

MICHELLE FEDERLE

**VIABILIDADE DE *Toxoplasma gondii* EM CARNE OVINA APÓS
TRATAMENTOS TÉRMICOS COM DIFERENTES
TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Pereira de Souza

**LAGES - SC
2015**

F293v Federle, Michelle
Viabilidade de *Toxoplasma gondii* em carne ovina após
tratamentos térmicos com diferentes temperaturas
/ Michelle Federle. – Lages, 2015.
71 p.: il.; 21 cm

Orientador: Antonio Pereira de Souza

Bibliografia: p. 62-69

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Ovino. 3. Carne. 4. Tratamento
térmico. 5. Cisto. I. Federle, Michelle. II. Souza, Antonio Pereira
de. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: 636.3 – 20.ed.

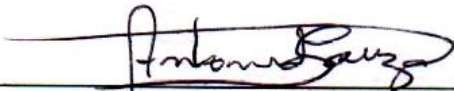
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do CAV/ UDESC

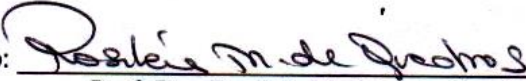
MICHELLE FEDERLE


**VIABILIDADE DE *Toxoplasma gondii* EM CARNE OVINA APÓS
TRATAMENTOS TÉRMICOS COM DIFERENTES
TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: 
Prof. Dr. Antonio Pereira de Souza
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: 
Prof. Dra. Rosileia Marinho de Quadros
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: 
Prof. Dra. Viviane Milczewski
Instituto Federal Catarinense

Suplente: 
Médica Veterinária Dra. Cristina Perito Cardoso
Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
CIDASC

Lages SC, 24/02/2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir mais esta conquista em minha vida. A quem me deu a vida, me apoiam e me amam, meus pais Iraci e Delcio, pessoas humildes, mas com um coração gigante, amo vocês.

Aos meus quatro irmãos: Everaldo, Clodoaldo, Luciane e Rosane, por tudo que fizeram e tem feito por mim. Uma pessoa com irmão é mais completa, e Deus me permitiu ter quatro, os melhores deste mundo. Amo eternamente cada um, e obrigada por terem me dado além da irmandade, meus sobrinhos lindos que amo de paixão, Everaldo Junior, Enrique e Enzo.

Ao meu namorado, Cesar Augusto, muito obrigada por tudo. Desde o início do mestrado junto comigo, me apoiando, tendo paciência, me erguendo quando por ventura ficava triste... Sem você ao meu lado, esta trajetória seria mais árdua, obrigada pelo ombro amigo sempre que precisei. Amo você.

A uma amiga, que ganhei de presente quando entrei para o mestrado, mas que será para sempre, Renata Ossani, obrigada por toda a ajuda, sem você, teria sido muito difícil, obrigada pela amizade, e pelas horas de trabalho, sucesso na sua vida.

Paulo Henrique, a quem me estendeu a mão sempre que precisei, e me ajudou a desenvolver o projeto. Juliana, Márcia, Bruna Silva, Rozyanne, Nádia e tantas outras, obrigada por tudo, pela ajuda, palavras de apoio, conversas, festinhas, vocês merecem tudo de bom neste mundo.

Ao meu orientador, professor Antonio, obrigada pela orientação, e por ter me passado tanta sabedoria.

Abrigada a UDESC/CAV por permitir que eu conseguisse subir mais este degrau, e a CAPES, pela ajuda financeira.

Agradecimento especial aos animais do experimento.

“As tristezas não foram feitas para os animais, mas para os homens; mas se os homens as sentem muito, tornam-se animais.”

(Miguel de Cervantes)

RESUMO

FEDERLE, Michelle. **Viabilidade de *Toxoplasma gondii* em carne ovina após tratamentos térmicos com diferentes temperaturas.** 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

Parasito intracelular obrigatório de animais homeotérmicos, o *Toxoplasma gondii* esta distribuído amplamente pelo mundo, e somente nos Felídeos realiza a reprodução sexuada. Nos ovinos causa prejuízos econômicos, principalmente devido ao aborto. As formas de contaminação são por oocistos em água ou alimentos, cistos teciduais em vísceras e tecidos, por taquizoítos em fluidos e congenitamente. A transmissão do parasito pelo consumo de carne crua é umas das mais importantes, sendo assim, utilizou-se um cordeiro, infectado naturalmente, com titulação de anticorpos de 1:256, avaliada pelo teste de RIFI. Este animal foi abatido conforme a legislação e após abate foram coletadas amostras de cérebro, diafragma, fígado e coração para exame histopatológico e para PCR, e coletado aproximadamente 50g dos cortes da paleta, costela e pernil e 16g do coração sendo esta a coleta “in natura” (T0), para realização do bioensaio em camundongos e PCR. Após a primeira coleta, a carcaça foi encaminhada a refrigeração, permanecendo inteira na câmara de resfriamento a 7°C por 24h, juntamente com o coração. Após este período, nova coleta foi realizada (T1), assim como descrito e foram divididos os cortes e estes passaram para o congelamento a -10°C, e as coletas foram realizadas com 12h (T2), 60h (T3) e 120h (T4) nesta temperatura. Em cada tempo de tratamento, as

amostras coletadas passaram pela digestão péptica e inoculadas em dois camundongos por amostra, o restante da digestão, era utilizada para PCR. Os camundongos foram eutanasiados com oito semanas e seus órgãos como pulmão, coração, fígado, baço, rins e amostra de tecido muscular esquelético da coxa foram coletados para histopatológico, já o cérebro era coletado para PCR e para técnica de “squash”. Sangue dos camundongos foram coletados para realização do teste de RIFI. Na PCR das amostras oriundas do ovino, o cérebro e amostra do corte da costela “in natura” (T0) foram positivas, já na PCR do cérebro dos camundongos, somente o animal inoculado com amostra do corte da paleta “in natura” (T0) foi positivo. Após a realização da PCR, as amostras positivas foram sequenciadas, que demonstrou mais de 97% de identidade com o *T. gondii*. Na técnica do “squash”, o camundongo inoculado com o corte da costela após o resfriamento a 7°C por 24h (T1) apresentou cisto cerebral. Na RIFI do soro dos camundongos, um animal inoculado com o corte da costela “in natura” (T0) e um com a costela após o resfriamento a 7°C por 24h (T1) apresentaram titulação 1:64, os demais negativos. No exame histopatológico dos órgãos do ovino e dos camundongos, somente o camundongo inoculado com o corte da costela após o resfriamento a 7°C por 24h (T1) apresentou cisto, sendo estes presentes no coração, pulmão e tecido muscular da coxa. O consumo de carne ovina, “in natura” e após o resfriamento é passível de transmissão para quem a consumir. Portanto, somente o resfriamento de cortes comerciais desta espécie não inviabiliza o parasito.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Ovino. Carne. Tratamento térmico. Cisto.

ABSTRACT

FEDERLE, Michelle. *Toxoplasma gondii* **feasibility in lamb meat after thermal treatments at different temperatures**. 2015. 71 f. Dissertation (Master of Animal Science) - University of the State of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2015.

An obligatory intracellular parasite of warm-blooded animals, *Toxoplasma gondii* is widely distributed around the world, and only in the feline species it performs sexual reproduction. In sheep it brings economic losses, mainly due to abortion. Contamination ways are from oocysts in water or food, tissue and visceral cysts, by tachyzoites in fluids and congenitally. The most important parasite transmission occurs through raw meat consumption, so we used a lamb, naturally infected with antibody titer of 1: 256 as measured by IFA test. This animal was slaughtered according to the law and after slaughter brain, diaphragm, liver and heart samples were collected for histopathology and PCR, and it was collected approximately 50g of shoulder, rib and leg cuts and 16g of heart was an "in natura " collection (T0), for bioassay in mice and PCR. After the first collection, the carcass was kept cooling down, remaining whole in the cooling chamber at 7°C for 24 hours, along with the heart. After this period, a second test was performed (T1), as previously described and the cuts were divided and they went to freezing at -10°C, samples were taken with 12 hours (T2), 60h (T3) and 120h (T4) at this temperature. In each treatment period, the collected samples went through peptic digestion and were inoculated in two mice per sample, the rest of the digestion was used for PCR. The mice were sacrificed at eight weeks and their organs like lungs, heart, liver, spleen, kidney and skeletal muscle tissue sample from the

thigh were collected for histopathology, since the brain was collected for PCR and "squash" technique. Blood of mice was collected to perform the IFA test. PCR of samples derived from the sheep, the brain and rib cut sample "in natura" (T0) were positive, as in the PCR of the mice brain, only the inoculated animal with shoulder cutting sample "in natura" (T0) was positive. After completion of the PCR, positive samples were sequenced, which showed over 97% identity with *T. gondii*. In "squash" technique the mice inoculated with the ribs cutting after cooling at 7°C for 24 hours (T1) presented brain cyst. IFA in mice serum, an animal inoculated with the rib cut "in natura" (T0) and one with rib after cooling at 7°C for 24 hours (T1) presented titration 1:64, the others were negative. In histopathological examination of sheep and mice organs, only the inoculated mice with the rib cut after cooling at 7°C for 24 hours (T1) presented cysts, which were present in the heart, lung and muscle tissue of the thigh. The lamb consumption "in natura" and after cooling is capable of transmission to those who consume. Therefore, only the cooling down of commercial cuts of this kind does not undermine the parasite.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Lamb. Meat. Thermal treatment. Cyst.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Visualização das bandas (340 pb) de DNA de *Toxoplasma gondii* em amostras de tecido e vísceras de ovino com titulação de 1:256 e de camundongo inoculado com tecido ovino [1 = padrão de molecular (100bp); 2 = amostra positiva de cérebro do ovino; 3 = amostra positiva do corte da costela (T0); 4 = amostra positiva de cérebro de camundongo inoculado com o corte da paleta (T2); 5 = controle positivo (cepa VEG de *T. gondii*)]......49

Figura 2 - Cisto tecidual de *Toxoplasma gondii* em tecido cerebral de camundongo inoculado com tecido muscular proveniente do corte da costela resfriada a 7°C por 24h de ovino com sorologia positiva para *T. gondii*. Técnica “squash”. Aumento de 400x.....54

