meio IFAT 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 IFAT (CHANDRAWATHANI et al., 2008).

O primeiro isolamento de *T. gondii* viável de suínos terminado no Brasil foi reportado em 2005. 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 camundongos (dos SANTOS et al., 2005).

Em Campos dos Goytacazes, RJ, Frazão-Teixeira et al. (2006) isolaram *T. gondii* de encéfalos de suínos comercializados no principal mercado da cidade, encontrando uma frequência de 50% das 12 amostras de cérebro analisadas. Em estudo posterior, a amostragem no mesmo mercado foi aumentada para 35 e os cinco isolados de cérebros e corações (14,3%) genotipados pela “multi-locus DNA sequencing” permitiram inferir sobre a alta divergência genética do parasito no município (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011).

No nordeste do Brasil, formas viáveis do parasito foram encontradas em amostras de cérebro e língua em cinco de 20 cabeças (25%) de suínos analisadas por Bezerra et al. (2012) no estado da Bahia. Na Paraíba, Feitosa et al. (2014) conseguiram isolar *T. gondii* 13/37 (35,1%) de amostras de cérebro, coração e língua. Já no Sul do Brasil, Cademartori et al. (2014) obtiveram 17 isolados de *T. gondii* de cérebro e coração de 36 suínos soropositivos (47,2%) do Rio Grande do Sul.

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 infectadas durante a prenhez (DUBEY 1986, citado por KIM et al., 2009).

Um surto de abortamentos suínos associados a *T. gondii* foi reportado na Coreia do Sul, no qual as fêmeas 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, no fígado, nos nodos linfáticos e no cérebro em amostras de duas fêmeas que morreram e cinco fetos abortados da mesma ninhada e taquizoítos estavam presentes nas lesões histopatológicas (KIM et al., 2009).

A carne de suínos foi considerada como a fonte de infecção de *T. gondii* mais importante para o homem nos EUA (DUBEY et al., 2005). 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, 2010). As primeiras pesquisas para identificação molecular dos isolados de *T. gondii* provenientes de suínos foram feitas usando somente um marcador (SANTOS et al., 2005; DA SILVA et al., 2005; DE SOUSA et al., 2006; Belfort-Neto et al., 2007), e os resultados coincidiam com alguns dos tipos clonais I, II ou III descritos por Howe e Sibley (1995).

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 microssatélites. Da Silva et al. (2005) reportaram a presença do parasito em 19 (27,1%) 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.

Estudos posteriores revelaram uma alta frequência de genótipos não arquétipos em isolados de animais selvagens e humanos, sugerindo uma alta diversidade na população do *T. gondii* (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004). Por essa razão, Su et al. (2006) desenvolveram um grupo de nove marcadores PCR-RFLP, os quais poderiam fazer distinção entre os três tipos clonais e os não clonais e revelar a alta diversidade genética do parasito.

Belfort-Neto et al. (2007) tentaram amplificar DNA do parasito de 50 amostras de língua e 50 de diafragma, sendo positivas 33 (66%) amostras de língua e 17 (34%) de diafragma. De quatro amostras positivas, todas foram do tipo I para o marcador SAG2, mas quando outros marcadores foram analisados, estas cepas apresentaram alelos tipo III para os marcadores BTUB, SAG3 e GRA6, sugerindo que genótipos incomuns de *T. gondii* são encontrados no Brasil.

Em um estudo feito por Velmurugan et al. (2009), 182 isolados de *T. gondii* de suínos domésticos de várias 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.

Frazão-Teixeira et al. (2011), ao comparar o poder de resolução da multi-locus PCR-RFLP com a multi-locus DNA sequencing para 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 com a multi-locus DNA sequencing. A multi-locus PCR-RFLP não conseguiu identificar os alelos atípicos que confirmam a ampla diversidade genética dos isolados de *T. gondii* no Brasil. Na Bahia, Bezerra et al. (2012), analisaram geneticamente pela multi-locus PCR-RFLP e a multi-locus PCR sequencing 11 isolados de suínos destinados para consumo humano. Os resultados obtidos com a multi-locus PCR-RFLP usando sete marcadores genéticos identificaram seis genótipos diferentes, enquanto pela multi-locus DNA sequencing, usando cinco marcadores genéticos, todos os 11 isolados foram diferentes. Os dados confirmaram o citado por Frazão-Teixeira et al. (2011), que a multi-locus PCR-RFLP pode subestimar a verdadeira diversidade genética do parasito no Brasil e que a multi-locus DNA sequencing é a técnica preferida para inferir sobre a real divergência genética dos isolados brasileiros.

Vários estudos feitos na China com isolados de *T. gondii* obtidos de suínos usando a multi-locus PCR-RFLP e 11 marcadores genéticos identificaram o genótipo #9, que tem sido encontrado também em isolados de gatos e humanos como o mais prevalente na região (ZHOU et al., 2011; WANG et al., 2012, 2013).

Em uma granja com 33 suínos criados de forma orgânica, Dubey et al. (2012) conseguiram isolar 17 cepas, incluindo um suíno que foi soronegativo (MAT e ELISA). A caracterização genética de 16 dos 17 isolados usando a multi-locus PCR-RFLP e os marcadores SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico revelou tipos clonais II e III. Estes resultados revelam a alta prevalência de *T. gondii* em suínos orgânicos pela primeira vez nos EUA, indicando o potencial incremento do risco para a saúde pública pelo consumo de suínos orgânicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LEVANTAMENTO E SELEÇÃO DOS AÇOUGUES

Foi realizado levantamento de açougues que comercializam carnes suínas *in natura* para consumo humano no município de Campos dos Goytacazes, RJ. A escolha dos estabelecimentos para aquisição das carnes ocorreu por conveniência (PEREIRA, 1995).

### 4.2 AQUISIÇÃO DAS CARNES

Foram adquiridas 100 amostras de tecidos musculares de suínos, de 500 g cada, nos açougues previamente selecionados e que comercializam carne suína. Na tabela 1 pode observar a quantidade de amostras por distrito. As amostras foram processadas no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP) localizado no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e pertencente ao Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), imediatamente após a coleta. Os tipos de corte dos tecidos musculares adquiridos foram pernil, lombo e costela, segundo a disponibilidade no estabelecimento comercial (Tabela 2).

**Tabela 1.** Amostras de carne suína comercializadas nos açougues de Campos dos Goytacazes e seus distritos avaliadas quanto à presença de *Toxoplasma gondii* através de prova biológica em camundongos segundo Dubey (1998).

MUNICÍPIO	DISTRITO	NÚMERO	
		Açougues	Amostras
Campos dos Goytacazes	Centro	30	46 <sup>a</sup>
	Goytacazes	5	5
	Guarus	14	14
	Ururaí	5	5
	Morro do coco	5	5
	Farol de são Tomé	4	4
	Travessão	4	4
	Vila Nova	3	3
	Tocos	1	1
	Santa Maria	2	2
	Santo Eduardo	3	3
	Ponta da Lama	1	1
	Dores de Macabu	1	1
	Saturnino Braga	2	2
	Baixa grande	3	3
Poço gordo	1	1	

<sup>a</sup>Coletas em mesmo açougue foram em dias diferentes.

**Tabela 2** Tipo de corte e estado de conservação de amostras de carne suína comercializadas nos açougues de Campos dos Goytacazes, RJ e seus distritos avaliados quanto à presença de *Toxoplasma gondii* através de prova biológica segundo Dubey (1998).

TIPO DE CORTE	CONSERVAÇÃO		TOTAL
	Refrigeradas	Congeladas	
Costelas	02	-	2
Lombo	40	32	72
Pernil	18	08	26
<b>TOTAL</b>	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

#### 4.3 PROCESSAMENTO DOS TECIDOS

No NUPAP, cada amostra de tecido foi triturada por inteiro (500 g), utilizando-se para isso um liquidificador laboratorial (Waring® Commercial Laboratory Blender). Durante a trituração adicionou-se um volume mínimo de Tampão salina fosfato (PBS) - pH 7,2 para facilitar o procedimento. O copo do

aparelho foi devidamente autoclavado (autoclave vertical 75 L, Phoenix Luferco<sup>®</sup>, AV75) entre as etapas para evitar contaminação entre as amostras.

Após cada procedimento de trituração, uma alíquota (1 g) era separada, acondicionada em um microtubo plástico tipo “eppendorf” de 1,5 ml e armazenada em freezer a -20°C para posterior análise molecular.

#### 4.3.1 Digestão das carnes

A aplicação da técnica de digestão péptica foi baseada no protocolo previamente estabelecido por Dubey (1998), assim como o preparo do inóculo, com modificações (FRAZÃO-TEIXEIRA, 2009).

Após a trituração foram retirados 40 gramas de cada homogeneizado, que foram depositados individualmente em erlenmeyers de 200 ml devidamente identificados. O conteúdo foi completado com solução de pepsina ácida (pH entre 1,1 e 1,2) até o volume de 200 ml.

