



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA CAROLINA FIGUEIREDO MIURA

**ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *TOXOPLASMA GONDII*  
EM SUÍNOS ORIUNDOS DE ABATEDOUROS**

---

Londrina  
2014

ANA CAROLINA FIGUEIREDO MIURA

**ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *TOXOPLASMA GONDII*  
EM SUÍNOS ORIUNDOS DE ABATEDOUROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, (área de concentração: Sanidade Animal) como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M685i Miura, Ana Carolina Figueiredo.  
Isolamento e genotipagem de *Toxoplasma gondii* em suínos oriundos de abatedouros / Ana Carolina Figueiredo Miura. – Londrina, 2014.  
60 f.: il.

Orientador: João Luis Garcia.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose em suíno – Teses. 2. *Toxoplasma gondii* – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 4. Parasitologia veterinária – Teses. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título

CDU 619:636.4

ANA CAROLINA FIGUEIREDO MIURA

**ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *TOXOPLASMA GONDII* EM  
SUÍNOS ORIUNDOS DE ABATEDOUROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Regina Mitsuka Breganó  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 21 de Março de 2014

Dedico este trabalho...  
À minha amada família,  
minha rottweiler Kamy (*in memorian*).

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Jeová Deus pela vida, saúde e todas as boas dádivas.*

*Ao professor Dr. João Luis Garcia, pela orientação, amizade e confiança desde os tempos de IC.*

*Ao professores, Dra. Roberta Lemos Freire e Italmir Teodorico Navarro pelas contribuições e sugestões neste trabalho.*

*Ao professores Dr. Odilon Vidotto e Dr. Gércio Luiz Bonesi pela disposição em ajudar e apoio.*

*Ao meu marido e companheiro Gabriel, pelo apoio e motivação essenciais em todos os momentos, pela compreensão, carinho e amor em cuidar de mim.*

*Aos meus pais Arilene e Dorival, e irmãos Cristienne e André, por serem exemplares na sua dedicação em fazer o melhor no que se propõem, os admiro muito e agradeço pela compreensão de não estar tão presente na vida de vocês quanto eu gostaria.*

*As minhas lindas sobrinhas Ana Júlia, Mariana e Lara por sempre alegrarem a vida de toda nossa família. “Tia Cah ama vocês!”*

*As minhas amigas Nathália Guimarães Faria, Camila Bertan, pelo apoio e amizade desde que cheguei em Londrina.*

*Aos meus amigos Luiz Daniel de Barros e José Mauricio Ferreria Neto pela ajuda, nas coletas nos abatedouros de madrugada, pela amizade, companheirismo, conselhos, e a descontração no laboratório.*

*As residentes e amigas Hannah Lia Ettiene Peruch Lemos dos Santos e Fernanda Ferreira, pela amizade e ajuda durante os trabalhos.*

*A minha amiga Daniele Araújo Pereira, pela amizade e risadas para descontrair, caminhadas.*

*A minha amiga doutoranda Patrícia Lopes Sicupira, pela amizade e ensinamentos e dicas no laboratório.*

*Aos meus colegas de Pós-graduação, Jonatas Campos de Almeida, Victor Tabacow, Michele Frehse, Keila Jimenez Torrico, Roberta Toledo, Aline Kuhn Sbruzzi Pasquali, Maria Paula Ewald, Thais Cabral, Ivo Alexandre Leme da Cunha,*

*Fernando Emmanuel Gonçalves, Sthefany Pagliari, Fernanda Evers, Elisângela Olegário, Daniele Voltarelli.*

*Aos Técnicos de laboratório Aldair Calistro, Beatriz Nino, e Elizabete Marana pela ajuda em diferentes etapas.*

*A todos os estagiários que participaram do projeto, especialmente João Pedro Sasse, Ana Sue Sammi, Hugo Luca Abate, Déborah Brunieri e Maíra Moreira Santos.*

*A secretária Helenice Kieski e ao coordenador da Pós-graduação em Ciência Animal, Dr. Amauri Alcindo Alfieri.*

*As funcionárias do DMVP da UEL, Maria José e Neusa pelos cafezinhos tão providenciais.*

*Aos funcionários dos abatedouros que facilitaram a coleta de sangue e tecidos dos suínos.*

*Aos animais utilizados, suínos e camundongos.*

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho, pois sem a ajuda de cada um de vocês não teria acontecido.*

*Muito obrigada,  
Sou grata a todos!*

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

(John F. Kennedy)



MIURA, Ana Carolina Figueiredo. **Isolamento e genotipagem de *Toxoplasma gondii* em suínos oriundos de abatedouros**. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório, causador da toxoplasmose, uma importante zoonose. O estudo da prevalência deste parasita em suínos é de grande importância uma vez que a carne suína é uma das mais importantes fontes de infecção para os humanos, quando consumida crua ou mal cozida. O presente trabalho teve como objetivo determinar a soro-ocorrência, isolar e caracterizar genotipicamente cepas de *T.gondii* de suínos abatidos na região de Londrina, estado do Paraná. Foram coletados sangue e tecidos (diafragma, coração, masseter, língua e fígado) de 400 animais em 2 abatedouros, um no município de Londrina e outro no município de Rolândia, ambos com Serviço de Inspeção Oficial. As coletas foram realizadas entre Agosto de 2012 à Março de 2013. Os animais foram testados quanto a presença de anticorpos IgG anti-*T.gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Teste de Aglutinação Modificado (MAT), sendo considerados positivos títulos  $\geq 64$  em ambos os testes. Os animais positivos sorologicamente tiveram seus tecidos submetidos ao bioensaio em camundongos para isolamento do parasita. Os isolados obtidos foram caracterizados por meio do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição-PCR(PCR-RFLP) utilizando 11 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico). Os resultados foram comparados e classificados de acordo com os genótipos presentes no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). A soro-positividade nos suínos contra *T. gondii* foi de 6,5% (26/400). Destas, 2,75% (11/400) foram positivas em ambos os testes e 2,25% (9/400) e 1,5% (6/400) foram positivas somente no MAT e na RIFI, respectivamente, com títulos variando entre 64 e 4096. A concordância *Kappa* entre a RIFI e MAT foi considerada moderado ( $k=0,5751$ ). Dentre os 26 animais sororreagentes foram isoladas 18 (69,23%) cepas de *T. gondii*. A partir da análise genotípica 15 isolados foram identificados como genótipo #206, três isolados não puderam ser classificados. Podemos concluir que a carne suína apresenta riscos de transmissão do *T. gondii* para humanos devido ao número elevado de cepas isoladas, e pela primeira vez o genótipo #206 foi identificado em suínos no Brasil e no mundo.

**Palavras-chave:** Bioensaio. Isolamento. PCR-RFLP. Soroprevalência. Suínos.

MIURA, Ana Carolina Figueiredo. **Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in porks from slaughterhouses**. 2014. 60 p. Dissertation (Masters Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular coccidian protozoan that causes toxoplasmosis, an important zoonose. Prevalence studies of this parasite in pigs have a great importance since pork meat is one of the most important sources of infection for humans when consumed raw or undercooked. The present study aimed to determine the serum-occurrence, isolate and genotypically characterized strains of *T. gondii* from pigs slaughtered in the region of Londrina, Paraná, Brazil. Blood and tissues (diaphragm, heart, masseter, tongue, and liver) of 400 animals were collected in two slaughterhouses, one in the municipality of Londrina and one in the city of Rolândia, both with Federal Inspection Service and State, respectively. Blood and tissues (diaphragm, heart, masseter, tongue, and liver) of 400 animals were collected in two slaughterhouses, one in the municipality of Londrina and one in the city of Rolândia, both with Federal Inspection Service and State, respectively. Sampling was conducted from August 2012 to March 2013. The animals were tested for the presence of anti - *T. gondii* IgG antibodies by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA ) and the Modified Agglutination Test (MAT), were considered positive titers  $\geq 64$  in both tests. The serologically positive animals had their tissues submitted to the mouse bioassay for the isolation of the parasite . The isolates were characterized by the length polymorphism restriction fragmentos -PCR ( PCR - RFLP ) using 11 genetic markers ( SAG1 , SAG2 , alt . SAG2 , SAG3 , BtuB , GRA6 , c22 - 8 , c29 - 2 , L358, PK1, Apico). The results were compared and ranked according to the genotypes present in ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). The seropositivity in pigs against *T. gondii* was 6.5 % (26/ 400) . Of those, 2.75% (11/ 400) were positive in both tests and 2.25 % (9/ 400) and 1.5 % (6/ 400) were positive only in the MAT and IFA , respectively , with titers ranging between 64 and 4096 . The *kappa* agreement between IFAT and MAT was 0.5751, which is considered moderate, according to the *Kappa* coefficient. Through the bioassay were obtained 18 (69,23%) *T. gondii* isolates. 15 isolates were identified as # 206 genotype, and three were not determined by genotypic analysis. We can conclude that pork poses risks of transmission of *T. gondii* to humans due to the high rate of strains isolated. # 206 genotype was identified in pigs in Brazil and worldwide for the first time.

**Key-words:** Bioassay. Isolation. PCR-RFLP. Seroprevalence. Swine.

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Isolamento de *T. gondii* a partir de tecidos de suínos naturalmente infectados no Brasil.....21
- Quadro 2** – Soro-ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos em diversos países de acordo com estudos recentes.....22
- Quadro 3** – Soro-ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos em diferentes Estados do Brasil.....23

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Abatedouros de suínos selecionados na Região de Londrina, número de amostras coletadas, no período de agosto de 2012 a março de 2013.....	45
<b>Tabela 2</b> – Comparação dos resultados obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Aglutinação Modificada (MAT) para anticorpos (IgG) anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em soro de suínos abatidos na Região de Londrina, PR .....	49
<b>Tabela 3</b> – Características dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de suínos ( <i>Sus domesticus</i> ) .....	50
<b>Tabela 4</b> – Caracterização genotípica dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos de suínos ( <i>Sus domesticus</i> ) abatidos na região de Londrina, estado do Paraná, Brasil no período de agosto de 2012 a março de 2013.....	51

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1	TOXOPLASMA GONDII EM SUÍNOS	19
2.2	PREVENÇÃO DA INFECÇÃO	24
2.3	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE TOXOPLASMA GONDII	24
	<b>REFERÊNCIAS</b>	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
<b>4</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b>	41
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	43
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	44
2.1	ASPECTOS BIOÉTICOS	44
2.2	LOCAIS DAS COLETAS	44
2.3	COLETAS DAS AMOSTRAS	44
2.4	TESTES SOROLÓGICOS	45
2.4.1	Cepas de Toxoplasma gondii	45
2.5	DIGESTÃO PÉPTICA E BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS	46
2.6	EXTRAÇÃO DE DNA, E PCR	47
2.7	GENOTIPAGEM	47
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	48
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	52
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	52
	<b>REFERÊNCIAS</b>	55
	<b>CONCLUSÃO</b>	60

## 1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição da toxoplasmose em suínos naturalmente infectados foi feita por Farrell et al., (1952) em Ohio nos Estados Unidos em um rebanho que apresentava elevada mortalidade em todas as faixas etárias. No Brasil, o primeiro relato dessa doença foi feito por Silva (1959) que descreveu, com base em diagnóstico histológico, um caso de infecção natural de toxoplasmose suína no estado de Minas Gerais. Posteriormente, Amaral e Macruz (1969) em São Paulo e Schenk, Lima e Viana (1976) em Minas Gerais isolaram *Toxoplasma gondii* do diafragma e do cérebro de suínos clinicamente saudáveis, abatidos para consumo humano.

Nos anos de 1954 a 1956, levantaram-se as primeiras hipóteses sobre a possibilidade de transmissão horizontal através de cistos teciduais de carnes cruas de suínos (WEINMAN; CHANDLER, 1954; 1956). Jacobs et al. (1960) confirmaram essa hipótese. A importância da toxoplasmose suína está relacionada principalmente à saúde pública, visto que estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de cistos em carne crua ou mal cozida é uma das mais importantes vias de transmissão do *T. gondii* para a população humana (APT et al., 1973; FIALHO; ARAÚJO, 2003; JAMRA; DEANE; GUIMARÃES, 1969; DUBEY, 1986a; DUBEY, 2009a).

Os suínos podem adquirir a toxoplasmose pela ingestão de água e ração contaminadas com oocistos presentes em fezes de felinos, ingestão de roedores ou de carnes e vísceras contaminadas com cistos, e ainda por infecção transplacentária (FIALHO; TEIXEIRA; ARAÚJO, 2009).