Figura 3 - Resultado do exame histopatológico, mostrando cisto tecidual de *Toxoplasma gondii* em pulmão, proveniente do camundongo inoculado com o corte da costela resfriada a 7°C por 24h de ovino positivo sorologicamente. **A** – Cisto com aproximadamente 20µm x 18µm (seta branca). **B** – Cisto com aproximadamente 15µm x 15µm (seta branca) e cisto rompido (seta preta). H. E. Aumento de 400x.....54

Figura 4 - Resultado do exame histopatológico, mostrando cisto tecidual de *Toxoplasma gondii* em coração (seta), proveniente do camundongo inoculado com o corte da costela resfriada a 7°C por 24h de ovino positivo sorologicamente. H. E. Aumento de 400x.....55

Figura 5 - Resultado do exame histopatológico, mostrando cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* em tecido muscular esquelético da coxa (setas), proveniente do camundongo inoculado com o corte da costela resfriada a 7°C por 24h de ovino positivo sorologicamente. H. E. Aumento de 400x.55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Fases e temperaturas utilizadas na Polymerase Chain Reaction – PCR..... 45
- Tabela 2** – Resultado da PCR de tecidos de ovino com titulação de 1:256 para *Toxoplasma gondii* submetidos à diferentes tratamentos térmicos..... 50
- Tabela 3** - Resultados da PCR e “squash” de cérebro de camundongos e do histopatológico do coração, pulmão, fígado, baço, rins e tecido esquelético da coxa de camundongos inoculados com tecido muscular esquelético, cardíaco e cerebral de ovino com sorologia positiva para *Toxoplasma gondii* submetidos a diferentes tratamentos térmicos 52

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HCl	Ácido Clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
MAT	Microscopic Agglutination Test
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
Ng	Nanogramas
Pb	Pares de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium Dodecil Sulfate
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 O PARASITO <i>Toxoplasma gondii</i>	29
2.2 <i>Toxoplasma gondii</i> NOS SERES HUMANOS.....	32
2.3 FONTES DE INFECÇÃO DE <i>Toxoplasma gondii</i>	34
2.4 <i>Toxoplasma gondii</i> NOS OVINOS	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 GERAL.....	39
3.2 ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 COLETAS DAS AMOSTRAS	40
4.2 TRATAMENTOS TÉRMICOS DO CORAÇÃO E DOS CORTES DA PALETA, COSTELA E PERNIL.....	40
4.3 DIGESTÃO PÉPTICA DAS AMOSTRAS	41
4.4 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS.....	42
4.5 DETECÇÃO DO <i>Toxoplasma gondii</i> PELA TÉCNICA DA PCR EM AMOSTRAS MUSCULARES E VÍSCERAS DO OVINO “IN NATURA” E APÓS O RESFRIAMENTO E O CONGELAMENTO.....	43
4.6 DETECÇÃO DO <i>Toxoplasma gondii</i> EM AMOSTRAS DE TECIDO CEREBRAL DOS CAMUNDONGOS PELA TÉCNICA DA PCR.....	46
4.7 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Toxoplasma gondii</i> PELA PCR	47
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	61
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um coccídeo distribuído amplamente pelo mundo e a doença por ele causada encontra-se na lista das mais importantes transmitidas por alimentos. Os ovinos, assim como suínos, caprinos e outros animais são fontes importantes de transmissão deste parasito para os seres humanos, através do consumo de carnes e vísceras contaminadas. A toxoplasmose é considerada a principal causa de mortes atribuídas a doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos. Mais de 60 milhões de pessoas nesse país podem estar infectados com o parasito, mas poucas têm sintomas porque o sistema imunológico é eficaz no seu combate (CDC, 2013).

Embora o potencial de transmissão do parasito para os seres humanos através dos alimentos seja conhecido há décadas, não se sabe quais são as mais importantes vias de transmissão do ponto de vista da saúde pública, pois há também a influência pela cultura e variação individual (TENTER, 2009).

O total do rebanho ovino no Brasil é de 17.380.581 animais, sendo que em Santa Catarina o rebanho é de 293.349 cabeças, ficando na 12^a posição nacional na produção desta espécie (IBGE, 2010). Segundo a FAO (2014) o consumo de carne ovina em 2012 foi de 13,7 milhões de toneladas no mundo, isso mostra a importância deste estudo, pois esta espécie possui grande potencial de transmissão do parasito através da carne e leite. Nos ovinos, representa uma doença importante no rebanho, visto que é causador de aborto, provocando prejuízos econômicos representativos.

Sabe-se que a carne crua sem tratamento térmico adequado é capaz de transmitir o parasito e causar doença nos seres humanos, como já demonstrados em trabalhos como de Bonametti et al. (1997) com carne ovina e Choi et al. (1997)

com carne suína, reforça-se a importância de estudar a possibilidade de transmissão deste protozoário após tratamento pelo frio, preconizado pela legislação e utilizado nas indústrias de carnes. Além do abate industrial, há abates clandestinos ou para consumo próprio, o que justifica a importância de estudar a presença e viabilidade do *T. gondii* na carne de ovinos naturalmente infectados, para orientar os consumidores sobre a prevenção e riscos da infecção por este parasito.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O PARASITO *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um coccídeo intracelular obrigatório e somente nos Felídeos realiza a reprodução sexuada. Estes animais também servem como hospedeiros intermediários para o parasito, assim como os seres humanos e demais animais homeotérmicos. O parasito pertence ao Filo Apicomplexa (LEVINE, 1970), Classe Sporozoasida (LEUKART, 1879), Subclasse Coccidiasina (LEUKART, 1879), Ordem Eimeriorina (LEGER, 1911), e Família Toxoplasmatidae (BIOCCA, 1956), gênero *Toxoplasma* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) com uma espécie, o *T. gondii*. Nicolle e Manceaux em 1908, no Norte da África, observaram a presença de um parasito intracelular no baço e fígado de um roedor chamado *Ctenodactylus gundi*, que denominaram de *Leishmania gondii*. No mesmo ano no Brasil, Splendore encontrou o mesmo parasito no coelho, comparando-o ao agente da leishmaniose visceral. Porém, em 1909, os primeiros autores constataram que se tratava de um novo parasito, criando o gênero *Toxoplasma* e a espécie, o *T. gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

Existem três fases infecciosas conhecidas do *T. gondii*: os taquizoítos, os bradizoítos em cistos teciduais e os esporozoítos nos oocistos. Os taquizoítos (*tachis*, do grego, rápido), compreendem a fase de multiplicação rápida e ocorre em qualquer célula do hospedeiro intermediário. Possui no geral forma de crescente, medindo cerca de 2x6mm, com uma extremidade anterior pontiaguda e uma extremidade posterior arredondada. Os taquizoítos se deslocam por deslizamento, por ondulamento, flexionando-se e girando, e não possuem estruturas visíveis de locomoção como cílios, flagelos ou pseudópodes (DUBEY, et al., 1998).

O termo bradizoóito (*brady*, do grego, lento) foi dado por FRENKEL (1973), para descrever o protozoário multiplicando-se lentamente dentro de um cisto tecidual ou visceral. Os cistos cerebrais possuem forma esférica e podem alcançar 70µm, já os cistos musculares podem atingir 100µm e são alongados (DUBEY et al., 1998). Dubey (1986) citou que os cistos são mais prevalentes nos tecidos neurais e musculares, incluindo o cérebro, os olhos e músculos esqueléticos e cardíacos. Cistos teciduais intactos podem não causar nenhum dano e persistir por toda a vida no hospedeiro, em estado de latência. Porém, em estudos posteriores realizados por Russel et al. (2002) demonstram que, dependendo do estado imunológico do hospedeiro, poderá ocorrer a retro-conversão de bradizoóitos em taquizoóitos, fazendo com que o hospedeiro volte a manifestar a fase aguda da doença. Posteriormente, assim que o estado imunológico se reestabelecer o hospedeiro pode adquirir novos cistos teciduais em outros órgãos além dos já existentes. Di Cristina, et al. (2008) citaram que entre as condições que podem desencadear a toxoplasmose tem-se as doenças infecciosas, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, tratamento com imunossupressores e agentes quimioterápicos.

Após a ingestão de tecidos ou órgãos contendo cistos teciduais do *T. gondii*, os bradizoóitos são liberados após os cistos serem expostos as condições ácidas do estômago. Os bradizoóitos liberados penetram na mucosa do intestino delgado e começam a multiplicação assexuada no interior das células da lâmina própria. Os bradizoóitos se convertem para taquizoóitos e são disseminados pelo corpo através dos sistemas linfático e vascular. Os taquizoóitos ao chegarem aos tecidos se transformam em bradizoóitos, formando os cistos teciduais que é uma forma de se proteger do sistema imune do hospedeiro. Estes cistos teciduais permanecem viáveis por meses a anos no animal ou ser humano infectado. Se a contaminação ocorrer por ingestão de oocistos esporulados, os esporozoóitos liberados

dos oocistos no duodeno penetram na mucosa do intestino delgado e começam a multiplicação dos taquizoítos, disseminam-se pelos sistemas linfático e vascular e resultam na formação de cistos teciduais (LINDSAY et al., 1995; DI CRISTINA, et al., 2008).

A parede do cisto torna-se uma barreira aos medicamentos usados no tratamento da toxoplasmose, tais como a pirimetamina e a sulfadiazina. Di Cristina et al. (2008) realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar a cinética de transformação dos taquizoítos em bradizoítos. Infectaram ratos com taquizoítos e estes foram monitorados e administrados D-luciferina para avaliar a emissão de fótons pelos bradizoítos e coelenterazina para detectar a atividade do taquizoíto. No primeiro dia após a infecção, observaram uma transformação maciça dos taquizoítos em bradizoítos. Pelo monitoramento da formação de cistos “in vivo” verificaram que o cérebro foi o principal órgão envolvido.