O processo de digestão foi feito com o uso de um agitador orbital termostatizado (Incubadora “shaker” refrigerada, Novatécnica<sup>®</sup>, NT 715), 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 plásticos de fundo cônico tipo “Falcon” de 50 ml e então centrifugado (Centrífuga refrigerada, Novatécnica<sup>®</sup>, NT 815) a 1300g por 10 minutos.

Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, restando apenas uma fração de aproximadamente 2-3 ml no interior de cada tubo. Completou-se o conteúdo com solução neutralizadora (bicarbonato de sódio 1,2%) com ajuste do pH 8,3, até atingir um volume final de 10 mL. O conteúdo total de cada um dos quatro tubos foi reunido em um único tubo de 50 mL. Este foi centrifugado a 1300g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados de 5 a 10 mL de solução antibiótica, deixando agir à temperatura ambiente por 30 minutos.

A solução antibiótica foi preparada com a adição de 0,1 g de antibiótico com 3.000.000 UI de Penicilina Benzatina, 1.500.000 UI de Penicilina

Procainada, 1.500.000 UI Penicilina Potássica e 2.500 mg de Estreptomicina Base (Pencivet<sup>®</sup>plus) em 100 ml de água destilada.

#### 4.4 PROVA BIOLÓGICA

Foram utilizados camundongos albinos suíços fêmeas, pesando entre 20 e 25 g, oriundos do biotério da UENF e do Instituto Vital Brazil.

##### 4.4.1 Manuseio dos camundongos

O manuseio e os procedimentos de eutanásia dos animais utilizados neste trabalho seguiram os princípios éticos em pesquisa com animais de experimentação preconizados pelas resoluções normativas números 12 e 13, de 20 de setembro de 2013, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da UENF, número licença 108/ 2011.

##### 4.4.2 Inoculação em camundongo

Uma dose de 1 ml da suspensão contendo o produto da digestão péptica de cada amostra de tecido de suíno foi via subcutânea em cada camundongo, sendo três ou cinco camundongos por amostra dependendo da disponibilidade. Outros três ou cinco camundongos receberam inóculo contendo apenas o veículo (PBS) e serviram como controle para cada dia de inoculação.

#### 4.4.3 Método de detecção do parasito em camundongo

Cada grupo de camundongos inoculados, referente a um tecido analisado, foi mantido em uma caixa devidamente identificada no biotério da UENF. Estes receberam ração própria para a espécie e água *ad libitum*. Os animais foram observados durante seis semanas e aqueles que morreram ou apresentaram qualquer sinal indicativo de toxoplasmose aguda (letárgicos, pelos eriçados e olhos entreabertos) foram examinados para eventual presença do parasito em esfregaço de pulmão em lâminas, sob observação em microscópio óptico (Nikon® eclipse E100) com objetiva de 40X.

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 teste de aglutinação modificado (MAT), de acordo com Dubey e Desmonts (1987). Os camundongos que não apresentaram quaisquer sinais de toxoplasmose ao fim de seis semanas, mas apresentaram sorologia positiva foram eutanasiados e examinados para a presença de cistos teciduais através de observação direta de esfregaços de cérebro ao microscópio óptico (FRAZÃO-TEIXEIRA, 2009).

##### a) Preparo de esfregaço de pulmão em lâminas

Daqueles animais que morreram ou que foram eutanasiados por apresentarem-se moribundos, foram colhidas amostras de pulmão para exame ao microscópio. Para a realização de esfregaços pulmonares, um pedaço de aproximadamente 1 a 3 mm<sup>3</sup> do pulmão foi pressionado 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 fragmento de tecido. Uma lamínula foi colocada sobre o esfregaço e observada ao microscópio óptico com objetiva de 40x em busca de taquizoítos de *T. gondii* (Dubey, 2010).

## b) Teste de aglutinação modificado – MAT para detecção de infecção

O teste de aglutinação para a detecção dos anticorpos anti-*T. gondii* em soros dos camundongos inoculados foi o MAT. A técnica foi realizada como descrita por Dubey e Desmonts (1987). Este foi conduzido em microplacas (Greiner Bio-one®) de 96 poços em forma de “U”. Os soros testados foram diluídos em PBS 0,01 M (pH 7,2).

A suspensão de antígeno foi composta de 2,5 ml de tampão borato de uso, pH 8,95 (0,4% de BSA em 100 ml de tampão de estoque), 35 µl de 2-mercaptoetanol (Vetec®), 50 µl de azul de Evans 2 mg/ml (Vetec®) e 100 µl da suspensão de taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH inativados com formalina, gentilmente cedidos pelo Dr. J.P. Dubey do “United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, Animal and Natural Resources Institute, Animal Parasitic Diseases Laboratory, BARC-East, Beltsville, USA”. Em cada poço da microplaca foram adicionados 25 µl da solução de antígeno e 25 µl dos soros previamente diluídos a 1:25. Soros de camundongos positivos e negativos (controles) também foram incluídos e a microplaca foi coberta com filme plástico (Parafilm® Bemis, PM996) e incubada a 37°C por 12 horas. A leitura da reação se baseou no perfil de sedimentação da suspensão de taquizoítos, onde a formação de uma teia indicou a presença de anticorpos e a formação de um ponto azul no fundo do poço a ausência de anticorpos.

O tampão borato de estoque previamente citado foi preparado adicionando-se 7,01g de NaCl, 3,09g de ácido bórico, 2g de azida de sódio, 24 ml NaOH 1N (dissolveu 10 g de NaOH em 250 ml de água destilada em balão volumétrico) e completou até 1 litro com água destilada, estocados à temperatura ambiente.

### c) Observação direta de fragmentos de encéfalos

Os animais que não vieram a óbito seis semanas após a inoculação e que obtiveram sorologia positiva foram eutanasiados e seus encéfalos retirados. Um fragmento do tecido foi prensado entre lâmina e lamínula para observação direta ao microscópio óptico em busca de cistos teciduais (objetiva de 10x).

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS

A caracterização genética foi realizada no NUPAP, na Unidade de Experimentação Animal da UENF e no Laboratório Sonda do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), utilizando a técnica “multi-locus DNA sequencing”.

### 4.5.1 Extração de DNA

O DNA de *T. gondii* dos isolados foi extraído dos tecidos pulmonares ou do cérebro de camundongos infectados. Foram feitas, também, extrações de DNA dos tecidos primários dos suínos, previamente armazenados congelados. Para tanto, 25 mg de cada amostra foi submetida ao procedimento de extração, como a seguir. 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). Os fragmentos de tecidos musculares dos suínos e pulmonares dos camundongos infectados foram colocados em um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml. Foram adicionados 180 µl do tampão ATL e 20 µl de proteinase K, homogeneizados em vortex (Biomixer<sup>®</sup>, QL - 901) e incubados sob agitação em banho-maria a 56°C (Novatecnica<sup>®</sup>, NT

248) até que o tecido tivesse sido completamente lisado, o que aconteceu em aproximadamente 2,5 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% (não fornecido pelo fabricante) e homogeneizados em vortex novamente. É importante adicionar o tampão AL e o etanol à amostra e misturá-los imediatamente através do vortex ou pipetagem para permitir uma solução homogênea.

A mistura foi então pipetada (incluindo qualquer precipitado) na coluna minispin, acoplada a um tubo coletor de 2 ml (fornecidos pelo fabricante). Os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm (Eppendorf® miniSpin, AG 22331 Hamburg) e em seguida descartaram-se os filtrados e os tubos coletores. As colunas minispin 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 minispin 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®. Foram descartados os filtrados e os tubos coletores e as colunas acopladas a um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml (não fornecido pelo fabricante). Foram adicionados 50 µl de tampão AE (diluído 1:10 em água para PCR) diretamente à membrana DNeasy®. 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 tipo 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.

#### **4.5.2 Detecção de DNA de *T. gondii***

O DNA produto da extração das carnes de suínos e tecidos de camundongos infectados foi submetido à amplificação para o elemento de

repetição de 529pb, utilizando-se os iniciadores Tox-4 (5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3') e Tox-5 (5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3') para detecção de DNA de *T. gondii* (HOMAN et al., 2000).

Os volumes, as concentrações e as especificações dos reagentes utilizados para o preparo das soluções na amplificação estão contidos no quadro 5. Foram pipetados 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 foi estabelecido como no quadro 7. Os produtos das amplificações foram observados em gel de agarose 0,8% imerso em tampão TAE 1X em cuba horizontal a 100 V, 400 mA, durante 90 minutos.

#### 4.5.3 Multi-locus DNA sequencing

O DNA dos isolados foi amplificado através de uma “nested-PCR” para 10 marcadores moleculares: SAG1, SAG2 (5'+3'SAG2), SAG3, BTUB, c22-8, c29-2, PK1, GRA6, L358, e Apico. Os volumes, as concentrações e as especificações dos reagentes utilizados para o preparo das soluções “mix” para cada marcador molecular nas amplificações primária e secundária estão contidos nos quadros 5 e 6.