A infecção por *T. gondii* em suínos geralmente é subclínica (DUBEY, 1986a). Vidotto et al. (1990) constataram que até mesmo animais com altos títulos de anticorpos (16.000), não apresentavam sinais clínicos. A soropositividade de suínos pode indicar uma infecção latente e refletir o risco de infecção para seres humanos, ao ingerir carne mal cozida ou embutidos frescos, contudo, parasitas viáveis foram isolados até mesmo de suínos soronegativos (HEJLÍČEK ; LITÉRAK, 1993; OMATA et al., 1994; DUBEY et al., 1995, 2002; DE SOUSA et al., 2006) A soropositividade para *T. gondii* também é um importante indicador do risco de infecção dos suínos, do manejo higiênico, sanitário da propriedade rural (BAYARRI et al., 2012).

Segundo Jones e Dubey, (2012) a prevalência de *T. gondii* têm diminuído, no entanto, mesmo que a prevalência seja de 1%, um milhão de suínos infectados podem ir ao mercado para consumo humano. Deve-se considerar que um suíno de 50 quilos produz mais de 300 porções de carne. Portanto, se não for bem controlada a toxoplasmose pode se disseminar com facilidade devido ao grande volume de produção, consumo e exportação da carne suína.

A carne suína é a mais consumida não só *in natura*, mas também, seus derivados, bacon, linguiças, presunto e outros representando 43% do consumo mundial de carne por espécie (U.S., 2012). Nos EUA, estima-se que ocorram 112.500 novos casos de toxoplasmose anualmente, *T. gondii* juntamente com *Salmonella* e *Listeria* chegam a ser responsáveis por 75% das mortes atribuídas às doenças de origem alimentar (MEAD, 1999).

No Brasil, foram abatidos 32.252.355 suínos em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF), mais de 580 milhões de toneladas foram exportadas para 60 países no ano de 2012. A região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) é a maior produtora, sendo responsável por mais de 50% de toda a produção brasileira (ABIPECS, 2012). O estado do Paraná é o 3º maior produtor nacional de suínos, com cerca de 5,45 milhões de cabeças, possui 22 abatedouros inscritos no SIF e 55 inscritos no Serviço de Inspeção Estadual, e estima-se que 31.000 propriedades tem produção regular e de carácter comercial (PARANÁ, 2013).

Visto que esse protozoário não pode ser detectado pelos atuais métodos de inspeção sanitária da carne (DUBEY; JONES, 2008), a prevenção, controle e conhecimento da epidemiologia são muito importantes para a saúde pública. Neste contexto, estudos avaliando as características genéticas do parasita em carnes de suínos devem ser realizados, pois estes podem elucidar melhor o papel do suíno na cadeia epidemiológica de transmissão do *T. gondii* para seres humanos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

*Toxoplasma gondii* é um dos parasitas mais estudados no mundo devido à sua importância na área médica e veterinária, é capaz de infectar todos os animais de sangue quente, inclusive os seres humanos (DUBEY, 2009a). Há mais de 100 anos, o protozoário foi identificado pela primeira vez simultaneamente por Nicolle e Manceaux na Tunísia em um roedor africano da espécie *Ctenodactylus gundi* e por Splendore em coelhos no Brasil que primeiramente o classificaram como *Leishmania gondii* (NICOLLE, MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908). Em 1909, com base na morfologia do parasita, foi estabelecido o nome *Toxoplasma gondii* (do grego “toxó” que significa arco e “plasma” significando forma).

O *T. gondii* é um protozoário eucarionte intracelular obrigatório, coccídeo, estruturalmente formado por uma membrana externa, anéis polares, conóide, microtúbulos, grânulos densos, micronemas, roptrias, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de golgi, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, microporo e um núcleo com parede bem definida (METSIS, PETERSEN, 1995).

Infecta a maioria dos animais de sangue quente, inclusive o homem, animais domésticos, silvestres e aves (DUBEY, 2009a). Apesar da ampla variedade de hospedeiros, os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos, nos quais ocorre o ciclo sexuado do parasita, ou gametogonia (FRENKEL, DUBEY, MILLER 1970). Após a eliminação de oocistos não esporulados nas fezes, esses vão esporular no meio ambiente, num período de um a cinco dias para se tornarem infectantes (DUBEY, 1993). Nos hospedeiros intermediários, ocorre o ciclo enteroepitelial ou fase assexuada do parasita, conhecida como endodiogenia (FRENKEL, DUBEY, MILLER 1970).

A toxoplasmose é uma zoonose de ocorrência comum e de distribuição mundial (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). De acordo com Montoya e Liesenfeld (2004) 90% dos indivíduos saudáveis não apresentam sinais clínicos, e 10% apresentam uma doença auto limitante que raras vezes necessita de tratamento sendo considerada uma infecção inaparente ou latente, porém, isso está sendo reconsiderado, pois há relatos de diversos casos nos quais ocorreram manifestações clínicas localizadas ou generalizadas mesmo em indivíduos imunocompetentes, por exemplo, toxoplasmose ocular, linfadenomegalia, febre, fadiga, mal-estar, dor em músculos, cabeça e garganta (BOWIE et al., 1997 DUBEY,



2004). No entanto, a toxoplasmose é mais grave em neonatos e imunossuprimidos (DUBEY, 2009a). Nestes, devido à encefalite pode ocorrer dor de cabeça, desorientação, hemiparesia, convulsão e até mesmo coma e morte (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

A toxoplasmose está no topo da lista de doenças que levam pacientes com AIDS à morte (LUFT, REMINGTON 1992). Uma infecção severa ocorre em casos imunodeficiência, pois ocorre a reativação e proliferação dos parasitas, diferentemente da re-infecção que geralmente não causa manifestações clínicas aparentes (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009; LUFT e REMINGTON, 1992).

Gestantes quando infectadas pelo parasita podem desenvolver uma síndrome congênita que inclui surdez, convulsões, retardo mental e danos à retina do feto (TORREY et al., 2012). Muitas vezes a criança nasce sem apresentar sinais clínicos, porém mais tarde pode apresentar perda da visão, retardo mental, entre outros (EL-TRAS, 2011). Crianças de todas as classes socioeconômicas são afetadas pela toxoplasmose congênita, num estudo retrospectivo 50% das mães que tiveram bebês infectados com *T.gondii*, em Chicago EUA relataram ingestão de carne mal cozida (BOYER et al., 2005).

A patogenicidade está estreitamente relacionada à virulência da cepa e também à espécie hospedeira, os sinais clínicos podem variar dependendo de fatores como gênero, devido ao efeito de hormônios femininos no sistema imune, estresse (em gestantes, lactantes) e infecções concomitantes (DUBEY, 2009). As lesões oculares variam em severidade devido à duração da infecção e da intensidade inflamatória, podem ser tanto monolaterais como bilaterais, com reativação em 80% dos casos (CENCI-GOGA et al., 2011).

Diversos estudos têm sido conduzidos para avaliar a correlação entre as altas taxas de soropositividade para *T. gondii* e as seguintes disfunções: esquizofrenia, comportamento suicida, depressão, transtorno obsessivo compulsivo, artrite reumatóide, crianças com baixo rendimento escolar e câncer cerebral (TORREY et al., 2013). Estima-se que nos Estados Unidos 400 a 4000 crianças nascem todos os anos infectadas congenitamente pelo *T. gondii* (CDC, 2000), sendo um importante e oneroso problema de saúde pública.

O parasita possui três formas infectantes para todos os hospedeiros: **taquizoítos**, (do grego *tachos* = rápido), característicos da fase aguda da infecção,

**bradizoítos** contidos em cistos teciduais (fase crônica, do grego *bradi*= lento), e esporozoítos em **oocistos esporulados** (HILL, DUBEY, 2002).

Após a ingestão dos cistos ou oocistos, estes são rompidos e os bradizoítos ou esporozoítos, respectivamente, são liberados no lúmen intestinal, onde penetram rapidamente nas células do hospedeiro na forma de taquizoítos e formam um vacúolo parasitóforo (VP), este serve como proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro, então os taquizoítos se multiplicam várias vezes por divisão binária, até romperem as células do hospedeiro liberando os taquizoítos (DUBEY, 2004, MAENZ et al., 2014) estes invadem novas células e o ciclo se repete. Essa destruição celular determina os sinais clínicos da toxoplasmose.

Após inúmeras divisões, os taquizoítos se multiplicam mais lentamente e formam cistos nos tecidos, tornando-se então bradizoítos. Esses cistos se desenvolvem e permanecem intracelularmente nos tecidos, seu tamanho pode variar de 5 a 70 µm dependendo da quantidade de bradizoítos em seu interior. Os taquizoítos diferem minimamente dos bradizoítos, estes possuem núcleo na região posterior, são mais delgados, enquanto que os taquizoítos têm o núcleo mais central e são mais susceptíveis às enzimas proteolíticas (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). É comum encontrar cistos teciduais em órgãos viscerais, como pulmões, fígado, rins, contudo são mais prevalentes em tecidos neurais e musculares, incluindo cérebro, olhos e músculos cardíaco e esquelético (DUBEY; LINDSAY, 2006).

A infecção congênita pelo *T. gondii* em felídeos pode ocorrer, no entanto, é rara (DUBEY; CARPENTER, 1993). A maioria das infecções em gatos é pós-natal, ocorre pela ingestão de carnes contaminadas (cistos contendo bradizoítos) e oocistos esporulados. A transmissão do protozoário é mais eficiente pela ingestão de tecidos infectados do que pela ingestão de oocistos (DUBEY, 2001). Os felinos domésticos e outros felídeos eliminam os oocistos no meio ambiente e estes são essenciais para perpetuação do ciclo, é relevante que a população de felinos é paralela à população humana, por exemplo, um terço dos domicílios nos Estados Unidos têm gatos (DUBEY, 2009).

Estudos epidemiológicos indicam que os gatos são essenciais na perpetuação do ciclo de vida, pois a infecção é rara ou ausente em áreas desprovidas de gatos (WALLACE, 1969; DUBEY et al., 1997b). Garcia et. al, (1999) no Brasil, verificaram uma correlação positiva e significativa entre humanos e felinos.

Outro estudo, no estado do Tennessee, EUA estimou que a chance de suínos se infectarem por *T. gondii* é 2,6 vezes maior nas propriedades com presença de gatos do que naquelas onde estes estão ausentes (ASSADI-RAD et al., 1995)

Corroborando com a ideia de que os gatos são peça chave na transmissão dessa doença, Mateus-Pinilla et al. (1999) vacinaram por via oral gatos de fazendas em Illinois, EUA, com cepas de *T. gondii* que imunizam os felinos contra a eliminação de oocistos pelas fezes. O resultado foi que reduziram significativamente a soroprevalência nos suínos e roedores dessas fazendas.

Felídeos selvagens como pantera, leão, leopardo, jaguar, lince, puma e outros também podem eliminar oocistos nas fezes, pesquisadores encontraram sorologia positiva nesses animais em zoológicos, e os oocistos eliminados por esses animais podem ser fonte de infecção de *T. gondii* não só para outros animais do zoológico, mas também para tratadores, visitantes; principalmente crianças (JONES; DUBEY, 2010).

Os oocistos são eliminados nas fezes não esporulados, ou seja, não estão aptos para infectar, sua forma é sub-esférica a esférica, mede 10x12 µm de diâmetro, e o hábito de enterrarem suas fezes propicia a sobrevivência do oocisto (DUBEY, LINDSAY ; SPEER, 1998; FIALHO, TEIXEIRA; ARAÚJO, 2009). A esporulação ocorre no ambiente, de 1 a 5 dias após a excreção das fezes, e depende de condições ideais de aeração, temperatura e umidade (DUBEY et al., 2004). Oocistos esporulados tem formato sub-esférico a elíptico e medem de 11-13 µm de diâmetro, possuem dois esporocistos medindo de 6-8 µm, e cada um contém quatro esporozoítos, totalizando 8 esporozoítos por oocisto (DUBEY, LINDSAY; SPEER, 1998).

Os oocistos no meio ambiente são bem resistentes, até mesmo ao congelamento, desinfetantes, tratamentos como cloração, ozônio e raios ultravioleta (JONES; DUBEY, 2010). Podem contaminar água, alimentos, e o solo e têm sido apontados como uma importante via de transmissão da toxoplasmose (DU et al., 2012). Os oocistos podem permanecer viáveis por 32 dias numa temperatura de 35°C e por 9 dias a 40°C, e por apenas um dia a 45°C. Kawazoe (2005) encontrou oocistos viáveis por até 18 meses .