Nos Felídeos ocorre o ciclo enteroepitelial, nas células do intestino delgado e dentre esses, os gatos domésticos produzem um maior número de oocistos (LINDSAY et al., 1995). As células epiteliais são infectadas com taquizoítos ou bradizoítos presentes no tecido infectado ingerido ou por esporozoítos eliminado pelas fezes de outros felinos. A esquizogonia demora de 3 a 15 dias, e dão origem aos gametas. Os gametas após a fertilização tornam-se zigotos e em seguida oocistos imaturos. Os oocistos são expelidos no lúmen intestinal e para o meio ambiente através das fezes. As fezes de um gato doméstico podem conter em torno de 10 milhões de oocistos no pico de eliminação, durando até 15 dias a eliminação dos mesmos no ambiente (DUBEY, et al., 1998). A esporogonia e a maturação dos oocistos podem demorar de 1-5 dias, ocorrendo apenas no meio ambiente, e contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos infectantes em cada (CENCI-GOGA, et al., 2011). Devido a sua resistência aos

agentes químicos e físicos, os oocistos mantêm-se viáveis durante meses ou anos (FRENKEL, 1990).

O tempo necessário antes da excreção dos oocistos varia de acordo com a fase do *Toxoplasma* que é ingerido pelo gato. A inoculação oral de bradizoítos através de cistos teciduais é mais eficiente na indução da produção de oocistos nos gatos, com 97% excretando oocistos com um período pré-patente curto de 3-6 dias. A inoculação oral de taquizoítos ou oocistos é menos eficiente e produz a excreção de oocistos em apenas 16% e 20% dos gatos, respectivamente, com período pré-patente de 21-40 dias (LINDSAY et al., 1995).

Não se sabe ainda qual a via de transmissão é a mais importante do *T. gondii* para os animais e os seres humanos, porém, o ciclo pode se perpetuar somente entre os hospedeiros intermediários, ou somente entre os hospedeiros definitivos (DUBEY, et al., 1998).

Através de genotipagens das populações de *T. gondii* foi demonstrado uma população clonal com três linhagens principais relacionadas com a virulência em camundongos (tipo I, II e III). As cepas da América do Sul são geneticamente mais diversificadas e compreendem genótipos diferentes. Essas diferenças foram moldadas por recombinação sexual frequente e diversos genótipos do *T. gondii* são associados com infecções graves em seres humanos na América do Sul (BECK et al., 2009). O tipo I como sendo altamente virulenta e os tipos II e III consideradas não patogênicas. Diferentes graus de virulência em ratos foram observados em diferentes grupos clonais descritos no Brasil. O tipo BrI descrito como altamente virulento, tipo BrIII como não virulento, enquanto os tipo BRII e BRIV foram medianamente virulentos (PENA et al., 2008).

2.2 *Toxoplasma gondii* NOS SERES HUMANOS

A infecção pelo protozoário *T. gondii* é amplamente distribuída entre os seres humanos e animais no mundo todo.

Em pacientes imunodeprimidos por fármacos, ou em pessoas com AIDS, o *T. gondii* emerge como o oportunista mais comum (DUBEY et al., 1998).

Um terço da população mundial está infectado com o parasito e cálculos da doença a classificam no mesmo nível da salmonelose ou da campilobacteriose entre as doenças de origem alimentar (KIJLSTRA; JONGERT, 2008). Em uma avaliação das doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos da América, Jones; Dubey (2012) identificaram a toxoplasmose como a segunda principal causa de mortes e a quarta em hospitalizações relacionadas com doenças transmitidas por alimentos.

Nos Estados Unidos da América, no Serviço de Pesquisa Econômica do Departamento de Agricultura, foi estimado o custo total da doença no País de mais de 3 bilhões de dólares no ano de 2013, e as estimativas do custo de doenças transmitidas por alimentos para *T. gondii* foi de quase 2 bilhões de dólares para o mesmo ano (USDA; ERS, 2014). Estes dados demonstram que a toxoplasmose de origem alimentar pode ser o grande vilão na disseminação da doença.

A toxoplasmose congênita nos humanos varia de formas subclínicas a formas graves, levando à morte fetal ou neonatal. Nestes casos, o sistema nervoso central e os olhos são os mais afetados, enquanto que outros órgãos tais como o fígado, baço, rins e pulmões são menos envolvidos. A infecção nos primeiros estágios de gravidez pode ocasionar aborto, morte fetal ou graves danos, como retinocoroidite, calcificação endocranial, hidrocefalia e microcefalia (JONES et al., 2009). Nas fases mais avançadas da gravidez a infecção pelo *T. gondii* geralmente é subclínica, porém pode ocasionar retinocoroidite e distúrbios neurológicos (CENCI-GOGA, et al., 2011). Contudo, a toxoplasmose ocular pode ser um resultado de uma infecção pré-natal ou de uma infecção que foi adquirida após o nascimento. (TENTER et al., 2000).

Cenci-Goga et al. (2011) relataram que a manifestação clínica clássica da toxoplasmose - retinocoroidite, calcificação intracraniana, hidrocefalia e anormalidades do sistema nervoso central - encontra-se em 5 % dos recém-nascidos infectados. Ao passar dos anos, no entanto, a doença pode ser reativada devido à persistência de cistos teciduais.

Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção pelo *T. gondii* geralmente resulta em imunidade vitalícia contra a toxoplasmose. Com isso, se uma infecção primária por *T. gondii* é adquirido quatro meses antes da concepção ou mais cedo, a imunidade protetora irá impedir a transmissão vertical para o feto em exposições subsequentes. A exceção é vista em mulheres imunocomprometidas, onde as soropositivas para o vírus da AIDS têm transmitido o *T. gondii* congenitamente (TENTER et al., 2000).

2.3 FONTES DE INFECÇÃO DE *Toxoplasma gondii*

Os seres humanos se infectam de três maneiras principais: ingerindo cistos teciduais contendo bradizoítos de *T. gondii* na carne ou vísceras cruas ou com tratamentos térmicos ineficientes, oocistos provenientes das fezes de felinos presentes nos alimentos e água ou congenitamente onde alguns taquizoítos passam para o feto durante a primoinfecção da mãe (DUBEY et al., 1990; 2005). A proporção das pessoas que se contaminam ingerindo oocistos provenientes do ambiente ou ingerindo carne contaminada não é conhecida (DUBEY, 2005).

Não há nenhum teste para distinguir infecções de oocistos em oposição a cistos teciduais. Assim, estudos epidemiológicos continuam sendo a forma mais útil de avaliar a importância das diferentes fontes de *T. gondii* em infecção nos seres humanos. Esta abordagem não é tão eficaz quando os indivíduos estão cronicamente infectados, pois as infecções podem ter ocorrido muitos anos antes (DUBEY, 2000).

A infecção por *T. gondii* em galinhas caipiras é considerada importante e um dos melhores indicadores de contaminação do solo com oocistos de *T. gondii*, porque esse grupo de animais se alimenta a partir do solo. Além disso, a ingestão de carne de frangos infectados pode ser uma fonte de infecção deste protozoário para os seres humanos e outros animais (DUBEY, 2010).

O consumo de carne mal cozida é considerado um importante fator de risco e, na Europa, está relacionado com 30-63% das infecções. Na França este fator é provavelmente maior do que em outros países devido a um hábito tradicional do consumo de carne mal cozida (HALOS, et al., 2010), assim como o consumo de quibe cru, por países como o Líbano (DE SILVA et al., 1984). Grupos de profissionais como funcionários de matadouros e caçadores também podem ser infectados durante a evisceração e manipulação da carne (TENTER, 2009).

Nos Estados Unidos, um surto envolvendo 37 pessoas que frequentavam um estábulo foi registrado por Teutsch et al. (1979). Neste surto, as pessoas apresentaram sintomatologia característica da toxoplasmose ou anticorpos na RIFI. Além disso, o parasito foi isolado de tecidos de cinco de sete gatos e de quatro roedores capturados no local. Dados epidemiológicos apontaram os gatos infectados como a fonte da infecção. Os oocistos lançados ao solo foram transmitidos pela via aerógena ou pela contaminação das mãos e posterior ingestão.

Sacks et al. (1982) relataram um surto de toxoplasmose aguda ocorrido nos Estados Unidos em uma família de vinte e quatro pessoas, destas, dez apresentaram sorologia aguda para o *T. gondii* pela RIFI, nove eram assintomáticas e uma apresentou coriorretinite. Todas as dez pessoas soropositivas tinham ingerido recentemente leite cru de cabra do rebanho da família.

Na Austrália um surto de toxoplasmose em cinco pessoas da mesma família, libanesa, pela ingestão de quibe foi

relatado. A tradição de pessoas deste País é a ingestão de quibe, feita com carne crua de ovelha, o que provavelmente resultou no surto registrado (DE SILVA, et al., 1984).

No Canadá, houve um surto de toxoplasmose congênita associada com frequente consumo de carne de caribus em um assentamento. Neste mesmo local, a soropositividade contra o *T. gondii* em gestantes foi associada com o consumo de carne seca, fígado e carne crua de caribus (McDONALD, et al., 1990). Sendo assim, carne e vísceras de nenhum animal devem ser consumidos crus ou sem tratamento térmico eficiente. Estes trabalhos demonstram que a prevenção deve levar em conta a região e a cultura de cada lugar, para direcionar programas de controle e prevenção deste parasito.

Choi et al. (1997) relataram a ocorrência de dois surtos de toxoplasmose aguda envolvendo oito pacientes adultos na Coréia, e que estavam ligados ao fato de comer carne de porco crua. No primeiro surto, três pacientes desenvolveram coriorretinite unilateral dentro de três meses após comer uma refeição composta de baço e fígado crus de um porco selvagem. No segundo surto, cinco de onze pessoas que comeram uma refeição composta de fígado cru de um porco doméstico desenvolveram linfadenopatia.

Bonametti et al. (1997) relataram a ocorrência de 17 casos de toxoplasmose aguda em pessoas após a ingestão de carne de carneiro crua, na forma de quibe, no estado do Paraná, Brasil. Elas apresentaram perfil clínico e sorológico de toxoplasmose aguda e os sintomas mais frequentes foram febre, artralgia, mialgia, cefaléia e adenomegalia. Um paciente apresentou quadro clínico de coriorretinite.

Também no Paraná, no município de Santa Isabel do Ivaí, um surto de toxoplasmose através da água contaminada com oocistos foi relatado. Em um período de três meses, 426 pessoas apresentaram sorologia compatível com toxoplasmose aguda. O surto ocorreu em virtude da contaminação de um reservatório de água da cidade por oocistos em fezes de gatos

que habitavam o local. Oocistos de *T. gondii* também foram recuperados em uma caixa d'água de uma escola pública do município (FUNASA, 2002).