Os iniciadores foram mantidos a -20°C na diluição de 500 pmol (estoque) e somente diluídos à concentração de uso (50 pmol) no momento da reação de PCR. As sequências dos iniciadores que foram utilizados nas reações primárias e secundárias são descritas no quadro 4. Para a reação primária foram pipetados 47 µl da solução “mix” (Quadro 5) em microtubos de 0,2 ml 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 (Biometra<sup>®</sup>, Tgradient) foi estabelecido como no quadro 7.

Para a reação de amplificação secundária (Quadro 6) o produto da reação primária foi utilizado no lugar da amostra de DNA original. A exemplo da reação primária, as soluções “mix” foram preparadas separadamente para cada marcador. Foram então adicionados 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 marcador e isolado, e inseridos no termociclador para incubação de acordo com a mesma programação descrita para a reação de amplificação primária (Quadro 7).

Os produtos da nested PCR (nPCR) foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 0,8% corado com GelRed<sup>™</sup> (Biotium<sup>®</sup>) e imersos em tampão TAE 1X em cuba horizontal a 100 V, 400 mA, 90 minutos (Bio-Rad<sup>®</sup>, PowerPac<sup>™</sup> Basic).

O gel de agarose foi preparado dissolvendo 0,8g de agarose (Invitrogen<sup>®</sup>) em 100 ml de tampão TAE 1X (Ultrapure TAE buffer 10x Invitrogen<sup>®</sup>). Adicionaram-se 5 µl de GelRed<sup>™</sup>.

Os produtos da nPCR foram purificados usando o kit “Illustra<sup>™</sup> GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare<sup>®</sup>)”, como segue: 500 µl do tampão de captura tipo 3 foram adicionados ao produto da reação de nPCR, vortexado e verificado se a coloração era a desejada (amarela ou laranja pálido). A mistura foi centrifugada e pipetada (incluindo qualquer precipitado) na coluna “microSpin”, acoplada a um tubo coletor de 2 ml (fornecidos pelo fabricante). Os tubos foram centrifugados (MIKRO<sup>®</sup> 200R, Hettich zentrifugen) a 16.000 g por 30 segundos e, em seguida, descartaram-se os filtrados colocando-se novamente a coluna no tubo coletor. Adicionaram-se 500 µl do tampão de lavagem tipo 1, centrifugados a 16.000 g por 30 segundos e descartaram-se os filtrados e os tubos coletores. As colunas “microSpin” foram acopladas a tubos tipo eppendorf de 1,5 ml livres de DNase (não fornecidos pelo fabricante). Foram adicionados 50 µl de tampão de eluição tipo 6 diretamente à membrana da coluna “microSpin”. A solução foi incubada à temperatura ambiente por um minuto e centrifugada a 16.000 g por um minuto, recuperando a amostra de DNA. Os tubos foram identificados apropriadamente e mantidos a -20°C até o envio dos produtos purificados para sequenciamento

dos produtos de DNA do parasito para os 10 marcadores previamente citados. O serviço de sequenciamento foi oferecido pelo Laboratório Sonda do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Previamente ao envio, os produtos purificados foram observados em gel de agarose 0,8%, imerso em tampão TAE 1X em cuba horizontal a 100 V, 400 mA, 90 minutos. Para o envio, foram preparadas soluções em volume final de 7,5 µl contendo os primers na concentração de 3,2 µM.

As sequências foram comparadas a sequências referências clonais tipos I, II e III através de um software para análises de sequências de nucleotídeos chamado DNASTAR<sup>®</sup> (Lasergene) para a caracterização dos genótipos do parasito.

**Quadro 4** Sequências de iniciadores utilizados para amplificações primárias e secundárias (“nested PCRs”) do DNA de *Toxoplasma gondii* isolados de carnes suínas de açougues do município de Campos dos Goytacazes, RJ, após digestão péptica dos tecidos e inoculação em camundongos (prova biológica).

Marcador		Iniciadores	Tamanho	Referência
SAG1	Externos	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	390 bp	Grigg et al. 2001
	Internos	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG		
5' SAG2	Externos	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	242 bp	Howe et al. 1997; Su et al. 2006
	Internos	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC		
3' SAG2	Externos	F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R: TCAAAGCGTGCATTATCGC	222pb	Howe et al. 1997
	Internos	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC		
SAG3	Externos	F:CAACTCTCACCATTCCACCC R:GCGCGTTGTTAGACAAGACA	225 bp	Grigg et al. 2001
	Internos	F: TCTTGTGCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA		
BTUB	Externos	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	411 bp	Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
	Internos	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC		
GRA6	Externos	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R:GCACCTTCGTTGTGGTT	344 bp	Khan et al. (2005; Su et al. 2006
	Internos	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG		
c22-8	Externos	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCGGTCTCA	521 bp	Khan et al. 2005; Su et al. (2006
	Internos	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R:AGGTGCTTGGATATTCCG		
c29-2	Externos	F:ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R:AGGGTCTCTTGCGCATACAT	446 bp	Khan et al. 2005; Su et al. 2006
	Internos	F: AGTTCTGCAGAGTGTCCG R: TGTCTAGGAAAGAGGCCG		
L358	Externos	F:TCTCTCGACTTCGCTCTTC R:GCAATTTCTCGAAGACAGG	418 bp	Khan et al. 2005; Su et al. 2006
	Internos	F:AGGAGGCGTAGCGCAAGT R:CCCTCTGGCTGCAGTGCT		
PK1	Externos	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	903 bp	Khan et al. 2005; Su et al. 2006
	Internos	F:CGCAAAGGGAGACAATCAGT R:TCATCGCTGAATCTCATTGC		
Apico	Externos	F:TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG R:AACGGAATTAATGAGATTTGAA	640 bp	Su et al. 2006
	Internos	F: GCAAATCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCTGAACCCTTGATA		

**Quadro 5** Reagentes utilizados nas PCRs para detecção do elemento de repetição de 529pb do DNA de *Toxoplasma gondii* e também para as reações primárias das nested-PCRs para genotipagem.

Reagente	Concentração	Volume	Especificações
Tampão (MgCl <sub>2</sub> )	10X	5 µl	Sigma®
dNTPs	2mM	5 µl	Sigma®
Iniciador F <sup>a</sup>	50 pmol	0,5 µl	IDT®
Iniciador R <sup>a</sup>	50 pmol	0,5 µl	IDT®
Taq polimerase	5 U/ µl	0,5 µl	Sigma®
Amostra de DNA	-	3 µl	-
Água ultrapura	-	35,5 µl	Sigma®

<sup>a</sup> Iniciador direto

<sup>b</sup> Iniciador reverso

**Quadro 6** Reagentes utilizados nas amplificações secundárias das “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	Concentração	Volume	Especificações
Tampão (MgCl <sub>2</sub> )	10X	5 µl	Sigma®
dNTPs	2mM	5 µl	Sigma®
Iniciador F <sup>a</sup>	50 pmol	0,5 µl	IDT®
Iniciador R <sup>a</sup>	50 pmol	0,5 µl	IDT®
Taq polimerase	5 U/ µl	0,5 µl	Sigma®
Amostra de DNA	-	1 µl	-
Água ultrapura	-	37,5 µl	Sigma®

<sup>a</sup> Iniciadores direto

<sup>b</sup> Iniciador reverso

**Quadro 7** PCRs para detecção do elemento de repetição de 529pb do DNA de *Toxoplasma gondii* e também para as reações primárias e secundárias das nested-PCRs para genotipagem.

Número de ciclos	Temperatura	Período
1	94°C	5 minutos
35	94°C	40 segundos
	58°C	40 segundos
	72°C	90 segundos
1	72°C	10 minutos
	4°	∞

Através da comparação nucleotídeo a nucleotídeo das sequências de DNA dos isolados com estas cepas referência, foi possível verificar as semelhanças e diferenças detalhadamente. Quando todos os nucleotídeos presentes na sequência de DNA de um dos isolados foram comuns a um genótipo referência específico, este isolado foi considerado possuidor do respectivo alelo para aquele *locus* (Ex: Tipo I, alelo tipo I). No entanto, quando nucleotídeos comuns a dois ou três genótipos foram detectados na sequência de um isolado ao mesmo *locus*, este isolado foi considerado como possuidor de um alelo recombinante para o marcador em questão. Quando nucleotídeos diferentes dos encontrados para quaisquer dos três genótipos referência foram detectados, o alelo foi considerado atípico.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DETECÇÃO DO DNA DE *Toxoplasma gondii* NOS TECIDOS

O DNA de *T. gondii* não foi amplificado em quaisquer tecidos primários suínos submetidos à PCR.

### 5.2 PROVA BIOLÓGICA EM CAMUNDONGOS

Três cepas viáveis de *T. gondii* (3%) foram detectadas em três amostras de carne suína diferentes dentre as 100 analisadas; estes isolados foram designados TgPgBr17, TgPgBr18 e TgPgBr19 “ Tg = *Toxoplasma gondii*; Pg = Hospedeiro Pig; Br = país Brazil” (VELMURUGAN et al., 2009). Os dados a respeito da infectividade e mortalidade em camundongos podem ser observados na tabela 3.