Essa faixa de temperatura de 30-45°C é comum em várias regiões do mundo (DUBEY, 1998a) o que faz com que a distribuição do *T. gondii* seja muito ampla. Os oocistos não ficam apenas no solo, a disseminação de oocistos no

ambiente também pode ser feita por minhocas, moscas e baratas, que contaminam diretamente os alimentos (HILL; DUBEY, 2002; CHINCHILLA et al., 1994).

A transmissão pode ser vertical (via transplacentária), no entanto, os dois modos de transmissão mais importantes são: por meio da ingestão acidental de oocistos que estão no meio ambiente e consumo de carnes com cistos teciduais de *T. gondii* (transmissão horizontal) (DUBEY et al., 2012a). A transmissão horizontal (ingestão de cistos teciduais, ou oocistos) é muito importante, pois cerca de 2/3 dos pacientes que apresentam toxoplasmose ocular adquiriram a infecção após o nascimento em vez da forma congênita (GILBERT; STANFORD, 1999). Dubey e Jones (2008), sugerem que a transmissão pela carne contendo cistos teciduais é a mais importante, pois a toxoplasmose surge com maior frequência em adolescentes do que em crianças. E menos de 1% dos humanos e animais adquirem a infecção transplacentária.

Dubey et al. (2005) afirmaram que até aquele momento não existia um exame que possibilitasse saber se um indivíduo se infectou por oocistos ou cistos do parasita. No entanto, um estudo recente identificou uma proteína específica dos esporozoítos (TgERP) que induz anticorpos e permite a diferenciação da infecção por oocistos da infecção por cistos teciduais em suínos, camundongos e humanos experimentalmente infectados, podendo ser uma ferramenta útil para detectarmos a fonte de infecção (HILL et al., 2011).

Segundo Alvarado-Esquivel et al., (2011) frutas e vegetais contaminados representam risco de infecção não apenas para seres humanos, como também para suínos que frequentemente se alimentam desses vegetais e frutas não lavados, e ocorre então a formação de cistos de *T. gondii* na carne dos suínos. Outros animais de produção, também são comumente infectados pelo *T. gondii* nos quais este pode permanecer viável por anos sob a forma de cistos teciduais em todas as suas porções comestíveis. Essa carne pode ser considerada com uma importante via de transmissão para seres humanos (HILL; DUBEY, 2002; DUBEY et al., 2012b).

Segundo Dubey et al. (2005) e Cook et al. (2000), a ingestão de carne e produtos cárneos crus ou mal cozidos contendo cistos do *T. gondii* é a principal via de transmissão para seres humanos em algumas localidades. O manuseio de carnes cruas por donas de casa e magarefes tem sido descrito como

um fator de risco de aquisição da infecção (JAMRA, 1969; ISHIZUKA, 1978; AMENDOEIRA, 1995; SOUZA, 1995; DAGUER et al., 2004; MILLAR et al., 2007;)

As principais técnicas utilizadas para o diagnóstico direto do *T. gondii* em tecidos e sangue de animais, incluindo os suínos, são o bioensaio em camundongos, PCR e a PCR real-time que apresenta boa sensibilidade, detectando DNA a partir de apenas quatro bradizoítos (YAI et al., 2003; CHABBERT et al., 2004; GARCIA et al. 2006b; TSUTSUI et al. 2007; JAUREGUI, et al., 2001). Apesar da PCR ser uma técnica mais rápida e menos trabalhosa, o bioensaio em camundongos é considerado o padrão ouro para isolamento, pois detecta o parasita viável, capaz de causar doença, e a PCR detecta o DNA do parasita, mas não sua viabilidade (DIAS et al., 2005).

O diagnóstico sorológico pode ser realizado através do MAT (Teste de Aglutinação Modificado) que detecta IgG e da RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e do ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) que detectam IgG e IgM. A RIFI detecta suínos como positivos com sete dias após o desafio, enquanto o ELISA, e o MAT detectam após 14 e 21 dias, respectivamente (GARCIA, et. al. 2006a).

Apesar de muitas espécies de animais de produção se infectarem com *T. gondii*, não são todas que apresentam a mesma importância em saúde pública. Bovinos e bubalinos, em algumas áreas, apresentam mais de 90% de soropositividade para *T. gondii*, porém estas carnes dificilmente contém cistos do parasita (DUBEY; JONES, 2008). Quando naturalmente infectados, a maioria das espécies que são soropositivas para *T. gondii* apresentam risco de possuir o parasita na carne, com exceção dos bovinos (TENTER et al., 2000), nestes o parasita é eliminado ou reduzido a níveis indetectáveis em poucas semanas (DUBEY, 1983; 1986b).

## 2.1 TOXOPLASMA GONDII EM SUÍNOS

Entre os animais destinados à alimentação humana, suínos, ovinos, e caprinos são mais propensos à infecção do que equinos e bovinos. (NAVARRO et al., 1992; DUBEY, 1994). Dentre as espécies de carnes comercializadas, Dubey (1991), relata que a carne suína é que apresenta o maior risco de infecção para o homem nos EUA.

Os cistos teciduais podem permanecer viáveis na musculatura dos suínos por no mínimo 171 dias (DUBEY; MURRELL; FAYER, 1984), até 875 dias (DUBEY, 1988). No cérebro os cistos são esféricos e seu diâmetro geralmente não ultrapassa 70  $\mu\text{m}$ . Por outro lado os cistos intramusculares possuem formato mais alongado e podem alcançar 100  $\mu\text{m}$  (DUBEY, 1998b).

Desde 1990, demanda por carne suína orgânica aumenta cerca de 20% a cada ano (JONES; DUBEY, 2012). No sistema de criação orgânico, os suínos são criados extensivamente, em contato com o meio ambiente o que favorece a infecção dos hospedeiros intermediários (COOK et al., 2000; VAN DER GIESSEN et al., 2007).

Kijlstra et al. (2008) relataram que suínos podem se infectar pela ingestão de roedores e seus cadáveres, visto que o suíno é um animal onívoro. A soroprevalência varia de acordo com outros fatores, como: o controle de roedores, e métodos de descarte de carcaças de suínos mortos. Quando não há um programa de controle de roedores realizado por profissionais qualificados, e quando carcaças suínas são enterradas ou deixadas para compostagem, aumenta-se o risco de infecção na propriedade (HILL et al., 2010).

Em um estudo no México, Alvarado-Esquivel et al., (2011) constataram um maior número de animais sororreagentes nas criações tipo “fundo de quintal”, com número médio de três animais. Em granjas modernas e mais tecnificadas os suínos são confinados e existe um controle sistemático de roedores, restrição de acesso dos felinos à granja além de outras medidas de biossegurança. Devido a esses fatores, observa-se uma redução no risco de infecção dos suínos e consequentemente dos humanos (DUBEY, 1996; DAVIES, 2011).

No Brasil, o risco de adquirir a infecção pelo consumo de carnes cruas ou mal cozidas, é relatado por Vidotto et al. (1990) e Navarro et al. (1992). Navarro et al. (1992) demonstraram esse risco, ao observarem que mais de 20% das amostras de carne suína, oriundas de um rebanho com 37% de sororeagentes, estavam contaminadas com *T. gondii* viáveis (VIDOTTO et al., 1990).

A maior parte dos estudos pesquisando *T. gondii* em suínos utilizou amostras de tecidos coletadas durante o abate, em seguida essas carnes são submetidas a tratamentos como salga, e outros que podem afetar a viabilidade dos cistos teciduais e, portanto não são base para estabelecer o risco proveniente da carne de acordo com Dubey (2009). Por outro lado, salame e embutidos frescos que

também são salgados foram identificados como fator de risco (COOK et al., 2000; BUFFOLANO et al., 1996; BARIL et al., 1996; WARNEKULASURIYA et al., 1998).

O Quadro 1 apresenta alguns trabalhos de isolamento do parasita a partir tecidos de suínos naturalmente infectados. O Quadro 2 apresenta estudos recentes soro-ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em diversos países, e o Quadro 3 mostra a ocorrência de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em suínos em diferentes estados brasileiros.

**Quadro 1** – Isolamento de *T. gondii* a partir de tecidos de suínos naturalmente infectados no Brasil

Estado	N	nº de isolados	Referência
Bahia	20	5	Bezerra et al. (2012a)
Minas Gerais	98	4	Schenk, Lima, Schenk (1977)
Paraná	149	1	Dias et al. (2005)
Rio Grande do Norte	18	5	Clementino-Andrade et al. (2013)
Rio de Janeiro	12	6	Frazão-Teixeira et al. (2006)
	19	5	Frazão-Teixeira et al. (2011)
São Paulo	83	5	Jamra et al. (1969)
	25	8	Amaral e Macruz (1968)
	28	7	Dos Santos et al (2005)

Fonte: a própria autora

**Quadro 2** – Soro-ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos em diversos países de acordo com estudos recentes.

<b>País</b>	<b>N</b>	<b>% Positivo</b>	<b>Teste</b>	<b>Referência</b>
Argentina	230	37,8	MAT	Venturini et al. (2004).
Alemanha	1967	16,5	RIFI	Damriyasa et al. (2004)
	1500	9,3	ELISA	Damriyasa e Bauer (2005)
Canadá	6048	0,74	ELISA	Poljak et al. (2008)
Chile	340	8,8	ELISA	Muñoz-Zanzi et al.(2012)
Espanha	2970	16,6	MAT	García-Bocanegra et al. (2010)
Eslováquia	970	2,16	ELISA	Turcekova et al. (2013)
Estados Unidos da América	55	92,7	MAT	Dubey et al. (2002)
	616	4,1	ELISA	Gebreyes et al. (2008)
Holanda	402	2,74	ELISA	Van der Giessen et al. (2007)
Itália	3472	10,4	ELISA	Villari et al. (2009)
	960	16,14	RIFI	Veronesi et al. (2010)
Malásia	100	0	RIFI	Chandrawathani et al.(2008)
México	519	9,1	MAT	Alvarado-Esquivel et al. (2011)
Nepal	742	11,7	ELISA	Devleesschauwer et al. (2013)
Polônia	106	26,4	MAT	Sroka et al. (2008)
Portugal	333	15,6	MAT	De Sousa et al. (2006)
	254	9,8	MAT	Lopes et al. (2013)
Sérvia	488	9,2	MAT	Klun et al. (2011)
Suiça	270	23,3	ELISA	Berger-Schoch et al.(2011)

**Fonte:** a própria autora



**Quadro 3** – Soro-ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos em diferentes Estados do Brasil.

Estados	N	% Positivo	Teste	Cut-off	Referência
Amazônia	80	37,5	MAT	25	Cavalcante et al. (2006).
Bahia	465	18,27	ELISA	16	Bezerra et al. (2009)
Minas Gerais	198	90,4	RIFI	16	Guimarães et al. (1992)
Paraíba	130	36,2	RIFI	50	Azevedo et al.(2010)
Paraná	1131	37,84	RIFI	64	Vidotto et al. (1990)
	267	24	RIFI	64	Garcia et al. (1999)
	521	15,35	RIFI	64	Tsutsui et al. (2003)
	424	4	RIFI	64	Carletti et al. (2005)
	117	8,54	RIFI	64	De Moura et al. (2007)
	304	7,2	MAT	64	Da Silva et al. (2008)
	408	25,5	RIFI	64	Millar et al. (2008)
Pernambuco	606	13,4	MAT	25	Piassa et al. (2010)
	259	4,7	RIFI	64	Caporali et al. (2005)
	Rio de Janeiro	406	7,64	RIFI	64
Rio Grande do Sul	200	18	IHA	64	Grunspan et al.(1995)
São Paulo	300	9,6	ELISA	NC*	Suárez-Aranda et al. (2000)
	286	17	MAT	25	Dos Santos et al.(2005)
	213	8,5	RIFI	64	Lima et al. (2007)

\*NC: não citado.

Fonte: a própria autora

Quanto à prevalência da toxoplasmose suína, os valores variam muito; de 4 a 90,4% de acordo com a área, categoria dos animais, método diagnóstico utilizado, ponto de corte, fatores climáticos, socioeconômicos e culturais (SANTOS, 2005; FIALHO; TEIXEIRA; ARAÚJO, 2009).

