



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Cássia Maria Pedroso dos Santos

AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM BUBALINOS DA ILHA DE MARAJÓ NATURALMENTE INFECTADOS

Belém
2016

Cássia Maria Pedroso dos Santos

AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM BUBALINOS DA ILHA DE MARAJÓ NATURALMENTE INFECTADOS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira

**Belém
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Santos, Cássia Maria Pedroso dos, 1988-
Avaliação sorológica e molecular da infecção por
Toxoplasma gondii em bubalinos da Ilha de Marajó
naturalmente infectados / Cássia Maria Pedroso dos
Santos. - 2016.

Orientador: Washington Luiz Assunção
Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Campus de Castanhal, Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2016.

1. Búfalo -- Marajó, Ilha do (PA). 2.
Toxoplasma gondii. 3. Reação em cadeia de
polimerase. I. Título.

CDD 22. ed. 636.293098115

Cássia Maria Pedroso dos Santos

AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM BUBALINOS DA ILHA DE MARAJÓ NATURALMENTE INFECTADOS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Produção Animal

Data da aprovação. Belém - PA: 29/02/2016.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira (Orientador)
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof^ª. Dr^ª. Hilma Lúcia Tavares Dias (Membro Titular)
Universidade Federal do Pará

Dr. Sandro Patroca da Silva (Membro Titular)
Instituto Evandro Chagas

Dedico este trabalho à minha família;
meus pais, irmãos, cunhados e sobrinhas;
pessoas especiais em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado coragem, determinação e fé para chegar até o fim e pelas amizades que conquistei ao longo desses dois anos.

A minha família, meus pais, Joaquim e Maria Lúcia, irmãos, Marcelo e Lília, cunhados, Luciana e Roberto e minhas sobrinhas, Katarine e Marcela, a todos eles, pelo amor, carinho, apoio, conselhos e incentivos a sempre buscar o melhor para minha vida e ouvindo sempre o meu pai falar: “Mire na lua porque se errar estará entre as estrelas”. Amo vocês!

Ao meu orientador Washington Luiz Assunção Pereira, pela orientação, sempre disposto a ajudar no que fosse necessário, pela confiança, apoio e ensinamentos.

A minha Co-orientadora Hilma Lúcia Tavares Dias, pela orientação, competência e pelos ensinamentos transmitidos ao longo desses dois anos.

Ao Professor Evonnildo Costa Gonçalves, pela colaboração e disponibilidade de seu laboratório.

Ao Ediclei Lima Carmo e ao técnico Rodrigo do laboratório de Toxoplasma/IEC/SVS/MS, pelo apoio e processamento das amostras para o teste sorológico.

As minhas amigas Viviane Pires, Ádria Azevedo e Francimara Barreto por esses longos anos de amizade, por jamais esquecer de mim mesmo estando longe e pelo carinho e apoio durante a realização deste trabalho.

As minhas amigas veterinárias favoritas Mariza Mubárac, Lilanilde Cavalcante e Juliane de Sá, pela amizade, carinho e por sempre estarem na torcida pelo meu sucesso.

Aos meus amigos Rennan Maia e Larissa Falcão que me deram maior apoio ao chegar nessa cidade e que humildemente cederam um lugar em sua casa. Muito bons momentos que jamais esquecerei e que hoje morando em cidades diferentes ainda cultivamos a nossa bela amizade. Adoro vocês.

Ao meu amigo Mário Arthur, o qual eu tive o prazer de conhecer no dia da prova de mestrado e a partir desse dia acabamos nos tornando grandes amigos. Vencemos as dificuldades e conseguimos chegar até o fim de mais uma jornada. Obrigada pelos momentos de descontração, apoio e pela sua amizade.

Ao meu amigo Leopoldo Moraes, sem palavras pra descrever a essa pessoa que mais me ajudou ao longo desses dois anos, com o processamento e análise molecular das amostras no laboratório, assim como nas correções da bibliografia. Sempre dando apoio, principalmente, nas horas de dificuldades, um verdadeiro amigo. Obrigada pela sua amizade, companhia e os momentos de diversão.

As minhas amigas Bejjiane Souza e Rafaelle Casseb pela amizade, conversas, risadas e companheirismo, principalmente, quando precisávamos ficar até tarde no laboratório.