**Tabela 3** Infectividade e mortalidade de camundongos inoculados com *Toxoplasma gondii* isolados em carnes suínas oriundas de açougues do Município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Isolado	Infectividade%	Mortalidade%	DAI <sup>a</sup>
<b>TgPgBr17</b>	100	66,7	17
<b>TgPgBr18</b>	66,7	50	20
<b>TgPgBr19</b>	100	33,33	18

<sup>a</sup> Dias de sobrevivência após inoculação

Todos os isolados foram obtidos de tecidos comprados de diferentes açougues do município de Campos, RJ. Dois dos isolados foram obtidos de açougues no mercado municipal da cidade (TgPgBr18 e TgPgBr19) e o terceiro isolado foi obtido no distrito de Goytacazes (TgPgBr17). O isolado TgPgBr17 mostrou uma mortalidade de 66,7% nos camundongos infectados

primariamente. O isolado TgPgBr18 de 50% nos camundongos infectados primariamente. Já no isolado TgPgBr19 observou-se uma mortalidade de 33,3% nos camundongos infectados primariamente (Tabela 3). O isolado TgPgBr17 que apresentou maior porcentagem de mortalidade foi obtido no distrito de Goytacazes.

Dois dos três camundongos que apresentaram sinais clínicos da doença com o isolado TgPgBr17 morreram 17 dias após a inoculação (DAI). Para estes, foram feitos esfregaços de pulmão verificando a presença de taquizoítos (Tabela 3). O camundongo que não morreu durante o período de observação foi testado pelo MAT e considerado positivo (título  $\geq 1:25$ ). Para o isolado TgPgBr18, um dos três camundongos inoculados morreu ao 20° DAI (Tabela 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 TgPgBr19, um dos três camundongos inoculados morreu ao 18° DAI (Tabela 3), verificando-se a presença de taquizoítos em esfregaço de pulmão e os camundongos que não morreram também foram considerados positivos pelo MAT. Todos os camundongos positivos ao MAT que não morreram apresentaram cistos cerebrais. Os camundongos inoculados com as demais 97 amostras sobreviveram ao período de observação e foram negativos ao MAT.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA POR SEQUENCIAMENTO

A caracterização genética através do sequenciamento permitiu identificar três genótipos (Tabela 4), nenhum arquétipo clonal.

Os dados das análises das sequências de todos os marcadores usados nesta pesquisa e de outras pesquisas no Brasil podem ser observados nas tabelas 4 e 5. Na análise dos dados foi verificado que o isolado TgPgBr17 teve predominância de alelos atípicos (seis) nos *loci* SAG1, BTUB, GRA6, L358, c22-8, 5'+3'SAG2, exceto para os *loci* SAG3 e c29-2 (III), PK1 e Apico (I). No isolado TgPgBr18 houve igual número de alelos atípicos (cinco) nos *loci* SAG1, GRA6, c22-8, L358, 5'+3' SAG2, e alelos arquétipos clonais nos *loci* BTUB e

Apico (I), c29-2 e SAG3 (III), PK1 (II). Já no isolado TgPgBr19 foi observado predominância de alelos clonais (seis) nos *loci* SAG1 e Apico (I), SAG3, BTUB, L358, c29-2, 5'+3' SAG2 (III), exceto para os *loci* c22-8, PK1, e GRA6 que foram atípicos. Na figura 2 está demonstrada a porcentagem de alelos atípicos e clonais apresentada nos isolados obtidos de suínos no município de Campos dos Goytacazes (Frazão-Teixeira et al 2011 e esta pesquisa).

Os três genótipos descritos nesta pesquisa apresentaram nucleotídeos diferentes das linhagens clonais, como se pode observar nas tabelas 6, 7, 8, 9, 10. Para o isolado TgPgBr17, nucleotídeos atípicos foram detectados no *locus* L358, nucleotídeos 68 e 77 (Tabela 6). Para o isolado TgPgBr18, nucleotídeos atípicos foram detectados aos *loci* L358, nucleotídeos 170 e 207 (Tabela 6), e SAG1, nucleotídeo 42 (Tabela 7). Para o isolado TgPgBr19, nucleotídeos atípicos foram detectados nos *loci* c22-8 nucleotídeos 160, e 325 (Tabela 8), e PK1 nucleotídeo 330 (Tabela 9).

**Tabela 4** Genótipos “multi-locus” de isolados de *Toxoplasma gondii* em amostras de carne suína comercializada nos açougues do município de Campos dos Goytacazes, Brasil, através de sequenciamento de DNA.

Marcador/Cromossomo	Isolados		
	TgPgBr17	TgPgBr18	TgPgBr19
<b>c22-8/1b</b>	u-1	u-2	u-3
<b>c29-2/III</b>	III	III	III
<b>L358/ V</b>	u-1	u-2	III
<b>PK1/VI</b>	I	II	u-1
<b>SAG1/ VIII</b>	u-1	u-2	I
<b>5'+3' SAG2/VIII</b>	u-1	u-1	III
<b>BTUB/IX</b>	u-1	I	III
<b>GRA6/ X</b>	u-1	u-1	u-2
<b>SAG3/ XII</b>	III	III	III
<b>Apico/ Apicoplasto</b>	I	I	I

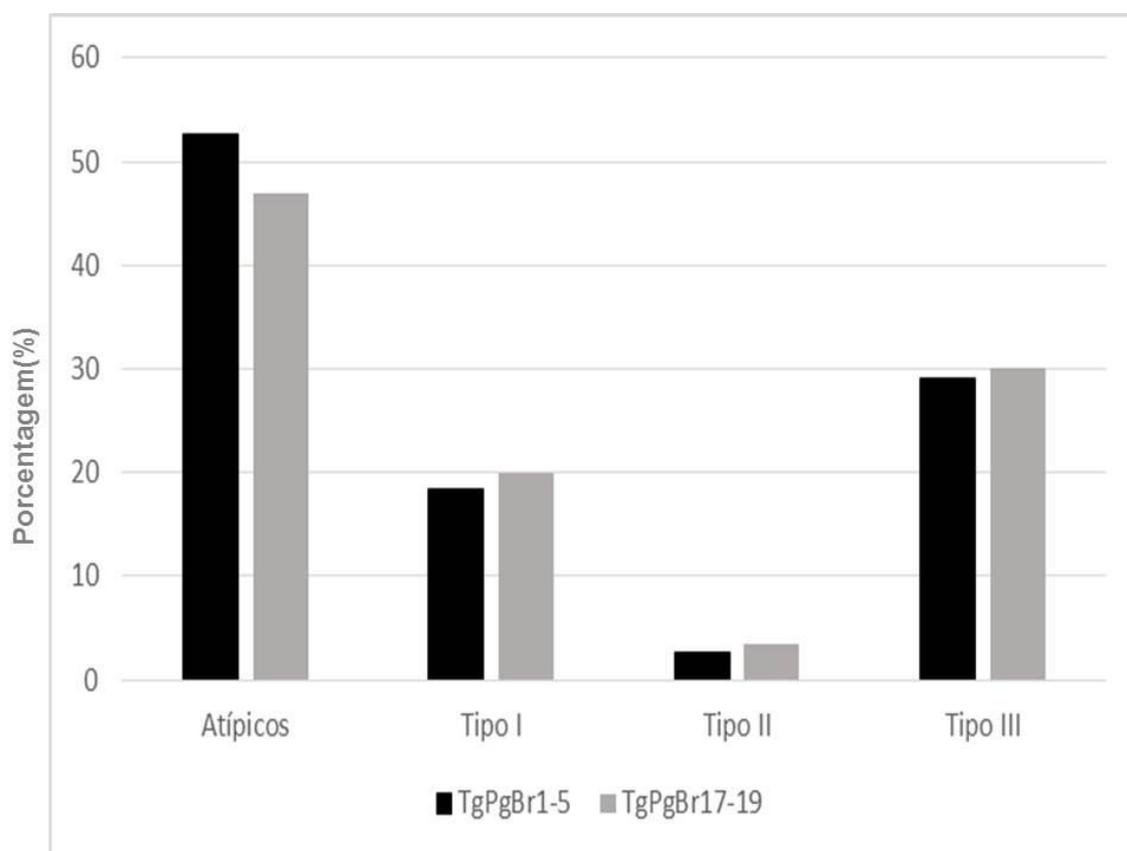
"u" indica um alelo não arquétipo; I, II, III se referem a alelos arquétipos das cepas Tipo I, II ou III.

**Tabela 5.** Caracterização genética de isolados de *Toxoplasma gondii* através da “multi-locus DNA sequencing” no Brasil.