## 2.2 PREVENÇÃO DA INFECÇÃO

Para prevenção da infecção por *T. gondii* gestantes e imunossuprimidos devem usar luvas quando forem praticar jardinagem ou entrar em contato com terra ou areia, devido à possível presença de fezes de gatos contendo oocistos. Também é importante recolher as fezes dos felinos diariamente, evitando a esporulação dos oocistos (JONES; DUBEY, 2012). As carnes devem ser cozidas adequadamente, frutas e vegetais devem ser muito bem lavados, inclusive tábuas, pratos, utensílios e mãos que entraram em contato com carnes cruas, frutas, verduras e vegetais durante seu preparo devem ser lavados com água e sabão. Leite deve ser pasteurizado ou fervido antes do consumo, especialmente o leite de cabra para inativar os taquizoítos (TENTER et al., 2000).

Os embutidos devem ser tratados com NaCl na concentração de 2 a 2,5% por 48 horas, ou submetidos ao congelamento a -20°C por três dias para inativar os cistos teciduais (NAVARRO et al., 1992; DJURKOVIC-DJAKOVIC; MILENKOVIC, 2000). De acordo com Kijlstra e Jongert (2008), o congelamento pode influenciar as características sensoriais da carne levando o consumidor a não realizá-lo, e que o cozimento é o método mais seguro para inativar o parasita, mas a responsabilidade é transferida para o consumidor.

Devido a importância da carne suína como via de transmissão de *T. gondii* para os humanos estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver uma vacina para diminuir a formação de cistos teciduais na carne dos suínos e assim prevenir a infecção em humanos (DA CUNHA et al., 2012; GARCIA et al., 2005).

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE TOXOPLASMA GONDII

Visto a importância da toxoplasmose suína na saúde pública, muitos estudos buscam comparar geneticamente os isolados a partir de suínos com os isolados humanos para assim compreender melhor a transmissão (DUBEY, 2009b).

Inicialmente a população de *T. gondii* foi classificada como sendo de baixa variabilidade genética, com estrutura altamente clonal, consistindo em três linhagens genéticas, tipo I, II e III, no entanto estes estudos foram feitos a partir de isolados obtidos da América do Norte e Europa (HOWE, SIBLEY, 1995;

AJZENBERG et al., 2002). Trabalhos utilizando novos marcadores moleculares revelaram uma grande diversidade genética do parasita, constatou-se que os isolados do Brasil e da América do Sul são diferentes geneticamente dos isolados europeus e norte americanos (LEHMANN et al., 2006; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; PENA et al., 2008)

Recentemente foi descoberta uma quarta linhagem clonal, conhecida como tipo 12, encontrada principalmente em animais selvagens na América do Norte. Esta nova linhagem parece ter uma limitada diversidade genética nesses animais (KHAN et al., 2011).

A PCR-RFLP é a análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA, devido à clivagem do DNA feita por enzimas de restrição, que reconhecem uma sequência específica de quatro a oito pares de bases. Possui capacidade de diferenciar os alelos atípicos (u-1 e u-2) e detectar a combinação dos alelos de diferentes arquétipos, é uma técnica de fácil execução e têm sido empregada nas pesquisas para genotipagem (SU, ZHANG e DUBEY, 2006; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011).

Dubey e Su (2009) e Velmurugan, Su e Dubey (2009) a partir da técnica de PCR-RFLP, utilizando 10 marcadores moleculares para genotipagem de isolados de *T. gondii* em suínos, concluíram que predominam as linhagens clonais II e III, e que as cepas atípicas são raras nos EUA. A diversidade genética no Brasil foi constatada em isolados de galinhas, quando foram identificados 58 genótipos diferentes em 149 isolados, enquanto que, nos EUA identificaram 18 genótipos a partir de 253 isolados de *T. gondii* em galinhas (DUBEY; SU, 2009).

No Brasil, a partir da PCR-RFLP utilizando o marcador SAG2 Dos Santos et al. (2005) analisaram sete isolados de *T.gondii* em suínos, dois foram identificados como tipo I e cinco como tipo III. Em Portugal, foram genotipados 15 isolados de *T. gondii*, sendo identificados os tipos II e III (DE SOUSA et al., 2006).

Genótipos encontrados em suínos, foram também encontrados em outras espécies, como gatos e galinhas no Brasil, foram identificados três genótipos distintos denominados #1, #2 e #4 (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011). No estado de São Paulo, a análise genotípica a partir da PCR-RFLP de 20 isolados de tecidos de pacientes com toxoplasmose, identificou três genótipos (#6, #65 e #71), e 18 dos 20 isolados foram identificados como #65, sugerindo a associação deste genótipo com a toxoplasmose humana (FERREIRA et al., 2011; DUBEY et al., 2012a).

No Nordeste do Brasil, a partir da análise de 20 cérebros de suínos, foram obtidos 11 isolados que não se enquadraram nas linhagens clonais I, II e III e nem mesmo nos genótipos previamente descritos em suínos no Brasil (BEZERRA et al., 2012b).

Na Região Sul, genótipos atípicos encontrados nos suínos podem ter relação com apresentações incomuns da toxoplasmose ocular. A toxoplasmose é a causa mais comum de uveíte infecciosa no Brasil, principalmente em populações que tem o hábito de consumir a carne malcozida (BELFORT-NETO et al., 2007).

Não existem muitos trabalhos de genotipagem de isolados de *T. gondii* no Brasil, e mais estudos devem ser realizados nas diferentes regiões do país, e também com diferentes espécies animais com o objetivo de compreender a diversidade molecular e a circulação do parasita (BEZERRA et al., 2012b; DUBEY et al., 2008). Além disso, é necessário o desenvolvimento de novos marcadores genéticos para uso na PCR-RFLP que possam classificar adequadamente os isolados atípicos frequentemente encontrados no Brasil (BEZERRA et al., 2012b).

## REFERÊNCIAS

- ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de carne suína. Acesso em 15 de novembro de 2013, disponível na internet [www.abipecs.org.br](http://www.abipecs.org.br). 2013.
- AJZENBERG, D.; BANULS, A.L.; TYBAYRENC, M.; DARDÉ, M.L.; Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorfism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**. v. 32, p. 27-38, 2002.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; GARCÍA MACHADO, C.; ALVARADO-ESQUIVEL D.; GONZÁLEZ-SALAZAR, A.; BRIONES-FRAIRE, C.; VITELA-CORRALES, J.; VILLENA, I.; DUBEY, J.P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico. **The Journal of Parasitology** v. 97, p. 616-619, 2011.
- AMARAL, V.; MACRUZ, R. Pesquisa de formas encistadas do *Toxoplasma gondii* em diafragmas de suínos clinicamente sadios, abatidos em matadouros de São Paulo – Capital. **Ciência e Cultura** v. 20, p.308, 1968.
- AMARAL, V.; MACRUZ, R. *Toxoplasma gondii*, isolamento de amostras a partir de diafragmas de suínos clinicamente sadios, abatidos em matadouros de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 47-54, 1969.
- AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 155, n. 4, p. 224-225, 1995.
- APT, W.; THIERMANN, E.; NIEDMANN, G.; PASMNIK, S. *Toxoplasmosis*. **Santiago: Universidad de Chile**, 1973.
- ASSADI-RAD, A. M.; NEW, J. C.; PATTON, S. Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tennessee. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.57, p.289-297, 1995
- AZEVEDO, S.S.; PENA, H.F.J.; ALVES, C.J.; GUIMARÃES, A.A.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** (Online), v. 19, p. 80-84, 2010.
- BARIL, L.; ANCELLE, T.; THULLIEZ, P.; GOULET, V.; TIRARD, V.; CARME, B. Facteurs de risque d'aquisition de la toxoplasmose chez les femmes enceintes en 1995 (France). **Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire** v.16, p.73-75, 1996.
- BAYARRI, S.; GRACIA, M. J.; LÁZARO, R.; PÉREZ-ARQUILLUÉ, C. E HERRERA A. *Toxoplasma gondii* in Meat and Food Safety Implications - A Review, **Zoonosis**, Dr. Jacob Lorenzo-Morales. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0479-7, InTech, Available from:<http://www.intechopen.com/books/zoonosis/toxoplasma-gondii-in-meat-and-food-safety-implications-a-review>. 2012
- BELFORT-NETO, R.; NUSSENBLATT, V.; RIZZO, L.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; NUSSENBLATT, R.; KHAN, A.; SIBLEY, L.D.; BELFORT, 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, p. 111-114, 2007.

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

BEZERRA, R. A.; CARVALHO, F. S.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, D. S.; SILVA, F. L.; WENCESLAU, A. A. ; ALBUQUERQUE, G. R. Comparison of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs. **Parasitology Research** v.110, p.509–514, 2012a.

BEZERRA, R. A.; CARVALHO, F. S.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, D. S.; MACIEL, B.M.; WENCESLAU, A.A.; LOPES, C.W.G.; ALBUQUERQUE, G.R. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 189, p. 153-161, 2012b.

BOWIE W.R.; KING, A.S.; WERKER, D.H.; ISAAC-RENTON, J.; BELL, A.; ENG, S. B.; MARION, S. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **The Lancet**. V.350, p.173-177, 1997.

BOYER, K.M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N.; SWISHER, C. M.D.; MACK, D.; REMINGTON, J.; SHAWN WITHERS, M.D.; MEIER, P.; RIMA McLeod. 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, p. 564-571, 2005.

BUFFOLANO, W.; GILBERT, R.E.; HOLLAND, F.J.; FRATTA, D.; PALUMBO, F.; ADES, A.E. Risk factors for recent toxoplasma infection in pregnant women in Naples. **Epidemiology and Infection** v.116, p.347-351, 1996.

CAPORALI, E. H. G.; DA SILVA, A. V.; MENDONÇA, A. O.; LANGONI, H. Comparação de métodos para determinação da prevalência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em suínos dos Estados de São Paulo e Pernambuco – Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** v. 8, p. 19–24, 2005.

CARLETTI, R.T.; FREIRE, R.L.; SHIMADA, M.T.; RUFFOLO, B.B.; BEGALE, L.P.; LOPES, F.M.R.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection among slaughtered swines in Paraná State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 563-568, out./dez. 2005

CAVALCANTE, G.T.; AGUIAR, D.M.; CHIEBAO, D.; DUBEY, J.P.; RUIZ, V.L.A.; DIAS, R.A.; CAMARGO, L.M.A.; LABRUNA, M.B., GENNARI, S.M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural western Amazon, Brasil. **Journal of Parasitology**. v. 92, p. 863-864, 2006.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, **Recommendations regarding selected conditions affecting women's health**. MMWR 49 (No. RR-2): 59-75. 2000. MUNDAY, B.L., Serological evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep. **Research in Veterinary Science**. v.13, p.100–102, 1972.

CENCI-GOGA, B.T.; ROSSITO, P.V.; SECHI, P.; MCCRINDLE, C.M.E.; CULLOR, J.S. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. **Foodborne pathogens and disease**. v.8, n. 7, p.751-762. 2011.

CHABBERT, E.; LACHAUD L.; CROBU L.; BASTIEN P. Comparison of Two Widely Used PCR Primer Systems for Detection of *Toxoplasma* in Amniotic Fluid, Blood, and Tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p.1719-1722, 2004.

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

CHINCHILLA, M.; GUERRERO, O.; CASTRO, A.; SABAH, J. Cockroaches as transport hosts of protozoan *Toxoplasma gondii*. **Revista de Biología Tropical**, v. 42, p. 329-331, 1994.

CLEMENTINO- ANDRADE, M.M.; PINHEIRO, B.V.; CUNHA, M.M.; CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE NETO, V.F.; VITOR, R.W.A. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science** v.94, p.587–589, 2013.

COOK, A. J. C.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P.A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A. E.; DUNN, D. T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. **British Medical Journal**, London, v. 321, n.7254, p.142-147, 2000.

DA CUNHA, I.A.L.; ZULPO, D.L.; BOGADO, A.L.G.; BARROS, L.D.; TARODA, A.; IGARASHI, M.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. **Veterinary Parasitology**. v. 186, p. 216-221, 2012

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

DAMRIYASA, I.M.; BAUER, C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sows in Munsterland, Germany. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.** V.112, p.223, 2005.

DAMRIYASA, I.M.; BAUER, C.; EDELHOFER, R.; FAILING, K.; LIND, P.; PETERSEN, E.; SCHARES, G.; TENTER, A.M.; VOLMER, R.; ZAHNER, H. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. **Veterinary Parasitology** v.126, p.271–286, 2004.

DA SILVA, A.V.; BOARETO, H.; ISBRECHT, F.B.; DA SILVA, R.C.; LANGONI, H. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da região oeste do Paraná, Brasil. **Veterinária e Zootecnia** v.15, p.263–266, 2008.