A Joselisa Maia pela ajuda no processamento e organização com as amostras no laboratório.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e a todo o corpo docente pelos ensinamentos que recebi.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, estiveram torcendo pelo meu sucesso ao longo destes dois anos.

**“O fracasso jamais me surpreenderá, se a minha
decisão de vencer for suficientemente forte”**

Og Mandino

RESUMO

Com o objetivo de analisar a ocorrência de *Toxoplasma gondii* em búfalos da Ilha de Marajó através de método sorológico e molecular, foram coletadas amostras de sangue e tecido cerebral de 100 búfalos. Os soros sanguíneos foram submetidos à Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando a diluição 1:64 como ponto de corte para *T. gondii*, essas amostras foram testadas para detectar a presença de anticorpos IgG *anti-T. gondii*. Para confirmar a presença do gene B1 de *T. gondii* no material genômico de sangue e tecido cerebral, as amostras foram submetidas à amplificação por reação em cadeia pela polimerase (*Nested-PCR*). Dentre os soros de búfalos testados, 14 (14%) foram reagentes contra o *T. gondii* pela técnica da RIFI, enquanto que as amostras de sangue e tecido cerebral testados 4 (4%) foram amplificados o DNA de *T. gondii* pela técnica da PCR, sendo 3 (3%) em amostras de sangue e 1(1%) em amostras de tecido cerebral. Apesar da baixa ocorrência de anticorpos IgG *anti-T. gondii* em soro de búfalos, pode-se concluir que a infecção por este protozoário encontra-se presente em búfalos criados na Ilha de Marajó, além disso, foi possível a detectar o material genômico do *T. gondii*, em amostras de sangue e tecido cerebral desses animais, havendo assim, a necessidade de mais pesquisas , utilizando a técnica molecular no diagnóstico da toxoplasmose uma vez que, a detecção do bioagente em búfalos torna ainda mais relevante à importância desses animais na cadeia epidemiológica da toxoplasmose como prováveis fontes de infecção principalmente para o ser humano.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, búfalo, RIFI, *nested PCR*.

ABSTRACT

In order to analyze the occurrence of *Toxoplasma gondii* in buffalo Marajó Island by serological and molecular method, blood samples and brain tissue of 100 buffaloes were collected. Blood sera were tested by indirect immunofluorescence assay (IFA) using a 1:64 dilution as the cutoff point for *T. gondii*, these samples were tested for the presence of antibodies IgG anti-*T. gondii*. To confirm the presence of *T. gondii* B1 gene in genomic material of blood and brain tissue samples were subjected to amplification by polymerase chain reaction (nested PCR). Among the tested sera buffaloes, 14 (14%) were reactive against *T. gondii* by the IFA technique, while blood samples and brain tissue tested 4- (4%) were amplified DNA by the technique of *T. gondii* PCR, 3 (3%) in blood samples and 1 (1%) in brain tissue samples. Despite the low occurrence of antibodies anti-*T. gondii* in serum buffalo, it can be concluded that infection by this parasite is present in buffalo breed in Marajo, moreover, it was possible to detect the genomic material of *T. gondii* in blood samples and brain tissue these animals, thus there is the need for further research, using the molecular technique for the diagnosis of toxoplasmosis since the detection of the bioagent buffaloes becomes even more relevant to the importance of these animals in the epidemiological cycle of toxoplasmosis as possible sources of infection primarily for the human being.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, buffalo, IFAT, nested PCR.

LISTA DE SIGLAS

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta
PCR - Reação em cadeia mediada pela polimerase
ABCB - Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
ELISA - Ensaio imunoenzimático
TFC - Teste de fixação de complemento
SVS - Secretaria de vigilância e saúde
MS - Ministério da saúde
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
NaCl - Cloreto de sódio
CIA - Álcool- Isoanil
DNTP - Desorribonucleotídeo trifosfatado
TAE - Tris-Acetato-EDTA
HE - Hematoxilina e Eosina