Genótipos	Isolados	Marcadores Moleculares										Referência	
		SAG1	5'+3'SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	Pk1	Apico		
1	TgPgBr1, TgPgBr2	I	u-1	III	I	u-1	u-1	I	I	u-1	I	Frazão-Teixeira et al. 2011	
2	TgPgBr3	u-1	u-2	III	I	u-2	u-2	u-1	u-1	u-1	I		
3 (Tipo III)	TgPgBr4	II/III	III	III	III	u-3	III	III	III	u-2	III		
4	TgPgBr5	u-1	u-2	III	u-1	II	u-1	u-1	u-2	u-3	III		
5	TgPgBr6	u-1	III	u-1	III	-	u-1	-	-	-	-	Bezerra et al. 2012	
6	TgPgBr7	u-1	III	u-1	III	-	u-2	-	-	-	-		
7	TgPgBr8	u-1	III	u-1	III	-	u-3	-	-	-	-		
8	TgPgBr9	u-2	-	u-2	u-1	-	u-4	-	-	-	-		
9	TgPgBr10	u-1	III	u-1	III	-	u-5	-	-	-	-		
10	TgPgBr11	u-1	III	u-2	III	-	u-6	-	-	-	-		
11	TgPgBr12	u-2	III	u-3	III	-	u-1	-	-	-	-		
12	TgPgBr13	u-2	III	u-4	III	-	u-1	-	-	-	-		
13	TgPgBr14	u-2	III	u-4	III	-	u-1	-	-	-	-		
14	TgPgBr15	u-1	III	u-5	u-2	-	u-1	-	-	-	-		
15	TgPgBr16	u-1	III	u-1	I/II	-	u-7	-	-	-	-		
16	TgPgBr17	u-1	u-1	III	u-1	u-1	u-1	III	u-1	I	I		Esta pesquisa
17	TgPgBr18	u-2	u-1	III	I	u-1	u-2	III	u-2	II	I		
18	TgPgBr19	I	III	III	III	u-2	u-3	III	III	u-1	I		
19	TgShBr17	I	-	III	I	u-1	u-1	-	I	III	I		Henriques (2015) <sup>a</sup>
	TgShBr18	I	-	III	I	u-1	u-1	-	I	III	I		
	TgShBr19	I	-	III	I	u-1	u-1	-	I	III	I		
	TgShBr20	I	-	III	I	u-1	u-1	-	I	III	I		

"u" indica um alelo não arquétipo; I, II, III se referem a alelos arquétipos das cepas Tipo I, II ou III.

<sup>a</sup>Dados não publicados.



**Figura 2.** Percentuais de alelos atípicos e clonais para os isolados TgPgBr1-5 (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011) e TgPgBr17-19 (esta pesquisa).

**Tabela 6.** Nucleotídeos atípicos (em destaque) não observados para os alelos clonais tipo I, II e III de *Toxoplasma gondii* ao marcador molecular L358 e detectados nas sequências de DNA de dois isolados de carne suína comercializada em açougues no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Genótipos/Isolados	Nucleotídeo						Alelo
	68	77	130	170	178	207	
Consensus	C	C	G	G	C	C	
Tipo I, RH	.	.	.	.	G	.	I
Tipo II, PTG	.	.	A	.	.	.	II
Tipo III, CTG	.	.	.	.	.	.	III
<b>TgPgBr17</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	.	.	G	.	u-1
<b>TgPgBr18</b>	.	.	.	<b>A</b>	.	<b>T</b>	u-2

**Tabela 7.** Nucleotídeo atípico (em destaque) de *Toxoplasma gondii* ao marcador molecular SAG1 e detectado na sequência de DNA de um isolado de carne suína comercializada em açougues no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Genótipos/Isolados	Nucleotídeos						Alelo
	4	39	42	56	149	237	
Consensus	T	C	T	G	G	C	
Tipo I, RH	C	T	.	C	A	T	I
Tipo II, PTG	.	.	.	.	.	.	II
Tipo III, CTG	.	.	.	.	.	.	III
<b>TgPgBr18</b>	ins	T	<b>C</b>	C	A	T	u-2

<sup>ins.</sup> Informação insuficiente

**Tabela 8.** Nucleotídeos atípicos (em destaque) de *Toxoplasma gondii* ao marcador molecular c22-8 e detectados na sequência de DNA de um isolado de carne suína comercializada em açougues no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Genótipos/Isolados	Nucleotídeos					Alelo
	104	160	176	325	384	
Consensus	A	C	T	A	G	
Tipo I, RH	.	.	.	.	.	I
Tipo II, PTG	.	.	C	.	A	II
Tipo III, CTG	G	.	.	.	.	III
<b>TgPgBr19</b>	.	<b>G</b>	.	<b>T</b>	.	u-1

**Tabela 9.** Nucleotídeo atípico (em destaque) de *Toxoplasma gondii* ao marcador molecular PK1 e detectado na sequência de DNA de um isolado de carne suína comercializada em açougues no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Genótipos/Isolados	Nucleotídeos				Alelo
	74	225	273	330	
Consensus	A	C	G	T	
Tipo I, RH	.	.	.	.	I
Tipo II, PTG	.	.	T	.	II
Tipo III, CTG	T	.	.	.	III
<b>TgPgBr19</b>	.	.	.	<b>A</b>	u-1

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo oferece uma visão ampla da presença de *T. gondii* viável na carne suína comercializada para consumo humano neste município endêmico para toxoplasmose humana e animal. Através do levantamento dos principais açougues que comercializam carne suína em áreas centrais e também nos distritos mais afastados, avaliou-se de forma única o risco de infecção a que está submetida a população ao ingerir carne suína no município de Campos dos Goytacazes e regiões circunvizinhas que adquirem estas carnes. Esboçamos ainda as similaridades e divergências fenotípicas e genotípicas que compõem a estrutura populacional genética de *T. gondii* em Campos dos Goytacazes, base para futuras análises das rotas de infecção humana.

Não foi possível amplificar o DNA de *T. gondii* diretamente dos tecidos, seja dos oriundos de carnes congeladas ou refrigeradas. Possivelmente o DNA do parasito estivesse presente em alguma amostra de tecido congelado, mas em casos crônicos ou subclínicos a densidade do parasito nos tecidos primários é muito baixa para ser detectada (DUBEY et al., 2004). Por outro lado, parasitos viáveis foram isolados em três amostras de carne através da prova biológica em camundongos, todas refrigeradas. As carnes comercializadas neste município são oriundas de suínos criados em propriedades familiares da cidade em baixas condições higiênicas, em contato com outros animais, especialmente gatos (FRAZÃO-TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2011). Certamente, o congelamento prévio de 40% das amostras adquiridas nos açougues contribuiu para a redução do número de isolados viáveis na prova biológica. Este dado corrobora a literatura, pois o parasito é inativado quando a carne é submetida ao congelamento a  $-12^{\circ}\text{C}$  por 12 horas (DUBEY, 2010). Logo, podemos inferir que o isolamento através de inoculação em camundongos após digestão péptica em nossa pesquisa foi mais eficiente em detectar *T. gondii*, possivelmente pela maior quantidade de tecido analisado, estando de acordo com estudos feitos por outros autores como Tsutsui et al. (2007), embora outras pesquisas recomendem o uso das duas técnicas para melhorar a sensibilidade na detecção de *T. gondii* (YAI et al., 2003).

O uso de uma maior quantidade de tecido analisada em provas biológicas favorece o isolamento em comparação à prova molecular. Ainda, nesta pesquisa foram utilizados 40 g de tecido primário *in natura* na digestão péptica e foi inserida uma importante modificação à técnica preconizada por Dubey (1998) que provavelmente aumentou a sensibilidade do isolamento. Apesar do volume de tecido digerido ser praticamente o mesmo ao utilizado no protocolo original, a presente padronização (FRAZÃO-TEIXEIRA, 2009) tritura 500 g do tecido e então submete 40 g deste triturado à digestão péptica, enquanto o protocolo original tritura apenas 50 g de tecido primário. Este incremento na técnica aumenta a probabilidade de isolamento do parasito à medida que uma área maior do tecido infectado participa do processamento.

Todas as amostras foram infectivas e capazes de causar a morte de pelo menos um dos três camundongos inoculados (Tabela 3 e Figura 2). Todas as mortes ocorreram entre os dias 17 e 20 após a infecção (Tabela 3), sugerindo alta virulência das cepas a camundongos, mas outros fatores como a carga parasitaria têm que ser tidos em conta. Embora tenhamos identificado molecularmente estas cepas como atípicas, elas apresentaram infectividade e patogenicidade similares às linhagens clonais tipo I, sabidamente letais a camundongos (DUBEY, 2010). Estes resultados estão em consonância com os obtidos para grande parte das cepas de *T. gondii* isoladas no Brasil (DUBEY et al., 2012).