A ingestão de carne ovina infectada mal cozida e carnes curadas também são consideradas como potencialmente infectantes, já que foram relacionadas ao aparecimento de toxoplasmose aguda em gestantes (WARNEKULASURIYA et al., 1998).

Os taquizoítos são muito sensíveis às condições ambientais e geralmente são mortos rapidamente fora do hospedeiro. Portanto, as transmissões horizontais de infecções de *T. gondii* através de taquizoítos não são as vias mais importantes epidemiologicamente, porém, a transmissão pelo leite não pasteurizado já foi constatada (DEHKORDI et al., 2013). Os taquizoítos também foram isolados de ovos de galinha crus postos por galinhas com infecção experimental. Porém, como os taquizoítos são altamente susceptíveis ao aquecimento e a concentração de sal, qualquer tipo de cozedura mata os taquizoítos presente em ovos (TENTER et al., 2000).

Cistos teciduais de *T. gondii* em animais selvagens, incluindo lebres, javalis, veados e outros cervídeos, cangurus e ursos são outras fontes potenciais de infecção para os seres humanos (TENTER et al., 2000).

Em um estudo realizado com frutos do mar por Jones et al. (2009) relataram que comer ostras cruas ou mexilhões pode ser um novo fator de risco para infecções por *T. gondii*. Ostras, mariscos e mexilhões são filtradores que podem concentrar o parasito.

Uma alimentação segura baseada em carne pode ser obtida através de procedimentos para descontaminação da mesma. Atualmente, o congelamento pode ser a melhor opção, além do uso de novas tecnologias utilizando irradiação ou de alta pressão (KIJLSTRA; JONGERT, 2008).

2.4 *Toxoplasma gondii* NOS OVINOS

A prevalência do *T. gondii* em ovinos é variável conforme a região de estudo e é conhecido que o parasito causa abortos, mortalidade neonatal, reabsorção embrionária, morte fetal e mumificação (DUBEY et al., 2008). A gravidade da infecção está associada com a fase da prenhez em que a ovelha é infectada. Quanto mais cedo durante a gestação a fêmea se infectar, mais graves serão as consequências. Após a infecção com *T. gondii*, ovelhas desenvolvem resposta imune humoral e mediada por células contra o parasito que proporciona uma proteção eficaz contra a doença em gestações subsequentes (DUBEY, 2009). Os animais que sobrevivem às infecções congênitas crescem normalmente, sendo assim, tornam-se uma fonte de infecção para os seres humanos e para outros animais carnívoros (DUBEY et al., 2008).

A soroprevalência do *T. gondii* nos rebanhos ovinos do Brasil é diversificada. No Rio de Janeiro Leite et al. (2014) encontraram 53,3% de ovelhas positivas pelo teste MAT. Pelo teste de RIFI, Guimarães et al. (2013) no sul da Bahia encontraram 32,2% de positividade, assim como Sakata et al. (2012) encontrou 56,9% no município de Lages e Moura et al. (2007) relataram 7% no Paraná. Foi demonstrado que a soroprevalência aumenta com a idade, atingindo 95% em ovelhas de 6 anos de idade, em alguns rebanhos, sugerindo que a maioria das ovelhas adquirem a infecção após o nascimento (DUBEY, 2010).

O tecido muscular esquelético representa 50% do peso vivo de ovinos e é um componente importante do corpo dos animais e a principal fração comestível. Nessa espécie, o tecido muscular representa também 50% do peso da carcaça (ORDÓÑEZ PEREDA et al., 2005). Cistos teciduais do parasito foram encontrados em muitas partes comestíveis de ovelhas e estes animais soropositivos podem abrigar um grande número de cistos teciduais em sua carne (DUBEY, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Contribuir para melhor compreensão da presença e viabilidade do *T. gondii* em cortes comerciais de carne ovina “in natura”, resfriados e congelados.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a presença e viabilidade do *T. gondii* nas amostras de tecido muscular esquelético, cardíaco e cerebral “in natura” de ovino com sorologia positiva através da PCR e bioensaio em camundongos.

Avaliar pela técnica da PCR a presença do parasito no fígado e diafragma do ovino com sorologia positiva.

Verificar após o resfriamento por 24h a 7°C, ao congelamento a -10°C por 12h, 60h, e 120 horas a presença e viabilidade do parasito em amostras de tecido muscular esquelético e cardíaco de ovino com sorologia positiva através do bioensaio em camundongos e pela PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETAS DAS AMOSTRAS

Procedeu-se a coleta sanguínea de um rebanho de doze ovinos, todos entre seis e onze meses de idade, oriundos do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/UEDESC, criados em sistema semi-extensivo. O teste de RIFI foi realizado para detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii*, conforme técnica descrita por Camargo (1974). Uma fêmea de sete meses de idade, com titulação de 1:256 foi abatida em um frigorífico conforme as normas do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA.

Após o abate (T0), foram retiradas quatro amostras de tecido muscular de cada um dos cortes, paleta, costela e pernil, totalizando 50g totais de cada um. As amostras foram mantidas em recipientes estéreis individuais e identificadas, sendo transportadas em caixa de isopor com gelo reutilizável ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias – CAV/UEDESC para a digestão péptica. Do coração, cérebro, fígado e diafragma foram coletados duas amostras de cada: uma amostra de cada órgão ou tecido foi armazenada em recipiente estéril para bioensaio e PCR e a outra em formol 10% para exame histopatológico.

Após estas coletas, a carcaça foi destinada aos tratamentos térmicos, juntamente com o coração.

4.2 TRATAMENTOS TÉRMICOS DO CORAÇÃO E DOS CORTES DA PALETA, COSTELA E PERNIL

Em cada tempo de tratamento foi coletado 50g de tecido muscular de cada corte cárneo, em quatro alíquotas, retiradas da extremidade e do interior dos mesmos, assim como 16g do coração.

- Tratamento 0 (T0): coleta de amostras de carne e coração “in natura” logo após o abate.
- Tratamento 1 (T1): coleta das amostras após o resfriamento a 7°C por 24 horas. Após este período, foram separados os cortes das paletas, pescoço, costelas, carré e pernis e os cortes do estudo e o coração foram envoltos por filme plástico e levados à câmara de congelamento.
- Tratamento 2 (T2): coleta das amostras após o congelamento a -10°C por 12 horas.
- Tratamento 3 (T3): coleta das amostras após o congelamento a -10°C por 60 horas.
- Tratamento 4 (T4): coleta das amostras após o congelamento a -10°C por 120 horas

4.3 DIGESTÃO PÉPTICA DAS AMOSTRAS

A digestão péptica utilizada foi adaptada da descrita por Dubey (1998). Foram digeridas todas as amostras de tecidos muscular esquelético e cardíaco coletadas nos tratamentos e também o tecido cerebral do ovino.

A gordura e tecido conectivo foram retirados em cada coleta e as amostras musculares foram picadas e trituradas em triturador doméstico, sendo que a cada amostra, o triturador foi lavado com água quente a 40°C e detergente. Primeiramente as amostras foram homogeneizadas no triturador por 15 segundos na menor rotação do aparelho e após foi adicionado 125mL de solução fisiológica a 0,9% e misturada às amostras, na maior rotação durante 30 segundos. O triturador utilizado possuía cinco velocidades (1 a 5). Depois de misturadas, as amostras foram acondicionadas em um recipiente de vidro estéril, e ao triturador foi adicionado 125mL de solução fisiológica para limpeza do mesmo e então misturado às amostras já trituradas, totalizando 250mL.

Foi preparada uma solução de ácido clorídrico e pepsina a temperatura de 37°C que continha em 500mL de água

ultrapura, 7mL HCl a 37% CARLO ERBA®, 2,6g de pepsina 1:10000 VETEC®, 5,0g de NaCl (P.M. 58,44) BIOTEC®. Ao homogeneizado de tecido pré-aquecido a 37°C, foram adicionados 250mL da solução de ácido clorídrico e pepsina e incubada a 37°C em Shaker, com agitação durante 60 minutos. Após, as amostras foram filtradas em duas camadas de gaze estéreis para outro recipiente estéril e distribuído entre tubos cônicos de 50mL e centrifugados a 1200rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 20mL de PBS pH 7,2. O homogeneizado foi transferido para um único tubo e neutralizado com 15mL de solução de bicarbonato de sódio a 1,2% e pH 8,3. Foi realizada nova centrifugação a 1200rpm por 10 minutos e o sobrenadante resultante desprezado e ao sedimento adicionado 5mL de solução fisiológica a 0,9% contendo 1000U de penicilina e 100µg de estreptomicina por mL.

4.4 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

Para realização do bioensaio foram utilizados 42 camundongos albinos Swiss, ambos os sexos, com idade superior a dois meses, provenientes do Biotério do CAV/UDESC.

Após a digestão péptica das amostras de tecido muscular do pernil, costela, paleta e do coração em cada tempo de tratamento, assim como o cérebro, estas foram inoculadas por via intraperitoneal nos camundongos. Foram utilizados dois animais para cada amostra, inoculando 1mL em cada. O restante da digestão era congelado a -20°C até a realização da extração de DNA para a PCR.

Os camundongos inoculados permaneceram separados em caixas, de acordo com os tratamentos, “in natura”, resfriamento (7°C) por 24h, congelamento (-10°C) por 12h, 60h e 120h, sendo o máximo de dez camundongos por caixa, dois para cada corte muscular ou víscera, que foram avaliados

diariamente visando observar a manifestação de sinais clínicos de toxoplasmose aguda (apatia, anorexia, depressão, enoftalmia e pelos arrepiados).