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 2.1 BUBALINOCULTURA E SUA IMPORTÂNCIA | 13 |
| 2.2 TOXOPLASMOSE | 14 |
| 2.2.1 Etiologia e Ciclo Evolutivo..... | 14 |
| 2.2.2 Epidemiologia | 16 |
| 2.2.3 Transmissão | 18 |
| 2.2.5 Diagnóstico | 18 |
| 2.2.6 Medidas de prevenção, controle | 19 |
| 3. OBJETIVOS | 21 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 21 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 4.1 OBTENSÃO DAS AMOSTRAS | 22 |
| 4.2.PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTAS | 23 |
| 4.2.1 Para detecção de <i>T. gondii</i> por <i>nested</i> PCR..... | 23 |
| 4.2.1.1 Extração de DNA do tecido cerebral | 23 |
| 4.2.1.2 Extração de DNA do sangue total | 23 |
| 4.2.1.3 <i>Nested</i> PCR..... | 24 |
| 4.2.1.4 Gel eletroforese | 25 |
| 4.2.2 Para o teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI) | 25 |
| 4.2.2.1 Preparo das lâminas | 25 |
| 4.2.2.2 Triagem e titulação..... | 25 |
| 4.2.2.3 Leitura | 26 |
| 4.2.3 Para Histopatológica | 26 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 31 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 32 |
| ANEXO..... | 39 |

I. INTRODUÇÃO

O Estado do Pará possui um dos maiores rebanhos bubalino do Brasil, e lidera o ranking nacional com 507.882 cabeças, sendo os principais municípios produtores: Chaves, Soure, Cachoeira do Arari e Almeirim (BOLETIM..., 2015). Com um aumento na produção e comercialização de bubalinos, expandiu-se, também a fiscalização e o controle sanitário dessa espécie (DINÂMICA..., 2012).

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição mundial causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, que tem como hospedeiros definitivos os felídeos domésticos e selvagens e, como hospedeiros intermediários mamíferos e aves (NEMATOLLAHI; MOGHDDAM, 2008; WEBSTER, 2010).

Na espécie bubalina as prevalências por *T. gondii* são menores que as registradas para a espécie ovina (HILL; DUBEY, 2002), que além de apresentarem uma alta soropositividade para Toxoplasmose, os cistos do *T. gondii* podem ser detectados em vários tecidos do animal como: língua, diafragma, masseter, os músculos da perna e intercostais e em maior quantidade no cérebro, segundo estudo realizado por Yildiz et al. (2014).

Os felídeos apresentam grande importância devido serem os disseminadores do oocisto contaminando o ambiente, com isso outros animais acabam predispostos a infecção por *T. gondii* devido seu hábito alimentar e o contato direto com o solo contaminado (LANGONI et al., 2006). Nos animais infectados os cistos do *T. gondii* estão em diferentes órgãos e músculos e a viabilidade varia de acordo com a espécie animal e normalmente não são detectados durante a inspeção da carne no abatedouro (DUBEY, 1988; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Nos seres humanos o consumo de carne contaminada representa uma das maiores fontes de infecção por *T. gondii* devido a hábitos culturais como a ingestão de carne crua ou mal cozida (MILLAR et al., 2008; PERDONCINI et al., 2010). Contudo, Millar et al. (2008) afirmaram que alguns procedimentos como o congelamento, defumação, salga e fritura favorece a destruição dos cistos deste protozoário em carnes e derivados. Nos animais de produção, a toxoplasmose pode causar prejuízos econômicos devido a problemas reprodutivos como abortamentos, natimortos, fetos mumificados e repetição de cio (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009).

Devido à toxoplasmose não apresentar sintomas clínicos específicos em animais, o seu diagnóstico baseia-se principalmente em exames sorológicos (LIU et al., 2015), em que a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é classificada como uma técnica padrão ouro

para o diagnóstico da toxoplasmose animal (COLA et al., 2010), outra técnica que pode ser utilizada é a histopatologia, sendo um indicador efetivo na presença ou ausência do parasito nos tecidos (SUDAN et al., 2015).

O diagnóstico molecular é um método que pode ser associado aos testes sorológicos, identificando o DNA do *T. gondii* em amostras biológicas através da reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR), proporcionando uma alta sensibilidade (DUBEY, 2010; CARNEIRO, 2011).