As primeiras pesquisas em biologia molecular para identificação dos isolados de *T. gondii* em suínos usavam somente um marcador molecular (SANTOS et al., 2005; DA SILVA et al., 2005; DE SOUSA et al., 2006; BELFORT-NETO et al., 2007) e os isolados eram classificados como um dos tipos clonais I, II ou III, descritos por Howe e Sibley (1995). Ao analisar esses isolados com outros marcadores genéticos, foi possível observar genótipos não-arquétipos (atípicos ou exóticos). A técnica mais utilizada até o momento é a “multi-locus PCR-RFLP”, que tem identificado as diferenças mais significativas entre os três tipos clonais, suas linhagens recombinantes e alguns alelos atípicos (HOWE e SIBLEY, 1995; SU et al., 2006). Entretanto, esta análise é falha para identificar a grande diversidade genética recentemente observada na América do Sul, especialmente no Brasil (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). A técnica se restringe aos pontos de reconhecimento e corte das

enzimas de restrição para a classificação genotípica. A “multi-locus DNA-sequencing” é capaz de detectar essas diferenças genéticas nucleotídeo a nucleotídeo, essencial para delinear com precisão a verdadeira relação genética entre os isolados circulantes em regiões do mundo onde existe uma enorme variedade genética (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). Poucas pesquisas usam a técnica “multi-locus DNA sequencing” em pesquisas para identificar genótipos de *T. gondii* e, tendo em vista esta lacuna, a presente pesquisa oferece uma caracterização fiel à realidade da estrutura populacional genética do parasito nesta região. Este conhecimento será primordial para cancelar pesquisas futuras no aprimoramento das atuais técnicas imunológicas e moleculares de diagnóstico da doença severa em seres humanos e animais.

As três cepas isoladas nesta pesquisa foram designadas TgPgBr17, 18 e 19, seguindo a última nomeação de cepas de *T. gondii* isoladas em suínos (BEZERRA et al., 2012). O resultado do sequenciamento para 10 marcadores demonstra que as três cepas representam três genótipos distintos entre si e também entre outros isolados obtidos de tecidos de suínos em Campos dos Goytacazes (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011) e no município de Ilhéus, BA (BEZERRA et al., 2012) (Tabela 5). Em pesquisa prévia realizada pelo nosso grupo de pesquisa, a primeira a caracterizar *T. gondii* viável em suínos no Brasil, o foco foi a investigação da infecção em tecidos de suínos comercializados no principal mercado popular da cidade de Campos. A substancial diversidade então observada levantou a necessidade de ampliar o estudo para todo o município e assim ampliar a visão da estrutura populacional genética do parasito. Com base nos atuais resultados, ainda que o parasito tenha apresentado alelos clonais em alguns marcadores, não há uma tendência à formação de linhagens clonais. Ao contrário, confirmou-se a alta divergência caracterizada pela forte recombinação dos alelos atípicos e arquétipos clonais I, II e III (Tabela 4).

Ao detalhamento nucleotídico da “multi-locus DNA sequencing”, os três isolados TgPgBr17, 18 e 19 apresentaram sequências idênticas para os marcadores c29-2 (tipo III), SAG3 (tipo III) e Apico (tipo I). Os isolados TgPgBr17 e 18 também foram iguais para os marcadores SAG2 e GRA6, com sequências atípicas. Assim, pelo menos duas cepas apresentaram igualdade

alélica em pelo menos cinco marcadores genéticos, diferindo nos outros cinco. Divergências similares são observadas ao compararmos este grupo de genótipos com os obtidos em suínos do estudo piloto de 2011 (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). Apesar da manutenção da proporção alélica da população de *T. gondii* nesta região (Figura 4), a divergência na distribuição destes alelos no grupo de *loci* analisados permite inferir sobre a forte influência da recombinação gênica para a estrutura populacional de *T. gondii* neste município, como descrita por Rajendran et al. (2012) para a América do Sul.

Pena et al. (2008) sugerem que *T. gondii* tenha uma estrutura populacional enzoótica no Brasil, na qual frequentes trocas genéticas, proporcionadas pela maior possibilidade de infecções em felídeos domésticos ou silvestres têm gerado uma variedade de recombinações e algumas linhagens clonais de sucesso têm se expandido dentro de amplas áreas geográficas. Em Campos dos Goytacazes, as taxas de soropositividade em humanos são altas, alcançando até 80% da população de baixa renda (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003) e a água tem sido identificada como a principal fonte de infecção (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Estudos têm demonstrado alta contaminação ambiental em Campos (SILVA et al., 2003), o que levaria a uma alta taxa de infecção em hospedeiros intermediários por *T. gondii* e a consequência seria o aumento da oportunidade de recombinação genética em gatos. Isto manteria a estrutura endêmica do parasito no Brasil (PENA et al., 2008).

Comparando-se o grupo de alelos identificados por ambas as pesquisas realizadas em suínos em Campos (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011) e os dados apresentados na presente tese é possível observar uma nítida conservação da proporção de alelos distribuídos nas cepas circulantes em suínos (Figura 4). Nota-se a predominância do percentual de alelos atípicos (47 a 52,6%) frente aos demais clonais (Figura 4). Dentre os alelos clonais, o tipo III é o predominante (29 a 30%) e o tipo I a seguir (18,4 a 20%). Somente um alelo tipo II foi isolado em cada pesquisa citada: um para o isolado TgPgBr5 e outro para o isolado TgPgBr18, ambos em marcadores diferentes (GRA6 e PK1, respectivamente). Por outro lado, a distribuição destes alelos ao longo dos 10 *loci* analisados, em ambos os estudos, foi absolutamente variada, o que confirma em definitivo a natureza divergente da estrutura populacional genética

de *T. gondii* em suínos nesta área de toxoplasmose endêmica no Estado do Rio de Janeiro.

Uma característica que merece destaque para as cepas isoladas em suínos nesta região é a predominância de alelos tipo III ao marcador SAG3, seja para o grupo de amostras genotipadas em 2011 ou 2015. Isto fica evidente quando confrontamos estes dados com os dos genótipos caracterizados por Bezerra et al. (2012) no município de Ilhéus, BA (Tabela 5). Todas as 11 cepas isoladas em suínos daquela região apresentaram alelos atípicos ao marcador SAG3, o que confirma a tendência à clusterização em diferentes regiões do Brasil observada por Pena et al. (2008). Estudos futuros deveriam investigar a existência deste perfil genotípico em amostras de isolados humanos e se esta variação possui alguma associação com severidade da doença humana no Brasil. Em contrapartida, as cepas de suínos da Bahia (BEZERRA et al., 2012) foram todas caracterizadas como tipo III ao marcador SAG2, enquanto as cepas dos suínos fluminenses caracterizaram-se todas por alelos atípicos, com exceção do isolado TgPgBr19 (alelo tipo III). Em complementação ao marcador SAG3, o SAG2 deveria ser melhor estudado pela sua capacidade de discernir completamente estes grupos de isolados regionais.

Pena et al (2008) relatam a importância da realização de mais pesquisas em nível da “multi-locus DNA sequencing” para coletar dados das sequências deste grupo de marcadores nos genótipos atípicos, selecionando endonucleases de restrição que reconheçam os tipos não clonais. Neste sentido, é importante ressaltar a alta variedade alélica de *T. gondii* ao *locus* c22-8. Todas as cepas isoladas de suínos, seja no estado do RJ como na BA (BEZERRA et al., 2012), apresentam-se atípicas neste *locus*. Tendo em vista que a “multi-locus PCR-RFLP” é de fácil execução e possui boa resolução para identificar isolados de *T. gondii* (SU et al., 2006), recomenda-se que futuros estudos para refinamento desta técnica foquem em uma análise aprofundada do marcador c22-8. Merece destaque não só a quantidade de alelos detectados por este marcador, mas também a variação nucleotídica entre eles (Tabela 4).

Em outro estudo finalizado em 2015 por Henriques (dados ainda não publicados), foi realizado isolamento e caracterização genética de quatro cepas de *T. gondii* em ovinos criados no município de Campos dos Goytacazes

(Tabela 5). Além da alta virulência a camundongos, todas as cepas apresentaram o mesmo perfil genotípico à análise pelos marcadores genéticos SAG1, SAG3, c22-8, L358, PK1, BTUB, GRA6 e Apico (HENRIQUES, 2015; dados ainda não publicados). A divergência genética dos isolados em suínos de Campos dos Goytacazes parece ser, portanto, mais expressiva do que em ovinos na mesma área. Pesquisas futuras com um maior número de ovinos permitirá concluir em definitivo sobre esta hipótese.

A presente pesquisa com isolados de suínos confirma a alta diversidade genética do *T. gondii* no Brasil, conforme citado por outros por meio de diferentes técnicas (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; BEZERRA et al., 2012; MACIEL et al., 2014; HENRIQUES, 2015). Mais pesquisas devem ser realizadas com isolados encontrados em animais e seres humanos em regiões de ampla diversidade genética do parasito para determinação da verdadeira correlação entre genótipo e fenótipo e, conseqüentemente, melhor entender esta zoonose, especialmente no Brasil.