DAVIES, P.R. Intensive swine production and pork safety. **Foodborne pathogens and disease**. v. 8, n. 2, p. 189-201. 2011.

DE MOURA, A.B., OSAKI, S.C., ZULPO, D.L., MARANA, E.R.M., Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v.16, p.54–56. 2007.

DE SOUSA, S.; AJZENBERG, D. ; CANADA, N.; FREIRE, L.; CORREIA 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, p.133–136, 2006.

DEVLEESSCHAUWER, B.;PRUVOT, M.; JOSHI, D.D.; DE CRAEYE, S; JENNES, M.; ALE, A.; WELINSKI, A.; LAMA, S.; ARYAL, A.; VICTOR, B; DUCHATEAU,L.; SPEYBROECK,N.; VERCRUYSSSE, J.; DORNY, P. Seroprevalence of Zoonotic Parasites in Pigs Slaughtered in the Kathmandu Valley of Nepal. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** v. 13, n. 12, p.872-876, 2013.

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

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

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

DU, F., FENG, H.L., NIE, H., TU, P., ZHANG, Q.L., HU, M., ZHOU, Y.Q, ZHAO, J.L., Survey on the contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in the soil of public parks of Wuhan, China. **Veterinary Parasitology**. v. 184, p. 141-146, 2012.

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

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in pigs. **Veterinary Parasitology**, v.19, p.181 -223, 1986a.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.22, p.177–202, 1986b.



DUBEY, J.P., Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 910-913, 1988.

DUBEY JP. National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. **Journal of parasitology** v.77, p.517–521, 1991.

DUBEY, J.P. Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis and other tissue cyst-forming of human and animals. In KRIER, J.P. **Parasitic Protozoa**. 2ed. San Diego: v.126, p.57-7, 2004.Academic Press. 1993.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593–1598, 1994.

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**. v.64, p.65-70,1996

DUBEY, J.P., *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. **The Journal of Parasitology**. v.84, n.4, p.862–865, 1998a.

DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998b.

DUBEY, J.P., Oocysts shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **The Journal of Parasitology**. v.87, p. 215–219, 2001.

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

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. Second edition.CRC Press, Boca Raton, Florida, in press. 2009a.

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

DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**. v., p.1546–1549. 1993.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. **Veterinary Clinical Food Animal**. v. 22, p. 645–671, 2006.

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

DUBEY, J.P.; MURRELL, K.D. ; FAYER, R. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p.1941–1943, 1984.

DUBEY, J.P.; WEIGEL, R.M.; SIEGEL, A.M.; THULLIEZ, P.; KITRON, U.D.; MITCHELL, M.A.; MANNELLI, A.; MATEUS-PINILLA, N.E.; SHEN, S.K.; KWOK,

O.C.H. E TODD, K.S. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **Journal of Parasitology**, v.81, 723–729, 1995.

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

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; KAWABATA, H.H.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **The journal of Parasitology**. v. 90, p. 721-726, 2004.

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

DUBEY, J.P.; LAGO, E.G.; GENNARI, S.M.; SU, C.; JONES, J.L., Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v.139, p. 1375-142, 2012a.

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

ELBEZ-RUBINSTEIN, A., AJZENBERG, D., DARDE, M.L., COHEN, R., DUMETRE, A., YERA, H., GONDON, E., JANAUD, J.C., THULLIEZ, P., Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **Journal of Infection Disease**. v.199, p. 280-285, 2009.

EL-TRAS, W.F.; TAYEL, A.A.; EL-KADY, N.N. Source diversity of *Toxoplasma gondii* infection during meal preparation. **Journal of Food Safety**. v.32, p. 1-5, 2011.

FARREL, R. L.; DOCTON, F. L.; CHAMBERLAIN, D. M.; COLE, C. R. Toxoplasmosis I. *Toxoplasma* isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 13, n. 47, p. 181-184, 1952.

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

FIALHO, C.G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAÚJO, F.A.P. Toxoplasmoses animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, n.1, p. 1-23, 2009.

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, p.33–36, 2006.

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 ,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.

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

GARCIA, J.L., GENNARI, S.M., NAVARRO, I.T., MACHADO, R.Z., SINHORINI, I.L., FREIRE, R.L., MARANA, E.R., TSUTSUI, V., CONTENTE, A.P., BEGALE, L.P. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology** v.129, p.209–217, 2005.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O. ; GENNARI, S.M.; MACHADO, R. Z.; PEREIRA, A. B. L.; SINHORINI, I.L. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, p.100–105, 2006a.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S.M.; MACHADO, R.Z. *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 4, p. 267–271, 2006b.

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, p.421–426, 2010.

GEBREYES, W.A.; BAHNSON, P.B.; FUNK, J.A.; MCKEAN, J.; PATCHANEE, P. Seroprevalence of Trichinella, Toxoplasma, and Salmonella in antimicrobial- free and conventional swine production systems. **Foodborne Pathogens Disease**. v.5, p. 199, 2008.

GILBERT, R.E.; STANFORD, M.R. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? **British Journal of Ophthalmology**. v. 84, p.224–226, 1999.

GRUNSPAN, E.D.; MOREIRA, W.S.; EDELWEISS, M.I.A., ULON, S.N., DAUDT, H.M.L. Imunoglobulinas antitoxoplásmicas e retinocoroidite em suínos. **Ciência Rural** v.25, p.261–264, 1995.

GUIMARÃES, A.M.; RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; DE ALMEIDA, T.M.B.; Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da raça Piau. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 44, p.69–71, 1992.

HEJLÍČEK, K. e LITERÁK, I. Prevalence of toxoplasmosis in pigs in the region of South Bohemia. **Acta Veterinaria Brno**, v.62, p.159-166, 1993.

HILL, D. E., DUBEY, J. P., *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, p. 634-640, 2002.

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

HILL, D.E.; HALEY, C.; WAGNER, B.; GAMBLE, H.R.; DUBEY, J.P. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the U.S. swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). **Zoonosis Public Health**; v.57, n.1, p.53- 59, 2010.

HILL, D.E.; COOS, C.;DUBEY, J.P.;WROBLEWSKI, K.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; MUÑOZ-ZANZI, C.; MUI, E.; WITHERS, S.; BOYER, K.; HERMES, G.; COYNE, J.; JADIGS, F.; BURNETT, A.; McLEOD, P.; MORTON, H.; ROBINSON, D.; Mc LEOD, R., TOXOPLASMOSIS STUDY GROUP. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology** v.97, n.2, p.328–337, 2011.

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

ISHIZUKA, M. M. Avaliação da frequência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta (anti-IgG), em magarefes. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 155-158, 1978.

JACOBS, J.; 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.

JAMRA, L. M. F.; DEANE, M. P.; GUIMARÃES, E. C. On the isolation of *Toxoplasma gondii* from human food of animal origin: partial results in the city of São Paulo (Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 169-176, 1969.

JAUREGUI, L.H.; HIGGINS, J.A., ZARLENGA; D.S.; DUBEY, J.P.; LUNNEY, J. K. Development of a real-time PCR assay for the detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology** v.39 p.2065–2071, 2001.

JONES, J.L. e DUBEY, J.P., Waterborne Toxoplasmosis- Recent developments. **Experimental Parasitology** v.124, p.10-25, 2010.

JONES, J.L. e DUBEY, J.P., Foodborne Toxoplasmosis. **Food Safety** v.55, n.6, p.845-851, 2012.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves D.P. (Ed.) **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 494p. 2005.

KHAN, A.; DUBEY, J.P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**. v.41 p. 645-655. 2011.

KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; CORNELISSEN, J.; DE CRAEYE, S.; VEREIJKEN, P.; JONGERT E. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs **Veterinary Parasitology** v.156, p.183–190, 2008.

KLUN, I.; VUJANIC, M.; YERA, H.; NIKOLIC, A.; IVOVIC, V.; BOBIC, B.; BRADONJIC, S.; DUPOUY-CAMET, J.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O. *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. **Veterinary Research**, v.42, p.2-6, n.17, 2011.

LEHMANN, T.; MARCET, P.L.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.R.; DUBEY, J.P.; Globalization and the populations structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.v.103, p. p.11423-11428, 2006.

LIMA, J. N.; FELICIO, P. S.; FRANCO, P. M.; LARA, M. C. C. S.; CUNHA, E. M. S.; QUAGLIERI, D.; GOMES, L. O.; VILLABOBOS, E. M. C. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) em suínos abatidos em matadouros no estado de São Paulo, SP, Brasil. **O Biológico** v.67, n. 1, 25. 2007.

LOPES, A. P.; DUBEY, J.P., 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 Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 4, p. 351-353, out.-dez. 2011

LUFT, B.J. e REMINGTON, J.S., Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Disease** 15: 211–222. 1992.

MAENZ, M., SCHLÜTER, D.; LIESENFELD, O.; SCHARES, G; GROSS, U.; PLEYER, U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease, **Progress in Retinal and Eye Research** v. 39. p.77-106. 2014

MATEUS-PINILLA, N.E.; DUBEY, J.P.; CHOROMANSKI, L.; WEIGEL, R.M. A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. **The Journal of Parasitology**. V.85, 855–860.1999.

- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 5, No. 5, p. 607-625. September-October. 1999
- METSIS, A.; PETTSERSEN, E. *Toxoplasma gondii*: characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 Kda with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. **Experimental Parasitology** v.81, p.472-479, 1995.
- MILLAR, P. R.; DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; SOBREIRO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. *Toxoplasma gondii*: estudo soropidemiológico de suínos da região Sudoeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V.28: p.15-18. 2008
- MONTOYA J.G.; LIESENFELD O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- MUÑOZ-ZANZI, C.; TAMAYO, R. BALBOA, J.; HILL, D.E. Detection of Oocyst-Associated Toxoplasmosis in Swine from Southern Chile. *Zoonoses and Public Health*, V.59, P. 389–392. 2012,
- NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii*: Isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, Pr. **Semina**, Londrina, v.13, p.15-18, 1992.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L., Sur une infection a corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. **Compets Rendus de l'Académie des Science** v. 147, p.763. 1908.
- OMATA, Y.; DILORENZO, C.; VENTURINI, C.; VENTURINI, L.; IGARASHI, I.; SAITO, A. e SUZUKI, N. Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 51 (3–4), 205–210. 1994.
- PARANÁ- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura\\_2012\\_2013.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2012_2013.pdf) acesso em 11/02/2014.
- PENA, H.J.F.; 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.
- PIASSA, F. R.; DE ARAÚJO, J.B ; DA ROSA, R.C.; MATTEI, R. J; DA SILVA, R. C.; LANGONI, H.; DA SILVA, A. 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**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 152-156, jul.-set. 2010
- POLJAK, Z.; DEWEY, C.E.; FRIENDSHIP, R.M.; MARTIN, S.W.; CHRISTENSEN, J.; OJKIC, D.; WU, J.; CHOW, E. Pig and herd level prevalence of *Toxoplasma gondii* in

Ontario finisher pigs in 2001, 2003, and 2004. **Canadian Journal of Veterinary Research** v.72, p.303. 2008.

SANTOS, C.B.A. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* em suínos no estado de São Paulo**. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Ciências Agrárias e Veterinária. 53 folhas, Tese (Doutorado) 2005.

SCHENK, M. A. M.; LIMA, J. D.; VIANA, F. C. Frequência da toxoplasmose em suínos abatidos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 28, n. 3, p. 261-266, 1976.

SCHENK, M. A. M.; LIMA, J. D.; SCHENK, J. A. P. Isolamento de *Toxoplasma gondii* em suínos do estado de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais** v.29, p.25–30. 1977.

SILVA, J. M. L. Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Rural de Minas Gerais**, v. 12, p. 425-428, 1959.

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

SPLENDRE, A. Um nuovo protozoa parassita dei conigli: incontrato nell'lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti kala-azar dell'uomo. **Revista Sociedade Science**. v.3, p. 109-112, 1908.

SROKA, J., CENCEK, T., ZIOMKO, I., KARAMON, J., ZWOLINSKI, J., Preliminary assessment of ELISA, MAT, and LAT for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy** v.52, p.545–549. 2008

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.

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

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

TORREY, E. F.; BARTKO, J. J. ; YOLKEN, R. H. *Toxoplasma gondii* and Other Risk Factors for Schizophrenia: An Update **Schizophrenia Bulletin** v. 38 no. 3 p. 642–647, 2012.