Os camundongos que não apresentaram sinais clínicos da infecção aguda, ao completarem oito semanas pós-inoculação, foram eutanasiados. Amostras de diferentes órgãos dos camundongos (coração, pulmão, músculo esquelético, fígado, baço e rim), e tecido muscular da coxa foram coletadas e armazenadas em frascos com solução de formol a 10% e enviados para o Laboratório de Patologia Animal – CAV/UDESC para realização de exame histopatológico com coloração hematoxilina eosina (HE) para a pesquisa do agente. Destes animais também foi colhido sangue para obtenção do soro para posterior pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* pela RIFI. Fragmentos de cérebro (3 a 5 mm²) foram comprimidos entre lâmina e lamínula (squash) para a pesquisa de cistos. Amostras de tecido cerebral foram coletadas em microtubos e congeladas a -20°C para posterior extração de DNA e realização da PCR. Foram considerados infectados com *T. gondii* os camundongos nos quais estágios do parasito foram encontrados em seus tecidos ou aqueles positivos no teste de RIFI ($\geq 1:16$) (NAVARRO et al., 1992).

4.5 DETECÇÃO DO *Toxoplasma gondii* PELA TÉCNICA DA PCR EM AMOSTRAS MUSCULARES E VÍSCERAS DO OVINO “IN NATURA” E APÓS O RESFRIAMENTO E O CONGELAMENTO

As amostras de paleta, costela, pernil e do coração, após os tratamentos térmicos, e do cérebro, após a digestão péptica, foram submetidas à extração de DNA. As amostras do fígado e do diafragma, por não terem sido digeridas, foram expostas ao homogeneizador de tecidos para posterior extração do DNA. Foram utilizadas cinco amostras do fígado e quatro de diafragma de aproximadamente 600mg, e adicionado 500µL de

tampão TEN sem SDS (Tris HCl 20mM, EDTA 50mM, NaCl 200mM) em cada amostra, e submetidos ao homogeneizador de tecidos.

A extração de DNA foi adaptada da metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001). Das amostras, retirou-se 250µL e passado para outro tubo e, neste, FORAM adicionados 250µL de TEN (Tris HCl 20mM, EDTA 50mM, NaCl 200mM, SDS 1%), pH 8,0. Após, a esta mistura foRAM adicionado 25µL de proteinase K (20mg/mL). Esta mistura foi incubada em banho-maria a 42°C por 12 horas.

Após permanecerem incubando a 42°C, foram adicionados 500µL de fenol, realizada inversão dos tubos manualmente por 10 minutos e centrifugados a 12000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi passado para outro microtubo e o sedimento desprezado. Ao sobrenadante adicionou-se 250µL de fenol e 250µL de clorofórmio, invertendo os tubos por 10 minutos e centrifugados a 12000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente passado para outro microtubo e adicionado 500µL de clorofórmio e os tubos foram invertidos por 10 minutos e centrifugados a 12000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi passado para outro microtubo e adicionado 10% do volume presente de amostra de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 60% do total da amostra de isopropanolol gelado absoluto. Após, foram acondicionados a -20°C por 24 horas.

Após as 24h de congelamento, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14000rpm a 4°C. Todo o líquido resultante foi desprezado e adicionados 500µL de etanol gelado 70% e homogeneizadas levemente. As amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado, esta etapa foi repetida duas vezes. Após desprezar todo o líquido, o DNA foi seco a temperatura de 45°C, mode V-AL no equipamento eppendorf® Concentrator Plus.

Depois da secagem, foram adicionados 50µL de água ultrapura estéril em cada amostra para eluir o DNA e posterior verificação da quantidade de DNA presente na amostra no aparelho NanoDrop 2000® para realização da PCR. Na mensuração do DNA presente nas amostras, foi considerado o grau de pureza para as etapas seguintes, sempre observando a relação 260/280, e somente amostras com relação superior a 1,8 foram utilizadas. Os componentes da PCR foram:

- 1 µL DNA extraído
- 1 a 2U de Platinum Taq Invitrogen®
- 300µM de um mix de DNTP's
- 1,5mM de MgCl₂ 25mM Promega®
- 4,5 pmol de cada Primer
- Tampão 10 vezes Invitrogen®
- Água ultrapura estéril até completar 50µl totais no tubo
- Primer SAG2.F4
(59GCTACCTCGAACAGGAACAC39)
- Primer SAG2.R4
(59GCATCAACAGTCTTCGTTGC39)

A amplificação do DNA do parasito foi feita em 30 ciclos em um termociclador, usando as condições mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Fases e temperaturas utilizadas na Polymerase Chain Reaction - PCR

Fase	Tempo	Temperatura
1.Desnaturação inicial	5 minutos	95°C
2.Desnaturação	30 segundos	94°C
3.Anelamento	40 segundos	65°C
4.Extensão inicial	1 minuto	72°C
5.Ciclos (etapas 2 a 4)	30 ciclos	
6.Extensão final	10 minutos	72°C
7.Manutenção	∞	4°C

Os produtos da PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose padrão baixa eletroendosse (EEO) da Agargen® à 1,5% e fotodocumentados. Foi utilizado o DNA de taquizoítos da cepa VEG de *T. gondii* como controle positivo, e a mistura de todos os componentes citados, exceto o DNA como controle negativo da PCR (MOURA et al., 2011). Como marcador de peso molecular foi utilizado o de 100pb da Ludvig®. Os iniciadores selecionados SAG2.F4 (59GCTACCTCGAACAGGAACAC39) e SAG2.R4 (59GCATCAACAGTCTTCGTTGC39) amplificam separadamente as extremidades 59 e 39 do locus SAG2 do *T. gondii* com produtos de 340pb.

4.6 DETECÇÃO DO *Toxoplasma gondii* EM AMOSTRAS DE TECIDO CEREBRAL DOS CAMUNDONGOS PELA TÉCNICA DA PCR

Das amostras de tecido cerebral dos camundongos que estavam congeladas a -20°C procedeu-se a extração de DNA. Em cada micro tubo foram adicionados 750µL de TEN sem SDS (Tris HCl 20mM, EDTA 50mM, NaCl 200mM) que submetidos ao homogeneizador de tecidos. Após, 250µL deste homogeneizado foi misturado com 250µL de TEN (Tris HCl 20mM, EDTA 50mM, NaCl 200mM, SDS 1%), pH 8,0. A esta mistura foi adicionado 25µL de proteinase K 20mg/mL e incubada em banho-maria a 42°C por 12 horas e as demais etapas de extração foram iguais como descrito anteriormente. A quantidade de DNA presente na amostra foi mensurada e a PCR foi realizada, conforme descrito anteriormente.

4.7 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Toxoplasma gondii* PELA PCR

As amostras positivas pela PCR, assim como o controle positivo, DNA de *T. gondii* cepa VEG, foram submetidas a uma nova PCR como descrito anteriormente e realizada eletroforese em agarose Low Melting Point Sigma® a 1,5%. Após visualização das bandas positivas no gel, as mesmas foram cortadas e cada amostra foi passada para um micro tubo, identificada e armazenada em freezer a -20°C até a realização da próxima etapa. Seguiu-se o protocolo de extração de DNA pelo kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System da Promega® e o DNA quantificado. Após, 8µL do DNA extraído da banda de eletroforese foi ligado ao plasmídeo. Foi utilizada a bactéria DH10B, através do kit pGem Easy Vector®, conforme especificações do fabricante. Foram adicionados ao DNA, 1µL de pGem, 1µL de T4 DNA ligase e 1µL de água ultrapura e em seguida ficou por 16h em termociclador em ciclos de 10 minutos a 10°C, 60 minutos a 16°C, 10 minutos a 20°C e mais 10 minutos a 25°C.

Após, as bactérias foram plaqueadas em meio com antibiótico – ampicilina – e somente as bactérias que tiverem o plasmídeo se desenvolvem, pois o plasmídeo confere resistência a ampicilina. As colônias que cresceram foram triadas e sofreram a extração do DNA plasmidial para o sequenciamento.

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LacTad) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP, utilizando o sequenciador automático ABI 3730XL (Genetic Analyze). Os DNA-moldes 250ng foram marcados utilizando-se 2,5pmol do primer T7 promoter AAT ACG ACT CAC TAT AGG e 3mL do reagente BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) em um volume final de 10mL. As reações de marcação foram

realizadas em termociclador com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Os produtos precipitados foram diluídos em 10mL de formamida, desnaturados a 95°C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no sequenciador automático.

As sequências foram analisadas pela ferramenta NucleotidBlast®, disponível em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, utilizando os parâmetros de “Highly similar sequences (megablast)”.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), sob o protocolo n° 01.81.14.

5 RESULTADOS

No exame histopatológico do fígado, coração, diafragma e cérebro do ovino, não foram observadas alterações patológicas, nem presença de cistos do *T. gondii*. Das amostras submetidas a PCR, observou-se presença de DNA compatível com *T. gondii* nos tecidos do cérebro e da costela (T0), como expresso na Figura 1 e na Tabela 2.

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Visualização das bandas (340 pb) de DNA de *Toxoplasma gondii* em amostras de tecido e vísceras de ovino com titulação de 1:256 e de camundongo inoculado com tecido ovino [1 = padrão de molecular (100bp); 2 = amostra positiva de cérebro do ovino; 3 = amostra positiva do corte da costela (T0); 4 = amostra positiva de cérebro de camundongo inoculado com o corte da paleta (T2); 5 = controle positivo (cepa VEG de *T. gondii*)].

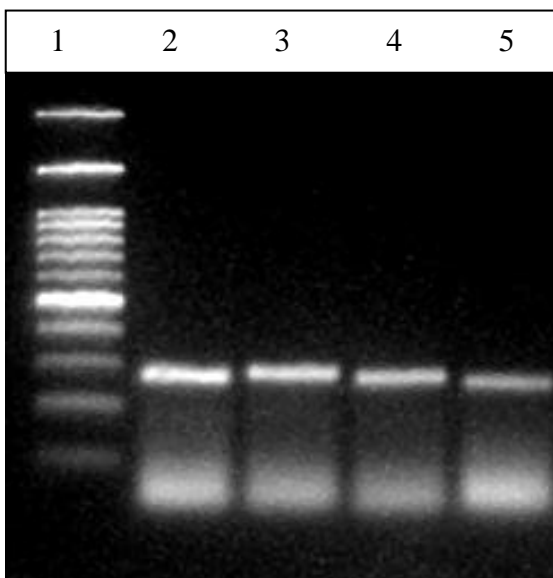


Tabela 2 – Resultado da PCR de tecidos de ovino com titulação de 1:256 para *Toxoplasma gondii* submetidos à diferentes tratamentos térmicos.