## 7 CONCLUSÕES

A partir do isolamento *T. gondii* em carnes de suínos comercializadas nos açougues de Campos dos Goytacazes, RJ, pode concluir que:

- A população deste município corre risco de infecção por *T. gondii* através do consumo de carnes suínas “in natura”, sendo este, possivelmente, um dos fatores que contribui para o elevado nível de infecção;
- Confirma-se a ampla diversidade genética de *T. gondii* em suínos comercializados para consumo humano em açougues da área central e distritos de Campos dos Goytacazes, RJ;
- A estrutura populacional genética de *T. gondii* em infecções suínas em Campos dos Goytacazes é regida por proporções constantes de alelos atípicos e clonais, com predominância dos primeiros, distribuídos de forma aleatória ao longo dos 10 *loci* analisados;
- Os suínos são importantes na cadeia epidemiológica de *T. gondii* e, possivelmente, estejam contribuindo para a diversidade genética deste parasito no município.

## REFERÊNCIAS

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, RJ. 2003.

AJZENBERG, D., BANULS, A.L., SU, C., DUMETRE, A., DEMAR, M., CARME, B., DARDE´, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 34, p. 1185–1196, 2004.

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

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; GARCÍA-MACHADO, C.; ALVARADO-ESQUIVEL, D.; GONZÁLEZ-SALAZAR, A. M.; BRIONES-FRAIRE, C.; VITELA-CORRALES, J.; VILLENA, I.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Pigs in Durango State, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 616-619, 2011.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; ESTRADA-MALACÓN, M. A.; REYES-HERNÁNDEZ, S. O.; PÉREZ-RAMÍREZ, J. A.; TRUJILLO-LÓPEZ, J. I.; VILLENA, I.; DUBEY, J. P. High Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Domestic Pigs in Oaxaca State, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 6, p. 1248-1250, 2012.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; ROMERO-SALAS, D.; GARCÍA-VÁZQUEZ, Z.; CRIVELLI-DIAZ, M.; BARRIENTOS-MORALES, M.; LOPEZ-DE-BUEN, L.; DUBEY, J.P. Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Veracruz State, Mexico. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, p. 705–709, 2014.

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

ANAND, R.; JONES, C.W.; RICKS, J.H.; SOFARELLI, T.A.; HALE, D.C. Acute Primary Toxoplasmosis in Travelers Returning From Endemic Countries. **Journal of Travel Medicine**, v. 19, n. 1, p. 57–60, 2012.

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.

AUBERT, D.; VILLENA, I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 290-295, 2009.

AZEVEDO, S. S., PENA, H. F. J.; ALVES, C. J.; GUIMARÃES FILHO, A. A. M.; OLIVEIRA, R. M.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticaval, v. 19, n. 2, p. 80-84, 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.

BÁRTOVÁ. E.; SEDLÁK. K.; Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs in the Czech Republic. **Parasitology**, v. 138, p. 1369–1371, 2011.

BAYARRI, S.; GRACIA, M. J.; PÉREZ-ARQUILLUÉ, C.; LÁZARO, R.; HERRERA, A. *Toxoplasma gondii* in Commercially Available Pork Meat and Cured Ham: A Contribution to Risk Assessment for Consumers. **Journal of Protection**, v. 75, n. 3, p. 597-600, 2012.

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.

BERAL, M.; ROSSI, S.; AUBERT, D.; GASQUI, P.; TERRIER, M.E. KLEIN, F.; VILLENA, I.; ABRIAL, D.; GILOT-FROMONT, E.; RICHOMME, C.; HARS, J. JOURDAIN, E. Environmental Factors Associated with the Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Wild Boars (*Sus scrofa*), France. **EcoHealth**, v. 9, p. 303–309, 2012.

BERGER-SCHOCH, A. E.; BERNET, D.; DOHERR, M. G.; GOTTSTEIN, B.; FREY, C. F. *Toxoplasma gondii* in Switzerland: A Serosurvey Based on Meat Juice Analysis of Slaughtered Pigs, Wild Boar, Sheep and Cattle. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, p. 472–478, 2011.

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.

BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J.N.; DA SILVA, E.M.K.; BORTOLIERO, A. L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.30, n. 1, p. 21–25. 1997.

BOWIE, W. R.; KING, A. S. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **Lancet**. v. 350,n. 9072, p. 173–177. 1997.

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.

CADEMARTORI, B.G.; SANTOS, L.M.J.F.; OLIVEIRA, F.C.; QUEVEDO, P.; OLIVEIRA, P.A.; RAMOS, T.S.; ROCHA, A.S.R.; RUAS, J.L.; FARIAS, N.A.R. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 207–211, 2014.

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.

CHANG, Q.; ZHENG, X.; QIU, J.; WANG, C.; ZHU, X. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Fattening Pigs in Northeast China. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 544-545, 2013.

CHOI, W. Y., NAM, H.W.; KWAK, N. H.; HUH, W.; KIM, YR.; KANG, MW.; CHO, SY.; DUBEY, JP. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **Journal Infectious Diseases**, v. 175, n. 5, p. 1280–1282. 1997.

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

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa N. 12, de 20 de Setembro de 2013. Disponível em: <[http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/313178/Resolucoes\\_Normativas.html](http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/313178/Resolucoes_Normativas.html)>. Acesso em: 06 mai. 2014.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa N. 13, de 20 de Setembro de 2013. Disponível em: <[http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/313178/Resolucoes\\_Normativas.html](http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/313178/Resolucoes_Normativas.html)>. Acesso em: 06 mai. 2014.

COELHO, C.; VIEIRA-PINTO, M.; FARIA, A.S.; VALE-GONCALVES, H.; VELOSO, O.; PAIVA-CARDOSO, M.N.; MESQUITA, J.R.; LOPES, A.P. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* in hunted wild boar from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 310–312, 2014.

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.

DA COSTA, T.; GONTIJO, M.; BOAVENTURA, J.; NAVES, W.; MARTINS, M.; DE CASTRO, A. *Toxoplasma gondii*: Toxoplasrose, com Ênfase no Diagnóstico; **Revista de Patologia Tropical**; v. 37, n. 3, p. 191-207, jul.-set. 2008.

DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; WADA M. Y. et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 326–329. 2006.

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.

DE SOUSA, R.A.; LEMOS, J.F.; FARIAS, L.A.; LOPES, C.D.; DOS SANTOS, K.R. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pigs in southern Piauí. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 98-100, Jan-Mar 2014.

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.

DEKSNE, G.; KIRJUŠINA, M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Domestic Pigs (*Sus scrofa domestica*) and Wild Boars (*Sus scrofa*) in Latvia. **Journal of Parasitology**, v. 99, n.1, p. 44-47, 2013.

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. 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. 2010.

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, 2008.

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.; GRAHAM, D.H.; YOUNG, R.W. DE; DAHL, E.; EBERHARD, M.L.; NACE, E.K. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 67-71, 2004.

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, 2008a.

DUBEY, J.P.; HILL, D.E.; ROZEBOOM, D.W.; RAJENDRAN, C.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L.R.; KWOK, O.C.H.; SU, C. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. **Veterinary Parasitology**, 188, p. 14-18, 2012.

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, 2008b.

ESTEVEZ, F.; AGUIAR, D.; ROSADO, J.; COSTA, M.L.; DE SOUSA, B.; ANTUNES, F.; MATOS, O.; *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 8– 12, 2014.

FEITOSA, T.F.; VILELA, V.L.; DE MELO, L.R.; DE ALMEIDA NETO, J.L.; SOUTO, D.V.; DE MORAIS, D.F.; ATHAYDE, A.C.; AZEVEDO, S.S.; PENA, H.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 305-9, 2014.

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.

FERREIRA, A. DE M.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**. V. 6, n. 1, p. 22-31, 2006.

FERREIRA, I. M. R.; VIDAL, J. E.; COSTA-SILVA, T. A.; MEIRA, C. S.; HIRAMOTO, R. M.; de OLIVEIRA, A. C. P.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 221-227, 2008.

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 sequenciamento**. Tese de Doutorado em Ciência Animal – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. p. 77, 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.

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

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.; TAN, H. K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANFORD, M. R.; PETERSEN, E.; European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT) Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. e277. 2008.

GIANNOULIS, C.; ZOURNATZI, B.; GIOMISI, A.; DIZA, E.; TZAFETTAS, I. Toxoplasmosis during pregnancy: a case report and review of the literature. **Hippokratia**. v. 12,n. 3, p. 139-143. 2008.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C. MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 184, p. 633-639, 2001.

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.

HALOVÁ, D.; MULCAHY, G.; RAFTER, P.; TURČEKOVÁ, L.; GRANT, T.; T. DE WAAL, T. *Toxoplasma gondii* in Ireland: Seroprevalence and Novel Molecular Detection Method in Sheep, Pigs, Deer and Chickens. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, 168–173, 2013.

HENRIQUES, L.S.V. **Caracterização biológica e genética de *Toxoplasma gondii* isolados de ovinos naturalmente infectados no município de Campos dos Goytacazes, RJ.** Tese de Doutorado em Ciência Animal – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 2015.

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

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.