TURČEKOVÁ, L.; ANTOLOVÁ, D.; REITEROVÁ, K.; SPIŠÁK F. Occurrence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs. **Acta Parasitologica**, v.58 n.3, p. 361–366. 2013.

TSUTSUI, V.S.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; FREITAS, J.C.; PRUDÊNCIO, L.B.; DELBEM, A.C.B.; MARANA, E.R.M. Soroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos do norte do Paraná-Brasil. **Arch of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 27-34, 2003.

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

U.S. Environmental Protection Agency, 2012. Disponível em <http://www.epa.gov/oecaagct/ag101/printpork.html>. Acesso em 25/01/2014.

VAN DER GIESSEN, J.; FONVILLE, M.; BOUWKNEGT, M.; LANGELAAR, M.; VOLLEMA, A. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands- Short communication. **Veterinary Parasitology** v.148 p.371–374. 2007.

VENTURINI, M.C.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, L.; RAMBEAUD, M. BASSO, W.; MACHUCA, M.; UNZAGA, J.M.; PERFUMO, C.J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and outdoor farm in Argentina. **Veterinary Parasitology**. v124,p. 161asito 2004.

VERONESI, F.; RANUCCI, D.; BRANCIARI, R.; MIRAGLIA, D.; MAMMOLI, R.; FIORETTI, D. P. Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection on Finishing Swine Reared in the Umbria Region, Central Italy. **Zoonoses and Public Health**. V.58 p.178–184. 2011

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

VILLARI, S.; VESCO, G.; PETERSEN, E.; CRISPO, A.; BUFFOLANO, W. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. **Veterinary Parasitology** v.161, p.1-8. 2009.

WALLACE, G.D., Serologic and epidemiologic observations on toxoplasmosis on three Pacific Atolls. **American Journal of Epidemiology**. v. 90, p.103–111, 1969.

WARNEKULASURIYA, M.R.; JOHNSON, J.D.; HOLLIMAN, R.E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology**. v.45, p. 211-5. 1998.

WEINMAN, D. e CHANDLER A.H. Toxoplasmosis in swine and rodents: reciprocal oral infection and potential human hazard. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**.; v. 87, p. 211-6, 1954.



WEINMAN, D. e CHANDLER, A.H. Toxoplasmosis in man and swine- An investigation of the possible relationship. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V. 161, p. 229-232, 1956

YAI, L.E.O.; VIANNA, M.C.B.; SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R.L., RICHTZNHAIN, L.; GENNARI, S.M. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 227-234, 2003.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ocorrência de *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos em estabelecimentos com Inspeção (Federal e Estadual) na região de Londrina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos utilizando os testes de RIFI e MAT em paralelo.
- Isolar *Toxoplasma gondii* a partir de um pool de tecidos por meio do bioensaio em camundongos.
- Caracterizar geneticamente os isolados obtidos por meio da técnica de PCR- RFLP utilizando 11 marcadores genéticos.
- Comparar as técnicas de RIFI e MAT para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

#### 4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *TOXOPLASMA GONDII* EM SUÍNOS ORIUNDOS DE ABATEDOUROS.**

ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *TOXOPLASMA GONDII* EM SUÍNOS ORIUNDOS DE ABATEDOUROS.

**RESUMO:** O presente trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência, isolar e caracterizar genotipicamente cepas de *Toxoplasma gondii* de suínos abatidos na região de Londrina, estado do Paraná, Brasil. Foram coletados sangue e tecidos (coração, diafragma, fígado, língua e masseter) de 400 animais em dois abatedouros. Um no município de Londrina e outro no município de Rolândia, ambos com Serviço de Inspeção Oficial. As coletas foram realizadas entre agosto de 2012 a março de 2013. Os animais foram testados quanto a presença de anticorpos IgG anti-*T.gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Teste de Aglutinação Modificado (MAT), sendo considerados positivos títulos  $\geq 64$  em ambos os testes. Os animais 26 positivos sorologicamente (6,5%) tiveram seus tecidos submetidos ao bioensaio em camundongos para isolamento do parasita. Dentre esses, 18 isolados (69,23%) obtidos foram caracterizados por meio do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição-PCR (PCR-RFLP) utilizando 11 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico). Os resultados foram comparados e classificados de acordo com os genótipos presentes no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). A partir da análise genotípica, 15 isolados foram identificados como genótipo #206, três isolados não puderam ser determinados. Podemos concluir que a carne suína ainda apresenta riscos de transmissão do *T. gondii* para humanos devido ao número elevado de cepas isoladas, e pela primeira vez o genótipo #206 foi identificado em suínos no Brasil e no mundo.

**Palavras-chave:** Bioensaio. PCR-RFLP. Soroprevalência. Suínos

ISOLATION AND GENOTYPING OF *TOXOPLASMA GONDII* IN PORKS FROM SLAUGHTERHOUSES.

**ABSTRACT:** The present study aimed to determine the occurrence, isolate and genotypically characterized strains of *T. gondii* from pigs slaughtered in the region of Londrina, Paraná state, Brazil. Blood and tissues (heart, diaphragm, liver, tongue and masseter) from 400 animals were collected at two slaughterhouses. One in Londrina and one in the city of Rolândia, both with Official Inspection Service. Sampling was conducted from August 2012 to March 2013. The animals were tested for the presence of anti-*T. gondii* IgG antibodies by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) and the Modified Agglutination Test (MAT), were considered positive titers  $\geq 64$  in both tests. The 26 animals positive to serodiagnosis (6,5%) had their tissues subjected to bioassay in mice for isolation of the parasite. Among these 18 isolates (69,23%) were characterized by length polymorphism restriction fragment - PCR (PCR - RFLP) using 11 genetic markers (SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BtuB, GRA6, c22 - 8, c29 - 2, L358, PK1, and Apico). The results were compared and ranked according to the genotypes present in ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). From genotyped 15 isolates were identified as genotype # 206, three isolates could not be determined. We can conclude that pork still presents risks of transmission of *T. gondii* to humans because of the large number of strains, and for the first time # 206 genotype was identified in pigs in Brazil and worldwide.

**Keywords:** Bioassay. PCR - RFLP. Seroprevalence. Pigs

## 1 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório que infecta uma ampla variedade de hospedeiros, causando a toxoplasmose, uma zoonose de distribuição mundial (DUBEY; BEATTIE, 1988; BOOTHROYD et al., 1998).

A importância da toxoplasmose suína está relacionada principalmente à saúde pública, visto que estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de cistos em carne crua ou mal cozida e embutidos frescos é uma das mais importantes vias de transmissão do *T. gondii* para a população humana (JAMRA; DEANE; GUIMARÃES, 1969; NAVARRO et al, 1992; FIALHO; ARAÚJO, 2003; DUBEY, 2009).

A carne suína é a mais consumida não só *in natura*, mas também, seus derivados, bacon, linguiças, presunto e outros representando 43% do consumo mundial de carne por espécie (U.S.). Nos EUA, estima-se que ocorram 112.500 novos casos de toxoplasmose anualmente, *T. gondii* juntamente com *Salmonella* e *Listeria* chegam a ser responsáveis por 75% das mortes atribuídas às doenças de origem alimentar (MEAD, 1999).

No Brasil foram abatidos 32.252.355 suínos em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF), e mais de 580 milhões de toneladas foram exportadas para 60 países no ano de 2012. A região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) é a maior produtora, sendo responsável por mais de 50% de toda a produção brasileira (ABIPECS, 2012). O estado do Paraná é o 3º maior produtor nacional de suínos, com cerca de 5,45 milhões de cabeças, possui 22 abatedouros inscritos no SIF e 55 inscritos no SIP (Serviço de Inspeção Estadual), e estima-se que 31.000 propriedades tem produção regular e de carácter comercial (PARANÁ, 2013).

Visto que esse protozoário não pode ser detectado pelos atuais métodos de inspeção sanitária da carne (DUBEY; JONES, 2008), a prevenção, controle e conhecimento da epidemiologia são muito importantes para a saúde pública, e estudos avaliando as características genéticas desse parasita em carnes de suínos devem ser realizados. Estes podem elucidar melhor a cadeia epidemiológica do *T. gondii* e o papel do suíno na transmissão para os seres humanos.

Este trabalho teve como objetivo determinar a soro-ocorrência, isolar e caracterizar genotipicamente cepas de *T.gondii* de suínos abatidos para consumo humano na região de Londrina, estado do Paraná.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 ASPECTOS BIOÉTICOS**

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) nº206/12.

### **2.2 LOCAIS DAS COLETAS**

As coletas das amostras de sangue e tecidos animais foram realizadas em dois abatedouros na região de Londrina, Paraná com Serviço Oficial de Inspeção Federal (SIF) e Estadual (SIP) respectivamente.

### **2.3 COLETAS DAS AMOSTRAS**

Um total de 400 amostras de sangue e tecidos suínos (considerando uma frequência esperada de 50%, nível de significância de 5%, nível de confiança de 95%) (THRUSFIELD, 2005).

As coletas foram realizadas no período de Agosto de 2012 a Março de 2013, foram anotados dados de procedência dos suínos, sendo que eram animais de terminação provenientes de 12 propriedades localizadas nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil (Tabela 1).

Amostras de sangue de cada suíno foram coletadas no momento da sangria, acondicionadas em tubos estéreis de 15 ml (*falcon*). Os tecidos de cada animal (coração, diafragma, fígado, língua e masseter), foram identificados e acondicionados em sacos plásticos, armazenados em caixa isotérmica, e mantidos sob refrigeração, até o momento do início dos testes.

**Tabela 1** – Abatedouros de suínos selecionados na Região de Londrina, número de amostras coletadas, no período de agosto de 2012 a março de 2013.

Abatedouro e tipo de serviço de inspeção	Data da coleta	Cidade e Estado de origem dos Suínos	Nº de animais abatidos	Nº de animais coletados
A (SIF)*	30/08/2012	Castro, PR	120	19
	12/09/2012	Castro, PR	120	48
		Castro, PR	120	
	14/09/2012	São Lourenço do Oeste, SC	200	30
		São Domingos, SC	150	
03/10/2012	Toledo, PR	710	41	
B (SIP)**	18/10/2012	Castro, PR	128	50
	24/10/2012	Castro, PR	70	60
	24/10/2012	Sabáudia, PR	18	
	05/02/2013	Jaguariaíva, PR	180	42
	19/02/2013	Jaguariaíva, PR	180	55
	25/03/2013	Pirai do Sul, PR	100	55
Total			2096	400

\* Serviço de Inspeção Federal \*\* Serviço de Inspeção Estadual

## 2.4 TESTES SOROLÓGICOS

Os soros dos suínos foram submetidos à pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta e pelo Teste de Aglutinação Modificado, conforme metodologia descrita por Camargo (1964) e Desmots e Remington (1980) respectivamente. As amostras com títulos iguais ou maiores a 64 foram consideradas positivas.

### 2.4.1 Cepas de *Toxoplasma gondii*

Para a obtenção dos taquizoítos puros da amostra RH de *T. gondii* camundongos foram inoculados, pela via intraperitoneal, com 0,2 mL de uma suspensão de taquizoítos vivos ( $10^5$ / mL) em solução fisiológica estéril. Quarenta e oito horas após a inoculação o exsudato foi obtido por lavagem da cavidade peritoneal com 3 mL de solução fisiológica estéril. Para obtenção dos taquizoítos as amostras foram passadas duas vezes em agulha de 27G (13 x 0,3), para remoção de possíveis células do hospedeiro, e centrifugadas a 1250 x g, três vezes, em salina tamponada com fosfato (0,01M, pH 7,2) e o sedimento ressuspendido e

padronizado em  $10^9$  taquizoítos/ mL por contagem em câmara de Neubauer (LUNDÉN, 1995).

Esses taquizoítos foram utilizados como antígenos para a RIFI (Reação de Imunofluorescência indireta) e para o MAT (Teste de Aglutinação Modificada).

Para a análise genotípica foram utilizadas as cepas RH, ME49 e VEG como controles positivos representando os genótipos I, II, III bem como GT1, PGT, CTG, TgCgCa1, MAS, TgCatBr5, TgCatBr64 e TgRsCr1 representando os genótipos atípicos.

## 2.5 DIGESTÃO PÉPTICA E BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

Os suínos considerados positivos nos testes sorológicos tiveram suas amostras de tecidos pesadas, 10g de cada tecido (coração, diafragma, fígado, língua e masseter), formando um pool de 50g de tecidos suínos que foi submetido á digestão péptica e ao bioensaio em camundongos de acordo com técnica descrita por Dubey (1998). Para cada amostra três camundongos foram inoculados. Os camundongos inoculados foram observados diariamente e os que apresentaram sintomas (pêlos eriçados, lacrimejamento, emagrecimento, diarreia e distensão abdominal) foram eutanasiados para a coleta do líquido peritoneal e sangue para verificação da presença de taquizoítos.