Tratamentos	Cortes	PCR da amostra
“In natura” (T0)	Fígado 1	Negativo
	Fígado 2	Negativo
	Fígado 3	Negativo
	Fígado 4	Negativo
	Fígado 5	Negativo
	Diafragma 1	Negativo
	Diafragma 1	Negativo
	Diafragma 3	Negativo
	Diafragma 4	Negativo
	Cérebro	Positivo
	Paleta	Negativo
	Costela	Positivo
	Pernil	Negativo
Coração	Negativo	
Resfriamento À 7°C por 24h (T1)	Paleta	Negativo
	Costela	Negativo
	Pernil	Negativo
	Coração	Negativo
Congelamento à -10°C por 12h (T2)	Paleta	Negativo
	Costela	Negativo
	Pernil	Negativo
	Coração	Negativo
Congelamento à -10°C por 60h (T3)	Paleta	Negativo
	Costela	Negativo
	Pernil	Negativo
	Coração	Negativo
Congelamento à -10°C por 120h (T4)	Paleta	Negativo
	Costela	Negativo
	Pernil	Negativo
	Coração	Negativo

No sequenciamento das amostras positivas na PCR e do controle positivo, todas apresentaram uma identidade maior que 97% com o gene do antígeno de membrana P22 de *T. gondii*. Anexos I, II, III e IV.

Dois camundongos inoculados com amostra da paleta (T0) e um com a da costela (T1) morreram 18 dias após a inoculação. Um camundongo inoculado com amostra do pernil (T2) morreu em sete semanas.

Dos 42 camundongos inoculados com amostras dos cortes cárneos ou das vísceras, nenhum apresentou sinais clínicos de toxoplasmose aguda, e os resultados do bioensaio podem ser observados na Tabela 3. Não foram observados taquizoítos no lavado peritoneal.

Na PCR do tecido cerebral dos camundongos, o animal inoculado com amostra da paleta (T0) foi positivo, como expresso na Figura 1. Na pesquisa de cisto de *T. gondii* no tecido cerebral dos camundongos, pela técnica de “squash”, o animal inoculado com amostra da costela (T1) apresentou cisto (Figura 2). No exame de RIFI, dois camundongos foram positivos, um inoculado com amostra da costela (T0) e outro com tecido muscular da costela (T1), ambos apresentando titulação de 1:64 (Tabela 3).

No exame histopatológico dos órgãos dos camundongos (coração, pulmão, fígado, baço, rins e tecido muscular esquelético da coxa). Do animal inoculado com amostra do corte da costela com 24h a 7°C (T1) foi encontrado cisto de *T. gondii* no pulmão, coração e músculo esquelético da coxa (Figuras 3, 4 e 5). No músculo esquelético da coxa, verificou-se infiltrado multifocal leve de macrófagos e presença de cisto. No coração havia infiltrado multifocal leve de macrófagos. No pulmão, necrose fibrinóide multifocal com infiltrado de macrófagos e neutrófilos com taquizoítos livres e cistos.

Tabela 3 - Resultados da PCR e “squash” de cérebro de camundongos e histopatológico e do coração, pulmão, fígado, baço, rins e tecido esquelético da coxa de camundongos inoculados com tecido muscular esquelético, cardíaco e cerebral de ovino com sorologia positiva para *Toxoplasma gondii* submetidos a diferentes tratamentos térmicos.

(Continua)					
Tratamentos	Cortes	RIFI	PCR do cérebro	Squash cérebro	Histopatológico
“In natura” (T0)	Paleta	A*= Neg B*= NC	A= Pos B= Neg	A= Neg B= NC	A= Neg B= NC
	Costela	A = 1:64 B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
	Pernil	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
	Coração	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
	Cérebro	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
Resfriamento a 7°C por 24h (T1)	Paleta	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
	Costela	A*=1:64 B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Pos B= Neg	A=C., P., M. B= Neg
	Pernil	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
	Coração	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
Congelamento a -10°C por 12h (T2)	Paleta	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
	Costela	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
	Pernil	A*= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg
	Coração	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg	A= Neg B= Neg

Tabela 3 - Resultados de PCR e “squash” de cérebro de camundongos e histopatológico do coração, pulmão, fígado, baço, rins e tecido esquelético da coxa de camundongos inoculados com tecido muscular esquelético, cardíaco e cerebral de ovino com sorologia positiva para *Toxoplasma gondii* submetidos a diferentes tratamentos térmicos.

(Continuação)

Congelamento a -10°C por 60h (T3)	Paleta	A= Neg	A= Neg	A= Neg	A= Neg
		B= Neg	B= Neg	B= Neg	B= Neg
	Costela	A= Neg	A= Neg	A= Neg	A= Neg
		B= Neg	B= Neg	B= Neg	B= Neg
	Pernil	A= Neg	A= Neg	A= Neg	A= Neg
		B= Neg	B= Neg	B= Neg	B= Neg
	Coração	A= Neg	A= Neg	A= Neg	A= Neg
		B= Neg	B= Neg	B= Neg	B= Neg
Congelamento a -10°C por 120h (T4)	Paleta	A= Neg	A= Neg	A= Neg	A= Neg
		B= Neg	B= Neg	B= Neg	B= Neg
	Costela	A= Neg	A= Neg	A= Neg	A= Neg
		B= Neg	B= Neg	B= Neg	B= Neg
	Pernil	A= Neg	A= Neg	A= Neg	A= Neg
		B= Neg	B= Neg	B= Neg	B= Neg
	Coração	A= Neg	A= Neg	A= Neg	A= Neg
		B= Neg	B= Neg	B= Neg	B= Neg

*Mortes antes das oito semanas

Neg.: Negativo

Pos.: Positivo

NC: Não coletado

C.: Coração

P.: Pulmão

M. E.: Músculo esquelético

A= Camundongos 1

B= Camundongo 2

Figura 2 - Cisto tecidual de *Toxoplasma gondii*, em tecido cerebral de camundongo inoculado com tecido muscular proveniente do corte da costela resfriada a 7°C por 24h de ovino com sorologia positiva para *T. gondii*. Técnica “squash”. Aumento de 400x.

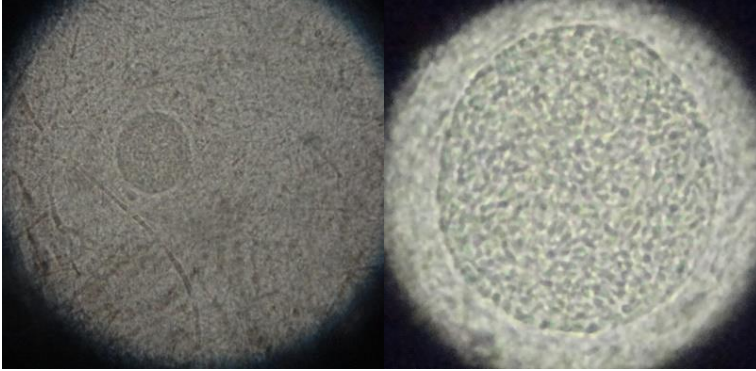


Figura 3 - Cisto tecidual de *Toxoplasma gondii* em pulmão, proveniente do camundongo inoculado com o corte da costela resfriada a 7°C por 24h de ovino positivo sorologicamente. **A** – Cisto com aproximadamente 20µm x 18µm (seta branca). **B** – Cisto com aproximadamente 15µm x 15µm (seta branca) e cisto rompido (seta preta). H. E. Aumento de 400x.

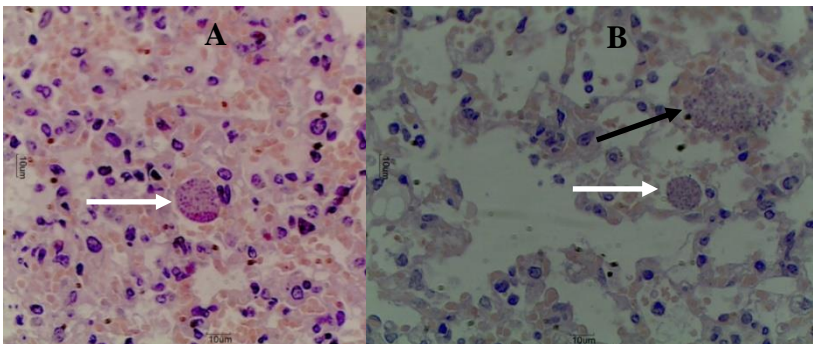


Figura 4 - Cisto tecidual de *Toxoplasma gondii* em tecido cardíaco (seta), proveniente do camundongo inoculado com o corte da costela resfriada a 7°C por 24h de ovino positivo sorologicamente. H. E. Aumento de 400x.

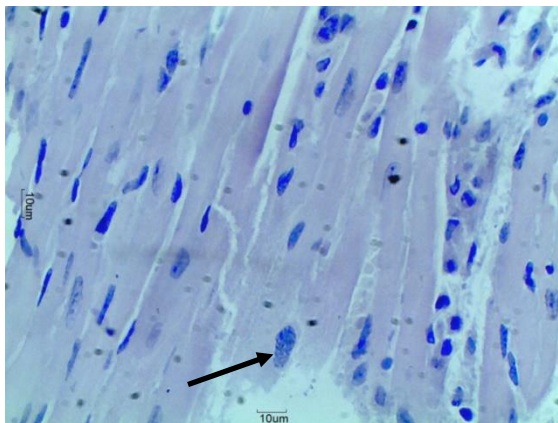
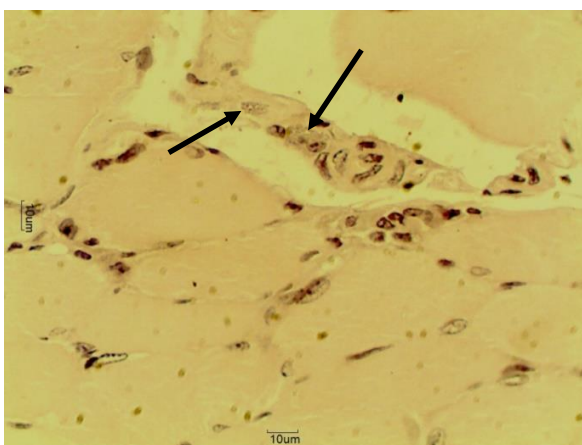


Figura 5 - Cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* em tecido muscular esquelético da coxa (setas), proveniente do camundongo inoculado com o corte da costela resfriada a 7°C por 24h de ovino positivo sorologicamente. H. E. Aumento de 400x.