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

HOWE, D.; SIBLEY, D., *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. **The Journal of Infectious Diseases** v. 172, p. 1561-6, 1995.

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.

JIANG, H.; ZHANG, W.; ZHAO, L.; ZHOU, D.; SONG, H.; XU, C.; DENG, S.; ZHU, X. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Pigs in Jiangxi Province, Southeastern China. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 11, n. 5, 2014.

JOKELAINENA, P.; NÄREAHO, A.; HÄLLI, O.; HEINONEN, M.; SUKURA, A. Farmed wild boars exposed to *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. **Veterinary Parasitology**, v.187, p. 323– 327. 2012.

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.

KEAN, B. H.; KIMBALL, A. C.; CHRISTENSON, W. N. An epidemic of acute toxoplasmosis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 208, n. 6, p. 1002–1004, 1969.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A.L.; RIZZO, L.V.; BELFORT R JR.; VITOR, R.W.A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L.D. Genetic Divergence of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Ocular Toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, n. 6, 2006.

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.

KLUN, I.; VUJANIĆ, M.; YEAR, H.; NIKOLIĆ, A.; IVOVIĆ, V.; BOBIĆ, B.; BRADONJIĆ, S.; DUPOUY-CAMET, J.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. **Veterinary Research**, v. 42, n. 17, 2011.

LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**. v. 12, n. 3, p. 292–300, 2010.

LASS, A.; PIETKIEWICZ, H.; MODZELEWSKA, E.; DUMÈTRE, A.; SZOSTAKOWSKA, B.; MYJAK, P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods. **European Journal of clinical microbiology and infectious diseases**. v. 28, p. 599–605. 2009.

LASS, A.; PIETKIEWICZ, H.; SZOSTAKOWSKA, B.; MYJAK, P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. **European Journal of clinical microbiology and infectious diseases**. September 25, 2011.

LEAL, F.E.; CAVAZZANA, C.L.; DE ANDRADE, H. F. Jr.; GALISTESO, A.J.Jr.; DE MENDOÇA, J.S.; KALLAS, E.G. *Toxoplasma gondii* Pneumonia in Immunocompetent Subjects: Case Report and Review. **Clinical Infectious Diseases**. v. 44, p. e62–e66, 2007.

LEHMANN, T.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.R.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infect. Genet. Evol.* 4, 107–114, 2004.

LIN, Y.; LIAO, Y.; LIAO, L.; CHEN, F.; KUO, H.; HE, S. Seroprevalence and sources of *Toxoplasma* infection among indigenous and immigrant pregnant women in Taiwan. **Parasitology Research**. v. 103, n. 1, p. 67–74, 2008.

LIU, X.; LIU, C.; LIU, Y.; JIN, H.; ZHAO, Y.; CHEN, J.; YANG, M.; LIU, Q. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Slaughtered Pigs and Cattle in Liaoning Province, Northeastern China. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 2, p. 440-441, 2012.

LOPES, A.P.; DUBEY, J.P.; O NETO, F.; RODRIGUES, A.; MARTINS, T.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 266– 269, 2013.

LUCIANO, D.M.; MENEZES, R.C.; FERREIRA, L.C.; NICOLAU, J.L.; DAS NEVES, L. B.; LUCIANO, R.M.; DAHROUG, M.A.A.; AMENDOEIRA, M.R.R. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, Jaboticabal, v. 20, n. 4, p. 351-353, out.-dez. 2011.

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

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.

MARTINA, M.N.; CERVERA, C.; ESFORZADO, N.; LINARES, L.; TORREGROSA, V.; SANCLEMENTE, G.; HOYO, I.; COFAN, F.; OPPENHEIMER, F.; MIRO, J.M.; CAMPISTOL, J.M.; MORENO, A. *Toxoplasma gondii* primary infection in renal transplant recipients. Two case reports and literature review. **Transplant International**, 24, p e6-e12, 2011.

MASUR, H.; JONES, T.C.; LEMPERT, J.A.; CHERUBINI, T.D. Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. **The American Journal of Medicine**, v. 64, p. 396–402, 1978.

MATSUO, K.; KAMAI, R.; UETSU, H.; GOTO, H.; TAKASHIMA, Y.; NAGAMUNE, K. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan. **Parasitology International**, v. 63, p. 638–639, 2014.

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

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.

MUÑOZ-ZANZI, C.; TAMAYO, R.; BALBOA, J.; HILL, D. Detection of Oocyst-Associated Toxoplasmosis in Swine from Southern Chile. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, p. 389–392, 2012.

NICOLLE, MM. C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Archives de L' Institut 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.

ORTEGA-PACHECO, A.; ACOSTA VIANA, K.Y.; GUZMÁN-MARÍN, E.; SEGURA-CORREA, J.C.; ÁLVAREZ-FLEITES, M.; JIMÉNEZ-COELLO, M. Prevalence and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* in Fattening Pigs Farm from Yucatan, Mexico. **BioMed Research International**, Article ID 231497, 6 pages, 2013.

PAȘTIU, A.I.; GYÖRKE, A.; BLAGA, R.; MIRCEAN, V.; ROSENTHAL, B.M.; COZMA, V. In Romania, exposure to *Toxoplasma gondii* occurs twice as often in swine raised for familial consumption as in hunted wild boar, but occurs rarely, if ever, among fattening pigs raised in confinement. *Parasitology Research*, v. 112, p. 2403–2407, 2013.

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

PEREIRA, M. G. Amostras de conveniência. In: Pereira, M. G. **Epidemiologia teoria e prática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 16, 1995.

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.

RAJENDRAN, C.; SU, C.; DUBEY, J.P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 359–368, 2012.

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

SAMICO FERNANDES, E.F.T.; SAMICO FERNANDES, M.F.T.; KIM, P.C.P.; DE ALBUQUERQUE, P.P.F.; DE SOUSA NETO, O.L.; SANTOS, A.DE S.; DE MORAES, E.P.B.X.; DE MORAIS, E.G.F.; RINALDO A. MOTA, R.A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Slaughtered Pigs in the State of Pernambuco, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 690-691, 2012.

SCHAFFNER, A. Pretransplant evaluation for infections in donors and recipients of solid organs. **Clinical Infectious Diseases**, 33 (Suppl. 1), p. S9–S14, 2001.

SILVA, B.; SADOVSKY, A.; BARCELOS, A.; DE PAULA, B.; Uma revisão sistemática sobre as formas de infecção pelo *Toxoplasma gondii*. **Natureza on line**, v. 5, n. 2, p. 63-67, 2007.

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

SPLENDRE, A. Sopra um nuovo protozoo parasito. **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.

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

TAO, Q.; WANG, Z.; FENG, H.; FANG, R.; NIE, H.; HU, M.; ZHOU, Y.; ZHAO, J.; Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection on Pig Farms in Central China. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 2, p. :262-264, 2011.

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.

THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Taxonomy. Disponível em: <http://www.ncbi.nih.gov/guide>. Acesso em: 30 de Outubro 2014.

THOMPSON, R.C.A.; KUTZ, S. J.; SMITH, A. Parasite Zoonoses and Wildlife: Emerging Issues. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, p. 678-693, 2009

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.

VAN LOO, E.J.; ALALI, W.; RICKE, S.C. Food Safety and Organic Meats. **The Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 7, p. 1-7, 2012.

VAUDAUX, J.D.; MUCCIOLI, C.; JAMES, E.R.; SILVEIRA, C.; MAGARGAL, S.L.; JUNG, C.; DUBEY, J.P.; JONES, J.L.; DOYMAZ, M.Z.; BRUCKNER, D.A.; BELFORT R. JR. HOLLAND, G.N.; GRIGG, M.E. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 8, p. 1226-33. 2010.

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.

WANG, H.; WANG, T.; LUO, Q.; HUO, X.; WANG, L.; LIU, T.; XU, X.; WANG, Y.; LU, F.; LUN, Z.; YU, L.; SHEN, J. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 393–397. 2012.

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

WU, S.M.; CIREN, D.; HUANG, S.Y.; XU, M.J.; GA, G.; YAN, C.; MAHMOUD, M.S.; FENG-CAI ZOU, F.C.; XING-QUAN ZHU, X.Q. First Report of *Toxoplasma gondii* Prevalence in Tibetan Pigs in Tibet, China. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 12, n. 8, 2012.

WU, D.; LV, R.; SUN, X.; SHU, F.; ZHOU, Z.; NIE, K.; DUAN, G.; ZOU, F. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from slaughter pigs in Chongqing, China. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, p. 685–687, 2012.

XU, Y.; LI, R.; LIU, G.; CONG, W.; ZHANG, X.; YU, X.; ZHU, X. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Sows in Hunan Province, China. **Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal**, Article ID 347908, 4 pages, 2014.

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.

YU, H.; ZHANG, Z.; LIU, Z.; QU, D.; ZHANG, D.; ZHANG, H.; ZHOU, Q.; DU, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Pigs, in Zhejiang Province, China. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 748-749, 2011.