No caso de morte do animal inoculado, além da coleta do líquido peritoneal, foi realizado impressão de cérebro, fígado e pulmão entre lâmina e lâminula, para a pesquisa de cistos ou taquizoítos através de microscopia. Os órgãos anteriormente citados foram macerados e reinoculados tanto na presença ou ausência de cistos ou taquizoítos. Após 45 dias da inoculação, os camundongos do bioensaio foram eutanasiados submetidos à pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pela RIFI, e considerados positivos os camundongos com títulos maiores ou iguais a 16. Também foi feita impressão de cérebro entre lâmina e lamínula para a pesquisa de cistos no exame microscópico.



## 2.6 EXTRAÇÃO DE DNA, E PCR

A partir dos isolados de *T. gondii* obtidos no bioensaio, seja na forma de cistos em cérebro ou taquizoítos em líquido peritoneal, fígado e pulmão foi então realizada a extração e purificação de DNA utilizando o kit comercial (PureLink™ Genomic DNA Kit, Invitrogen®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A amplificação do DNA de *T. gondii* foi feita conforme a técnica descrita por Homan et al. (2000). Foram utilizados os Primers Tox4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e Tox5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGG ATT) amplificando um fragmento de 529 pb (Gen-Bank No. AFI46527) de DNA *T. gondii*. A PCR foi feita utilizando uma mistura contendo 5 µl de DNA extraído, 20 µl (volume final volume de 25 µl) da mistura de 1.0 mM de cada primer, 100mM dNTP (Invitrogen, Life Technologies, USA), 60mM Tris-HCl (pH 9.0), 15mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.5U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, EUA). A amplificação do DNA do parasita foi feita no termociclador PTC-100 (MJ-Research), utilizando as seguintes condições nas reações cíclicas: 7 minutos a 94 °C para desnaturação no ciclo inicial, seguido por 35 ciclos por 1min a 94 °C para desnaturação, 1min a 55 °C para anelamento, e 1 min a 72 °C para extensão, uma extensão final de 10min a 72 °C. Alíquotas de cada PCR foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Controles positivo (DNA da cepa RH) e negativo (água mili-q estéril) foram incluídos em cada teste.

## 2.7 GENOTIPAGEM

A genotipagem foi feita por PCR-RFLP utilizando 11 marcadores genotípicos (SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico) como anteriormente descrito por Su, Zhang e Dubey, 2006; Pena et al., 2008.

A sequência de DNA alvo foi primeiro amplificada por PCR multiplex usando os primers externos para todos os marcadores, seguido por nested-PCR para marcadores individuais. Em seguida, os produtos de nested-PCR foram digeridos com as enzimas de restrição e as condições de temperatura e de tempo específica para cada marcador. Todos os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2,5 ou 3%, de acordo com o marcador, coradas com

Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®, USA) e visualizadas através do Safe Imager™ (Invitrogen®, EUA).

Os resultados foram identificados, comparados, e classificados de acordo com os genótipos presentes em ToxoDB em <http://toxodb.org/toxo/>

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) foram calculados utilizando o pacote estatístico disponível em: [http://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php).

Para a avaliação da concordância entre os resultados obtidos na RIFI e MAT foi determinado o coeficiente *Kappa* ( $k$ ). A interpretação do índice obtido foi realizada segundo Landis e Koch (1977), conforme abaixo:

- $0 < K < 0.20$ : Pobre;
- $0.21 < K < 0.40$ : Apropriada;
- $0.41 < K < 0.60$ : Moderada;
- $0.61 < K < 0.80$ : Boa;
- $0.81 < K < 1.00$ : Excelente.

## 3 RESULTADOS

Dos 400 soros de suínos examinados, 6,5% (26/400) foram positivos no MAT ou na RIFI. Dos 26 animais, 11 (2,75%) foram positivos em ambos testes, seis reagiram apenas à RIFI (1,5%), e nove apenas ao MAT (2,25%). A concordância *Kappa* entre os dois testes foi considerada moderada ( $k=0,57$  erro padrão = 0,0989; 95% IC: 0,3812-0,769).

A sensibilidade e especificidade bem como os resultados obtidos nos testes sorológicos, podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Comparação dos resultados obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Aglutinação Modificada (MAT) para anticorpos (IgG) anti-*Toxoplasma gondii* em soro de suínos abatidos na Região de Londrina, PR.

	RIFI*		TOTAL	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)
	Positivo	Negativo			
<b>MAT*</b>					
Positivo	11	9	20	<b>64,71%%</b> (IC= 38,35%-85,70%)	<b>97,65%</b> (IC=95,58%-98,92%)
Negativo	6	374	380	<b>VPP= 55%</b> (IC=31,55%-76,90%)	<b>VPN=98,42%</b> (IC=96,59%-99,41%)
TOTAL	17	385	400		<i>Kappa: 0,57</i>

\*Ponto de corte  $\geq 64$

Os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* mais frequentes nos suínos considerados positivos foram 256 (1,75%) e 1024 (1%), e apenas um suíno apresentou o título de 4096. No MAT, 4,5% (18/400) foram considerados positivos com título igual a 64

Os resultados dos isolados no bioensaio e o respectivo título sorológico dos suínos encontram-se na Tabela 3. A taxa de isolamento no bioensaio a partir dos suínos sorologicamente positivos foi de 69,23% (18/26), confirmado por meio da PCR. Foram obtidos 18 isolados de *T. gondii*, denominados de acordo com a ordem de coleta. Desses isolados, 17 obtidos na forma de taquizoítos, e seis foram obtidos tanto na forma de cistos quanto taquizoítos.

**Tabela 3** – Características dos isolados de *Toxoplasma gondii* a partir de suínos (*Sus domesticus*).

Suíno no.	Título RIFI	Título MAT	Infectividade dos isolados de <i>T. gondii</i> em camundongos (n=3)				
			Mortalidade (%)	Dia da morte	Camundongos positivos (%)	Taquizoíto	Cisto tecidual
191	256	<16	3 (3/3)	8-12	3 (100)	+	+
192	64	<16	3 (3/3)	10-18	2 (66,6)	+	-
193	256	≥64	2 (2/3)	6-8	3(100)	-	+
197	256	≥64	3 (3/3)	16-17	3(100)	+	+
198	1024	≥64	2 (2/3)	12-13	3 (100)	+	-
203	256	16	2 (2/3)	8-16	2 (66,6)	+	-
205	64	<16	2 (2/3)	13-14	3 (100)	+	+
212	16	≥64	3 (3/3)	14-18	3(100)	+	-
220	256	≥64	1(1/3)	8	3(100)	+	-
222	256	≥64	2 (2/3)	8-20	1 (33,3)	+	-
225	<16	≥64	1 (1/3)	16	2 (66,6)	+	-
226	<16	≥64	3 (3/3)	10-11	1 (33,3)	+	+
228	1024	≥64	1 (1/3)	8	2 (66,6)	+	-
234	<16	≥64	1 (1/3)	8	1(33.3)	+	-
235	1024	≥64	2 (2/3)	8-13	3(100)	+	-
236	<16	≥64	2 (2/3)	12-14	3 (100)	+	-
240	<16	≥64	3 (3/3)	16	1 (33,3)	+	+
246	1024	≥64	1 (1/3)	8-12	2 (66,6)	+	+

Na Tabela 4 constam os resultados da análise genotípica dos 18 isolados de *T. gondii* em suínos. Quinze isolados foram identificados como um único genótipo, #206 de acordo com o ToxoDB, não foi possível determinar o genótipo dos isolados 198, 205 e 226. Os tipos clonais I, II e III não foram detectados.

**Tabela 4** – Caracterização genotípica dos isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de suínos (*Sus domesticus*) abatidos na região de Londrina, estado do Paraná, Brasil no período de agosto de 2012 a março de 2013.

Isolado	Marcadores											Genótipo
	SAG1	SAG2	alt.SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	
191, 192, 193, 197, 203, 212, 220,222, 225, 228, 234, 235, 236, 240, 246.	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	III	I	ToxoDB#206
198	Nd	Nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	I	nd
205	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	nd	nd	nd
226	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	nd	I	nd

nd: não determinado

## 4 DISCUSSÃO

A ocorrência, 6,5% utilizando sorologia em paralelo de suínos sorreagentes obtida nesse estudo foi semelhante ao obtido por Carletti et al.(2005) e De Moura et al. (2007) no estado do Paraná, estes autores utilizaram a RIFI e observaram prevalências de 4% e 8,54%, respectivamente. Da mesma forma, Da Silva et al. (2008) detectaram uma prevalência de 7,2%, porém, utilizando apenas o MAT. A carne suína contendo cistos de *T. gondii* quando consumida crua ou mal passada é uma importante fonte de infecção para humanos e animais (DUBEY, 2009).

No Brasil recentemente, estudos em suínos de abatedouros detectaram uma ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* de 4 a 14,71% (CARLETTI et al. 2005; BEZERRA et al., 2009). No mundo, os valores de ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* 9,1% e 15,6% em suínos de abatedouros em pesquisas recentes (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2011; DE SOUSA et al., 2006).

Na Amazônia utilizando o MAT pesquisadores constataram uma soroprevalência de 37,5% (CAVALCANTE et al., 2006). Em São Paulo, Dos Santos et al. (2005) através do MAT constataram uma soroprevalência de 17% em suínos de abatedouros. Fialho, Teixeira e Araújo (2009) e Dos Santos (2005) afirmaram que a soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos pode variar muito de acordo com a área, categoria dos animais, método diagnóstico utilizado, ponto de corte, fatores climáticos, socioeconômicos e culturais.

No estado do Paraná, Vidotto et al. (1990) pesquisaram a soroprevalência da toxoplasmose em suínos de granjas do norte do estado e obtiveram 31,6% de soro reagentes entre os suínos de terminação. Cerca de dez anos após, um estudo na mesma região detectou uma queda na prevalência para 15,35% e identificou o sistema de criação intensivo como um fator de proteção contra a infecção, enquanto que a presença de felinos e roedores na granja aumentou o risco de infecção toxoplásmica (TSUTSUI et al., 2003).

Estudos com diferentes categorias zootécnicas constataram que houveram mais soro reagentes entre os animais mais velhos (matrizes, reprodutores, marrãs), por maior tempo de permanência na granja e maior exposição aos fatores de risco (VIDOTTO et al., 1990; CARLETTI et al., 2005). Garcia et al., (1999) em um estudo com suínos de propriedades rurais do Paraná

relataram como fator de proteção o animal ser mais jovem. Este fato é importante pois a carne desses animais de descarte geralmente são destinadas a fabricação de produtos como salames, salsichas e outros embutidos crus, que mesmo com adição de sal podem constituir risco à saúde pública (DUBEY, 2009; NAVARRO et al., 1987; DIAS et al., 2005).

A RIFI é considerada padrão ouro para várias espécies animais (COLA et al., 2010), e o MAT apresenta alta sensibilidade para detecção de anticorpos anti-*T.gondii* (DUBEY, 1997). De acordo com Minho et al., (2005) ambos os testes apresentam boa acurácia, apesar da metodologia bastante diferente. No presente trabalho utilizou-se a RIFI e o MAT em paralelo para aumentar a sensibilidade da sorologia, e esta foi de 100% conforme resultados da PCR. O ponto de corte  $\geq 64$  foi estabelecido para evitar resultados falsos-positivo devido a reações cruzadas.

Devido a logística dos abatedouros, não foi possível obter a idade exata de cada animal, no entanto, eram animais de terminação. Portanto, os valores de soro-ocorrência obtidos neste estudo são inferiores aos valores encontrados em levantamentos da população suína em geral, visto que a prevalência aumenta quanto maior a idade do animal, e os animais coletados em nosso estudo eram jovens (DUBEY, THULLIEZ e POWELL, 1995; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2011).

Apesar deste estudo ter abrangido animais provenientes de 12 propriedades diferentes, todos os suínos sororreagentes encontrados foram provenientes de apenas duas propriedades, sendo que uma delas enviou um lote de apenas 18 animais para o abate (Tabela 1). Enquanto que nas outras coletas, todos os lotes continham 100 ou mais animais, confirmando estudos anteriores que afirmaram que nas propriedades pequenas cada animal se torna mais exposto aos fatores de risco, pois o fator de risco é distribuído entre um número menor de suínos, portanto o risco é maior em pequenas propriedades (ZIMMERMAN et al., 1990; WEIGEL et al., 1995).