6 DISCUSSÃO

O *Toxoplasma gondii* permaneceu viável na musculatura do ovino mesmo após o resfriamento a 7°C por 24h. Resultados semelhantes foram encontrados por El-Nawawi et al. (2008), que após contaminarem duas ovelhas, moldaram duas amostras de 50g cada, de tecido muscular em cubos 5³cm e submeteram à temperatura de 5°C durante cinco dias e os cistos se mantiveram viáveis. Djurkovic-Djakovic; Milenkovic (2000) testaram a infecciosidade de cistos teciduais provenientes do cérebro de camundongos quanto à temperatura de 4°C por 5, 6, 7, 8, 10 e 12 semanas. Os resultados encontrados demonstraram que cistos armazenados a 4°C por 5, 6 e 7 semanas se mantiveram viáveis, enquanto que o armazenamento durante oito semanas ou mais resultou na perda total da viabilidade. Portanto, para que somente a refrigeração inviabilize o parasito, deve-se recorrer a temperatura de 4°C por no mínimo oito semanas. No entanto, esse período pode tornar a carne imprópria para o consumo.

Na carne “in natura”, como demonstrado por outros autores como Bonametti et al. (1997) e Choi et al. (1997), foi encontrado o parasito viável. Este fato reforça a necessidade de utilizar medidas profiláticas como o congelamento da carne ovina e de outros animais por pelo menos 48h à -20°C (EL-NAWAWI et al., 2008; DJURKOVIC-DJAKOVIC; MILENKOVIC, 2000) e o cozimento adequado a 67°C por 15 minutos (DUBEY, et al., 1990), uma vez que o parasito não é visível a olho nu e este fato pode favorecer a infecção por ingestão.

Neste estudo o parasito foi encontrado no corte da costela e da paleta por meio do bioensaio em camundongos, e da PCR, no tecido cerebral do ovino amostrado. A costela do ovino não é abundante em tecido muscular como os outros cortes, o que fez com que ao longo do estudo quase toda a carne deste corte fosse utilizada. Nos outros cortes utilizados, o

tecido muscular é mais abundante, e apesar de se ter coletado várias amostras de locais diferentes dos mesmos, nestes não foram detectados cistos.

O chamado padrão-ouro para a detecção de *T. gondii* em amostras de carne é o bioensaio. Porém, é trabalhoso e muitas vezes requer um número alto de animais, o que esbarra na questão da ética. Assim, a PCR torna-se uma aliada na detecção deste parasito em amostras de carne, no entanto é menos sensível quando comparado com o bioensaio (DA SILVA E LANGONI, 2001). Tanto a PCR quanto o bioensaio foram capazes de detectar a presença do parasito no presente estudo, todavia, a PCR somente mostra a presença do DNA do agente nas amostras. A viabilidade, pode ser demonstrada pelo bioensaio, por isto o uso das duas técnicas otimiza os resultados.

A diferença entre a sensibilidade das técnicas do bioensaio e da PCR foi demonstrada por Da Silva; Langoni (2001) e Tsutsui et al. (2007). No presente estudo, não se pode demonstrar qual técnica foi mais eficaz, pelo fato de se ter utilizado um único animal para o experimento.

Yildiz et al. (2014) na Turquia, estabeleceram uma relação entre sorologia e a presença de cistos teciduais em 100 ovinos naturalmente infectados. Encontraram 46 das 100 ovelhas com presença do cisto, e o tecido mais prevalente foi o cérebro com 36 ovelhas, seguido do intercostal em 15, perna e diafragma em 14, e masseter e língua em nove. Os cistos foram mais prevalentes em ovelhas com um título elevado de IgG e também detectado nos tecidos dos animais de até um ano de idade (55,5%). Este estudo justifica o fato de se ter utilizado cordeiro, com infecção aguda neste projeto, para aumentar as chances de encontrar cistos teciduais ou viscerais de *T. gondii*.

O gene SAG2 localizado no cromossomo VIII, codifica a proteína de superfície P22, que é um antígeno de superfície, expressa tanto em taquizoítos quanto em bradizoítos (HOWE, et al., 1997). Por isso utilizou-se iniciadores oriundos deste

gene, pois ele é sensível e capaz de detectar e amplificar o DNA do parasito na PCR.

Não foi possível o isolamento do *T. gondii* no coração por nenhuma das técnicas utilizadas, provavelmente por ter sido coletada amostra de apenas um ovino no experimento ou porque este órgão não estava parasitado. Porém, Dumètre et al. (2006) isolaram o parasito em oito de 30 corações de ovinos soropositivos.

No exame histopatológico dos órgãos do ovino, não foi observada positividade, mas nos tecidos dos camundongos sim. Isso pode indicar que quando se trabalha com animais de médio porte, o histopatológico não é sensível para encontrar cistos do *T. gondii*, ou que o resultado positivo depende da quantidade de cistos presentes nos órgãos. Esteban-Redondo; Innes (1998) pela PCR encontraram parasitos no cérebro, no coração e no músculo grácil de ovinos infectados artificialmente com oocistos e no histopatológico, todas as amostras foram negativas.

Silenciato et al. (2014) analisaram vários tecidos de ovinos oriundos de matadouro no estado do Rio de Janeiro, para tentar estabelecer o tecido ovino mais sensível ao diagnóstico do *T. gondii* pela PCR. Com os resultados obtidos, concluíram que para o diagnóstico de *T. gondii* pela PCR em ovinos pode ser escolhido um único órgão para representar o animal. Portanto, como a distribuição do *T. gondii* em ovinos é desuniforme, explica a variação nos resultados obtidos no presente estudo.

Na temperatura de congelamento (-10°C) por 12, 60 e 120 horas não foram obtidos resultados positivos na PCR e no bioensaio. Lundén; Ugglá (1992) relataram que o congelamento a -20°C durante 54h e em seguida descongelada a +4°C, era capaz de matar o parasito em carne ovina.

El-Nawawi et al. (2008) demonstraram, através do bioensaio que o congelamento inativou os cistos teciduais do *T. gondii*, em tecido muscular de ovinos após dois dias a -10°C

embora a -20°C os cistos se mantiveram viáveis por um dia. No entanto o congelamento foi de cubos com 5cm^3 . Provavelmente em cortes mais espessos seja necessário um período maior de congelamento.

Neste trabalho, o proposto foi acompanhar a situação de um animal, infectado naturalmente, e utilizado os cortes sem mistura com cistos do *T. gondii* proveniente de tecido cerebral de camundongo, tentando ao máximo, igualar o que ocorre na linha de abate e comercialização de carne. Lindsay et al. (1995) citaram que é difícil obter um grande número de cistos teciduais em estudos laboratoriais.

Um camundongo inoculado com o corte da paleta “in natura” apresentou o parasito no tecido cerebral na técnica da PCR, porém, sem soroconversão, assim como um camundongo foi positivo na RIFI com título de 1:64 e não apresentou positividade em nenhum dos outros testes. Isto já foi visualizado em outros trabalhos como de Trevisani et al. (2013), onde camundongos com cistos cerebrais foram soronegativos para o *T. gondii*. Assim, mesmo animais com resultados negativos na sorologia podem estar infectados e apresentar cistos teciduais do protozoário e este fato pode ser explicado pela variação biológica dos animais para produção de anticorpos. O título de 1:16 foi utilizado como ponto de corte na RIFI, com o intuito de aumentar a sensibilidade (NAVARRO et al., 1992).

No exame histopatológico, os achados mais comuns foram infiltrado leve de macrófagos. Em outros trabalhos como de Benavides et al. (2011), no coração dos cordeiros inoculados experimentalmente com oocistos, descreveram foco de miosite intersticial formado por células mononucleares. Já em trabalho realizado por Peixoto; Lopes (1995), o pulmão de camundongos inoculados com o *T. gondii* apresentava pneumonia intersticial difusa, o interstício encontrava-se infiltrado por neutrófilos e macrófagos e o *T. gondii* pode ser visto livremente no interior dos alvéolos, dentro dos

macrófagos ou em células endoteliais, o que vai de encontro com os resultados encontrados neste estudo.

Dubey (1997) estudou a persistência e distribuição de cistos teciduais em gatos e ratos. O autor confirmou a predileção do parasito por órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético e que em roedores os cistos teciduais de *T. gondii* são mais comumente encontrados no cérebro, resultados semelhantes foram encontrados neste estudo.

7 CONCLUSÕES

O *T. gondii* é está presente na carne de ovino “in natura” e após o resfriamento a 7°C por 24h.

Não foi possível detectar a presença do *T.gondii* no pernil, paleta, costela e no coração após o congelamento a -10°C, por 12, 60 e 120 horas, em um ovino naturalmente infectado (RIFI=1:256).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECK, H. P. et al. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 175–189, 2009.

BENAVIDES, J. et al. Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally infected with sporulated oocysts of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 209-215, 2011.

BONAMETTI, A. M. et al. 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.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de Imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, p.143-169, 1974.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites – Toxoplasmosis. 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/>>. Acesso em 17 de Nov. 2014.

CENCI-GOGA, B. T. et al. Toxoplasma in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of New Concern. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n.7, p. 751-762, 2011.

CHOI, W. Y. et al. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 5, p. 1280-1282, 1997.

DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 3, p. 191-198, 2001.

DE SILVA, L. M. et al. A family outbreak of toxoplasmosis: a serendipitous finding. **Journal of Infection**, v. 8, p. 163-167, 1984.

DEHKORDI, F.S. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, p. 120-125, 2013.

DI CRISTINA, M. et al. Temporal and Spatial Distribution of *Toxoplasma gondii* Differentiation into Bradyzoites and Tissue Cyst Formation In Vivo. **Infection and Immunity**, v.76, n.8, p. 3491–3501, 2008.

DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; MILENKOVIC, V. Effect of refrigeration and freezing on survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Acta Veterinaria – Beograd**, v. 50, p. 375–380, 2000.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p.166-170, 1986.

DUBEY J. P. et al. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Parasitology**, v.76, n. 2, p.201-204, 1990.

DUBEY, J. P. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. **Parasitology**, v. 115, p. 15-20, 1997.

DUBEY, J. P., et al. 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. Sources of *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Until rates of congenital toxoplasmosis fall, control measures are essential. **British Medical Journal**, v.321, n. 7254, p. 127-128, 2000.

DUBEY J. P. et al. 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. et al. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 999–1006, 2008.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1-2, p. 1-14, 2009.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 60-73, 2010.

DUMÈTRE, A. et al. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: Seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 376-379, 2006.

EL-NAWAWI, F. A.; SHAAPAN, R. M.; TAWFIK, M. A. Methods for inactivation of *Toxoplasma gondii* cysts in meat and tissues of experimentally infected sheep. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 5, p. 687 - 690, 2008.

ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1459-1466, 1998.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Meat Consumption, 2014. Disponível em: < <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/background.html>>. Acesso em 05 de Dez. 2014.

FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in around us. **Bioscience**, v. 23, n. 6, p. 343-356, 1973.

FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis in human beings. **Journal of The American Veterinary Medical Association, Schaumburg**, v. 196, n.2, p. 240-248, 1990.

FUNASA – **Boletim Eletrônico EPIDEMIOLÓGICO** – P. 01-03, 20/08/02.

GUIMARÃES, L. F., et al. Prevalence and risk factors associated with anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in sheep from Bahia state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 22, n.2, p. 220-224, 2013.

HALOS, L. et al. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p.193–200, 2010.

HOWE, D. K. et al. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* Strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p.1411–1414, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2010. Disponível em:<
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em 31 de Outubro de 2014.

JONES, J. L, et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p.878–884, 2009.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Foodborne Toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 845-851, 2012.

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

LEITE, R. C. K. et al. Occurrence and risk factors associated to *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, p.1463-1466, 2014.

LINDSAY, D. S., et al. A review of *Toxoplasma gondii* and muscular toxoplasmosis. **Bacteriological Analytical Manual**, v.5, n.3, p. 255-260, 1995.

LUNDÉN, A.; UGGLA, A. Infectivity of *T. gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p.357–363, 1992.

McDONALD, J. C. Et al. An outbreak of toxoplasmosis in pregnant women in northern Québec. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 769 -774, 1990.

MOURA, A. B., et al. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 54-56, 2007.

MOURA, R.L.S. et al. Identificação de *Toxoplasma gondii* em leite de ovelhas do Sul da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 38, 2011. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2011.

NAVARRO, I.T., et al. *Toxoplasma gondii* isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina – PR. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 13, n. 1, p. 32 a 34. 1992.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A., et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. v.2.

PEIXOTO, C. M. S.; LOPES, C. W. G. Patogenicidade para camundongos do *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) isolados de galinhas naturalmente infectadas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n.1, p. 37-41, 1995.

PENA, H.F.J. et al. Population structure and mousevirulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561–569, 2008.

RUSSEL, E.L.; MCLEOD, R.; Roberts, C. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 198-201, 2002.

SACKS, J.J. et al. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **The Journal of the American Medical Association**, v. 248, p. 1728-1732, 1982.

SAKATA, F.B.L.S. et al. *Toxoplasma gondii* antibodies sheep in Lages, Santa Catarina, Brazil, and comparison using IFA and ELISA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n.3, p. 196-200, 2012.

SAMBROOK, J. ; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning a laboratory manual**. 3rd ed. New York: CSHL Press, 2001.

SILENCIATO, L. N. et al. Identificação do tecido ovino mais sensível para o diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 18., 2014. Gramado. **Anais...** Gramado, 2014.

TENTER, A. M., et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, p. 1217-1258, 2000.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 364-369, 2009.

TEUTSCH, S.M. et al. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. **New England Journal of Medicine**, v. 300, p. 695-699, 1979.

TREVISANI, N. et al. **Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de *Gallus gallus* naturalmente infectados no estado de Santa Catarina**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.

TSUTSUI, V. S. et al. 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.

USDA. United States Department of Agriculture. ERS, Economic Research Service. <http://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses.aspx#48450>. Acesso em 27 de Out. 2014.

WARNEKULASURIYA, M. R., et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 211–215, 1998.

YILDIZ, K. et al. The relationship between seropositivity and tissue cysts in sheep naturally infected with *Toxoplasma gondii*. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 38, p. 169-175, 2014.

ANEXOS

ANEXO I

Sequenciamento do *T. gondii*, proveniente da amostra do tecido cerebral do ovino.

Toxoplasma gondii P22 gene for surface antigen, partial cds, strain: Tehran

Sequence ID: [dbj|AB667974.1](#) Length: 278 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 276		GenBank	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
475 bits(257)	2e-130	270/277(97%)	2/277(0%)	Plus/Minus	
Query 53	GGTGGACGC -AGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGTGAGCKTTARMWAGCGCTA			111	
Sbjct 276	GGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGTGAGCGCTA-GCGACGCTA			218	
Query 112	GGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCGACWAGACAAGATTGGAACGAGACAGAA			171	
Sbjct 217	GGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCGACAAGACAAGATTGGAACGAGACAGAA			158	
Query 172	GGTGTCAACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCTTAGAACGCAACCCGTGAAA			231	
Sbjct 157	GGTGTCAACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCTTAGAACGCAACCCGTGAAA			98	
Query 232	CAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATGGGTCACTGCAGCAACCT			291	
Sbjct 97	CAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATGGGTCACTGCAGCAACCT			38	
Query 292	GAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTCGAGGT 328				
Sbjct 37	GAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTCGAGGT 1				

ANEXO II

Sequenciamento do *T. gondii*, proveniente da amostra do tecido muscular do corte da costela “in natura” do ovino.

Toxoplasma gondii P22 gene for surface antigen, partial cds, isolate: S4

Sequence ID: [dbj|AB667973.1](#) Length: 291 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 290		GenBank	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
521 bits(282)	2e-144	285/288(99%)	0/288(0%)	Plus/Minus	
Query 34	CGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGTGAGCSTWG			93	
Sbjct 290	CGTCTCGGTGGTGGACGCAAGAGCGAACTTGAACACAACAACAAGCCCGTGAGCGCTAG			231	
Query 94	CGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCSACAAGACAAGATTGGAACG			153	
Sbjct 230	CGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAACTCATAGTTCCGACAAGACAAGATTGGAACG			171	
Query 154	AGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCTTAGAACGCAAC			213	
Sbjct 170	AGACAGAAGGTGTACACCGCAATTGTGCACAATCACAACCTCAGTTCTTAGAACGCAAC			111	
Query 214	CCGTGAAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATGGGTCACTGC			273	
Sbjct 110	CCGTGAAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGCAGATGGGTCACTGC			51	
Query 274	AGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTCGAGGTAGC 321				
Sbjct 50	AGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCTCGAGGTAGC 3				

ANEXO III

Sequenciamento do *T. gondii*, proveniente da amostra do tecido cerebral do camundongo inoculado com o corte da paleta “in natura”.

Toxoplasma gondii P22 gene for surface antigen, partial cds, isolate: S7

Sequence ID: [dbj|AB667972.1](#) Length: 303 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 296		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
508 bits(275)	2e-140	289/297(97%)	2/297(0%)	Plus/Minus	
Query 36	GGC	GCTGGCGTCTCGG	GGTGGACGCA-GAGCGA	ACTTGAACACAACA	AAAGCCCGTG 94
Sbjct 296	GGC	GCTGGCGTCTCGG	TGGTGGACGCAAGAGCG	AACTTGAACACAACA	AAAGCCCGTG 237
Query 95	AGCKTTARM	WGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAA	ACTCATAGTTCCGAC	WAGACAAAG 154	
Sbjct 236	AGCGCTA-GCG	ACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAA	ACTCATAGTTCCGAC	AAAGCAAAAG 178	
Query 155	ATTGGAACGAGAC	AGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACA	AATCACA	AACTCAGTTCCTAG 214	
Sbjct 177	ATTGGAACGAGAC	AGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACA	AATCACA	AACTCAGTTCCTAG 118	
Query 215	AAC	TGCAACCCGTGAAACAACACAGAA	TGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCG	CAGATG 274	
Sbjct 117	AAC	TGCAACCCGTGAAACAACACAGAA	TGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCG	CAGATG 58	
Query 275	GGTCACTGCAGCA	ACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCC	TGTTCCGAGGTAGC 331		
Sbjct 57	GGTCACTGCAGCA	ACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCC	TGTTCCGAGGTAGC 1		

ANEXO IV

Sequenciamento do *T. gondii*, referente ao controle positivo VEG.

Toxoplasma gondii ME49 surface antigen P22, mRNA

Sequence ID: [ref|XM_002365730.1](#) Length: 1669 Number of Matches: 1

Range 1: 170 to 462		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
503 bits(272)	7e-139	286/294(97%)	2/294(0%)	Plus/Minus	
Query 36	GGCGCTGGCGTCTCGG	WGGTGGACGCA-GAGCGA	ACTTGAACACAACA	AAAGCCCGTG 94	
Sbjct 462	GGCGCTGGCGTCTCGG	TGGTGGACGCAAGAGCG	AACTTGAACACAACA	AAAGCCCGTG 403	
Query 95	AGCKTTARM	WGACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAA	ACTCATAGTTCCGAC	WAGACAAAG 154	
Sbjct 402	AGCGCTA-GCG	ACGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAA	ACTCATAGTTCCGAC	AAAGCAAAAG 344	
Query 155	ATTGGAACGAGAC	AGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACA	AATCACA	AACTCAGTTCCTAG 214	
Sbjct 343	ATTGGAACGAGAC	AGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACA	AATCACA	AACTCAGTTCCTAG 284	
Query 215	AAC	TGCAACCCGTGAAACAACACAGAA	TGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCG	CAGATG 274	
Sbjct 283	AAC	TGCAACCCGTGAAACAACACAGAA	TGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCG	CAGATG 224	
Query 275	GGTCACTGCAGCA	ACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCC	TGTTCCGAGGT 328		
Sbjct 223	GGTCACTGCAGCA	ACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTCC	TGTTCCGAGGT 170		