Os títulos de anticorpos variaram de 64 a 4096, indicando a presença de animais em diferentes estágios de infecção. Dubey et al., (2012) a partir de amostra de um animal soro negativo, tanto no ELISA quanto no MAT, realizou o isolamento de *T.gondii* a partir do bioensaio. Portanto é possível mesmo um animal soro negativo conter formas viáveis do protozoário.

A partir das 26 amostras de suínos submetidos ao bioensaio foram obtidos 18 (69,23%) isolados de *T. gondii*. Dos Santos et al., (2005) obtiveram uma taxa de isolamento de 25% a partir de amostras de suínos no estado de São Paulo, Brasil. Nos EUA, Dubey, Thulliez e Powell, (1995) realizando bioensaio de tecidos suínos em camundongos obtiveram 31,7% de isolados. No Nordeste do Brasil, a partir de 18 amostras de suínos submetidas ao bioensaio foram obtidos cinco isolados, resultando numa taxa de isolamento de 62,5%, utilizando cinco camundongos, e no presente estudo foram utilizados apenas três e obtendo uma maior taxa de isolamento CLEMENTINO-ANDRADE et al., (2013). Portanto, com um número bem menor de animais inoculados foi possível obter uma ótima taxa de isolamento, resultante do uso da RIFI e MAT em paralelo aumentando a sensibilidade.

A PCR-RFLP foi utilizada neste estudo, pois é capaz de diferenciar os alelos atípicos (u-1, u-2) e também capaz de detectar a combinação dos alelos de diferentes arquétipos, além de ser de fácil utilização, e alta resolução, similar ao sequenciamento genético (SU; ZHANG; DUBEY, 2006). O resultado da análise genotípica revelou a presença de um único genótipo #206, em 15 isolados de suínos. Este genótipo foi descrito previamente em galinhas no estado do Espírito Santo (PENA et al., 2013), e em três recém nascidos no estado de Minas Gerais (CARNEIRO et al., 2013) no entanto, ambos recentes. Visto que o estado do Paraná está localizado há cerca de 1.500 km do estado do Espírito Santo onde foi identificado o genótipo #206, mais estudos são necessários, para investigar a circulação do *T. gondii* em outras espécies animais e sua relação com os suínos, e principalmente o homem, devido ao alto potencial zoonótico desse genótipo.

Não foi possível determinar o genótipo dos isolados 198, 205 e 226, devido a baixa concentração de DNA, no entanto todos os 18 isolados se mostraram virulentos para camundongos. O fato de 15 isolados pertencerem ao mesmo genótipo (ToxoDB#206) pode ser explicado provavelmente pelo fato dos animais serem de dois únicos lotes pequenos e provenientes do mesmo estado; o Paraná.

Na Europa e na América do Norte a análise genotípica dos isolados revelou três linhagens clonais: I, II e III com pouca variabilidade genética (HOWE e SIBLEY, 1995). Nenhum desses três tipos clonais foram encontrados no presente trabalho, Esses resultados estão de acordo com diversos outros trabalhos que também não encontraram os genótipos arquétipos no Brasil, pois os isolados Sul



Americanos possuem maior diversidade genética, com a presença de diferentes alelos, chamados de genótipos atípicos (GRIGG; SUNDAR, 2009; BEZERRA et al., 2012; PENA et al., 2013; CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013)

Nos EUA, Dubey et al., (2008), utilizando 11 marcadores na PCR-RFLP obtiveram 4 genótipos diferentes a partir de 14 isolados de *T. gondii* de suínos. Na China, a partir de 17 isolados de suínos, utilizando a PCR-RFLP com 10 marcadores foram encontrados os genótipos #3 e #9 do ToxoDB (JIANG et al., 2013). Outro estudo também na China, usando nove marcadores, obteve dois genótipos a partir de sete isolados (WANG et al., 2012).

No Brasil, Bezerra et al., (2012), utilizando apenas sete marcadores moleculares encontraram seis diferentes genótipos a partir da análise genotípica de 11 isolados. Frazão-Teixeira et al.,(2011), no estado do Rio de Janeiro, obtiveram cinco isolados de *T. gondii*, quatro genótipos foram identificados, apenas um desses foi avirulento e os quatro restantes foram altamente patogênicos para camundongos.

Devido a alta variabilidade genética, o presente estudo utilizou 11 marcadores moleculares, conforme recomendado por estudos anteriores, mas são necessários mais estudos com maior tamanho amostral para o desenvolvimento de novos marcadores visando uma classificação mais correta dos isolados atípicos (BEZERRA et al., 2012, FRAZÃO-TEIXEIRA et al., (2011).

## 5 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a carne suína é uma importante fonte de infecção de *T. gondii* para seres humanos, cabe ressaltar que a partir de apenas 50 gramas de tecidos suínos foi possível isolar o parasita com capacidade infectante, essa quantidade de carne é bem inferior ao consumido por um adulto em um dia. Além desse fator importante para a saúde pública, a partir da caracterização genotípica dos isolados foi possível descrever pela primeira vez o genótipo #206, ToxoDB em suínos no Brasil e no mundo, confirmando o carácter atípico dos isolados brasileiros.

## REFERÊNCIAS

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de carne suína. Arquivo capturado em 15 de novembro de 2013, disponível na internet [www.abipecs.org.br](http://www.abipecs.org.br). 2013.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; GARCÍA MACHADO, C.; ALVARADO-ESQUIVEL D.; GONZÁLEZ-SALAZAR, A.; BRIONES-FRAIRE, C.; VITELA-CORRALES, J.; VILLENA, I.; DUBEY, J.P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico. **The Journal of Parasitology**. v. 97, p. 616-619, 2011.

BEZERRA, R.A; PARANHOS, E.B; DEL'ARCO, A.E.; ALBUQUERQUE, G.R. 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.

BEZERRA, R. A.; CARVALHO, F. S.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, D. S.; MACIEL, B.M.; WENCESLAU, A.A.; LOPES, C.W.G.; ALBUQUERQUE, G.R. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 189, p. 153-161, 2012.

BOOTHROYD, J.C.; HEHL, A., KNOLL, L.J.; MANGER, I.D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **International Journal for Parasitology** v.28, p.3-9, 1998.

CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 6, p. 116-118, 1964.

CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE, G.M; COSTA, J.G.L.; PINHEIRO, B.V.; SU, C.; JANUÁRIO, J.N.; VITOR, R.W.A. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 3, p. 901-907, 2013.

CARLETTI, R.T.; FREIRE, R.L.; SHIMADA, M.T.; RUFFOLO, B.B.; BEGALE, L.P.; LOPES, F.M.R.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection among slaughtered swines in Paraná State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 563-568, out./dez. 2005

CAVALCANTE, G.T.; AGUIAR, D.M.; CHIEBAO, D.; DUBEY, J.P.; RUIZ, V.L.A.; DIAS, R.A.; CAMARGO, L.M.A.; LABRUNA, M.B., GENNARI, S.M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural western Amazon, Brasil. **Journal of Parasitology**. v. 92, p. 863-864, 2006.

CLEMENTINO- ANDRADE, M.M.; PINHEIRO, B.V.; CUNHA, M.M.; CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE NETO, V.F.; VITOR, R.W.A. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science** v.94, p.587-589, 2013.

- COLA, G.A.; GARCIA, J.L.; DA COSTA, L.; RUFFOLO, B.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do teste de aglutinação modificado na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ratos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 717-722, 2010.
- DA SILVA, A.V.; BOARETO, H.; ISBRECHT, F.B.; DA SILVA, R.C.; LANGONI, H. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da região oeste do Paraná, Brasil. **Veterinária e Zootecnia** v.15, p.263–266, 2008.
- DE MOURA, A.B., OSAKI, S.C., ZULPO, D.L., MARANA, E.R.M., Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v.16, p.54–56, 2007
- DE SOUSA, S.; AJZENBERG, D.; CANADA, N.; FREIRE, L.; CORREIA 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, p.133–136, 2006.
- DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of the Clinical Microbiology**. v. 11, p. 562-568, 1980.
- DIAS, R.A.F.; NAVARRO, I.T.; RUFFOLO, B.B.; BUGNI, F.M.; CASTRO, M.V. & FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.47, n.4, p.185-189, 2005.
- DOS SANTOS, C.B.A.; DE CARVALHO, A.C.F.B.; RAGOZO, A.M.A.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; YAI, L.E.O.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.131, p. 207–211, 2005.
- DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in pigs. **Veterinary Parasitology**, v.19, p. 181-223, 1986.
- DUBEY, J.P., Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 910-913, 1988.
- DUBEY, J.P. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 307-310, 1997.
- DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v.74, p.75-77, 1998.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in pigs- The last 20 years. **Veterinary Parasitology**. v.164, p. 89-103, 2009.
- DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in animals and humans in the United States. **International Journal for Parasitology** v.38, p. 1257–1278, 2008.

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

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

FIALHO, C.G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAÚJO, F.A.P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, n.1, p. 1-23, 2009.

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

GRIGG, M.E.; SUNDAR,N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. **International Journal for Parasitology** v. 39, p.925-933, 2009.

HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J. 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 of Parasitology** v.30, p. 69–75, 2000.

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

JAMRA, L. M. F.; DEANE, M. P.; GUIMARÃES, E. C. On the isolation of *Toxoplasma gondii* from human food of animal origin: partial results in the city of São Paulo (Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 169-176, 1969.

JIANG, H.H.; HUANG, S.Y.; ZHOU, D.H.; ZHANG, X.X.; SU, C. ;DENG, S.Z.; ZHU, X.Q. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from pigs from different localities in China by PCR-RFLP. **Parasites and Vectors**. v.6, p.227, 2013.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Arlington, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE; R. V. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**. v. 5, n. 5, p. 607-625. September-October. 1999.

MINHO, A.P.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S.M.; MARANA, E.M.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in experimentally infected pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.24, n.4, p. 199-202, 2004.

NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; MITSUKA, R. Resistência do *T.gondii* ao NaCl e aos condimentos em linguiça de suínos. Boletín de la Oficina **Sanitaria** Panamericana v. 112, n.2, p.138-144, 1987.

NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii*: Isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, Pr. **Semina**, Londrina, v.13, p.15-18, 1992.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura\\_2012\\_2013.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2012_2013.pdf) acesso em 11/02/2014.

PENA, H.J.F.; 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.

PENA, H.F.J.; VITALINO, S.N.; BELTRAME, M.A.V.; PEREIRA, F.E.L.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. **Veterinary Parasitology**. v. 192, p. 111-117, 2013.

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.

THRUSFIELD, M., 2005. **Veterinary Epidemiology**, 3rd ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 584p.

TSUTSUI, V.S.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; FREITAS, J.C.; PRUDÊNCIO, L.B.; DELBEM, A.C.B.; MARANA, E.R.M. Soroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos do norte do Paraná-Brasil. **Arch of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 27-34, 2003.

U.S. Environmental Protection Agency, 2012. Disponível em <http://www.epa.gov/oecaagct/ag101/printpork.html>. Acesso em 25/01/2014.

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

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.

WEIGEL, R. M., J. P. DUBEY, A. M. SIEGEL, D. HOEFLING, D. REYNOLDS, L. HERR, U. D. KITRON, S. K. SHEN, P. THULLEZ, R. FAYER, AND K. S. TODD. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in swine in Illinois in 1992. **Journal of the American Veterinary Medical Association** v.206, p. 1747-1751, 1995.

ZIMMERMAN, J.J.; DREESEN, D.W.; OWEN, J.W.; BERAN, G.W. Prevalence of Toxoplasmosis in swine from Iowa. **Journal of the American Veterinary Medical Association** v. 196, p. 266-269, 1990.

## CONCLUSÃO

O presente trabalho determinou a soro-ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos abatidos na região de Londrina, PR através das técnicas consolidadas, RIFI e MAT. Por meio do bioensaio em camundongos foi possível isolar o parasita a partir de tecidos suínos coletados durante o abate, refletindo assim o risco de infecção a partir do consumo de carne suína crua ou mal cozida.

A caracterização genotípica dos isolados revelou a presença de um genótipo (#206 ToxoDB) confirmando assim o carácter atípico dos isolados brasileiros. Esse é o primeiro trabalho que descreve este genótipo em suínos não só no Brasil, como no mundo.