Com a demanda crescente na produção de búfalos no Estado do Pará, a comercialização de seus produtos principalmente a carne e o leite vem conquistando o mercado consumidor, que esta cada vez mais exigente, requerendo um maior controle sanitário desta espécie, que pode se tornar hospedeiro intermediário de *T. gondii* e atuar como fonte de infecção para o homem, aliado a escassez de dados sobre esse protozoário na região Norte do Brasil e sua importância na cadeia produtiva do búfalo, a presente pesquisa propõe analisar a ocorrência de *T. gondii* em búfalos da Ilha de Marajó através de método sorológico e molecular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BUBALINOCULTURA E SUA IMPORTÂNCIA

De origem asiática, o búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) chegou ao Brasil por volta de 1895, na Ilha de Marajó, Estado do Pará, com animais da raça mediterrâneo oriundos da Itália (LOURENÇO JÚNIOR; GARCIA, 2008). Com um maior conhecimento sobre sua potencialidade e características produtivas, essa espécie se dispersou por várias regiões brasileiras (BERNARDES, 2007).

Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) são reconhecidos no Brasil quatro raças: Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e Carabao (ABCB, 2016). São excelentes produtores de carne, leite e aptas ao trabalho, sendo considerados animais de tripla aptidão, além disso, devido a sua rusticidade esses animais são adaptados a pastagens alagadiças e de baixas fertilidades, capazes de converter alimentos fibrosos em proteínas de alto valor (OLIVEIRA, 2005).

A demanda crescente por proteína animal torna o búfalo cada vez mais importante no setor pecuário, aumentando o interesse pela bubalinocultura que devido suas peculiaridades torna-se importante explorar seu potencial (LOURENÇO JÚNIOR; GARCIA, 2008).

O mercado para produtos bubalinos é crescente, o leite é de melhor qualidade que o bovino, sendo utilizado principalmente na produção de queijo mozzarella (GOMES, 2013), a carne bubalina é mais magra com menos colesterol que a bovina, além de ser mais saborosa e suculenta, atende as exigências do consumidor atual que procura por alimentos saudáveis (OLIVEIRA et al., 2005), o couro também é bastante valorizado, é uma matéria prima muito utilizada nas indústrias moveleiras, automobilísticas, confecções e calçados, devido possuir características como alta resistência, baixa porosidade e capacidade de transformação em produtos finos (BERNADES, 2011).

No Estado do Pará os grandes rebanhos bubalinos estão concentrados no Arquipélago do Marajó, onde as fazendas são bastante extensas e os animais são criados soltos em pastos, impossibilitando o controle do rebanho e utilização de técnicas produtivas, aliado a isso estão às adversidades climáticas, com um longo período de seca e outro de muita chuva. Ademais, às práticas de manejo são inadequadas com uma precária sanidade do rebanho, sendo esses os principais fatores limitantes e entraves à produção de búfalos na região marajoara (BARBOSA, 2005).

A bubalinocultura na região da Ilha de Marajó ainda é precária, com falta de modernização tecnológica das fazendas, aliado a inexistência de locais de abate na região de forma que o escoamento da produção é realizado através do gado em pé, o que reduz a competitividade local em relação as demais regiões produtoras do Estado do Pará (BRASIL, 2007).

2.2 TOXOPLASMOSE

2.2.1 Etiologia e Ciclo Evolutivo

T. gondii é um protozoário da Ordem Eucoccidiida e Família Sarcocystidae (KAWAZOE, 2005), que apresenta um ciclo evolutivo heteroxeno (Figura 1), com dois tipos de reprodução: uma assexuada nos hospedeiros intermediários e outra sexuada nos hospedeiros definitivos, os quais eliminam em suas fezes oocistos não esporulados que em condições ambientais favoráveis se tornam infectantes (TENTER, 2009; BAYARRI et al., 2012).

O parasita apresenta três formas infectantes: Os taquizoítos presentes nas infecções agudas que se proliferam rapidamente e podem infectar o sistema nervoso central (SNC) e a musculatura (ACHA; SZYFRES, 2003; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Os bradizoítas apresentam uma proliferação mais lenta e estão presentes nas infecções crônicas podendo persistir no tecido durante toda a vida do hospedeiro (LOPES; BERTO, 2012).

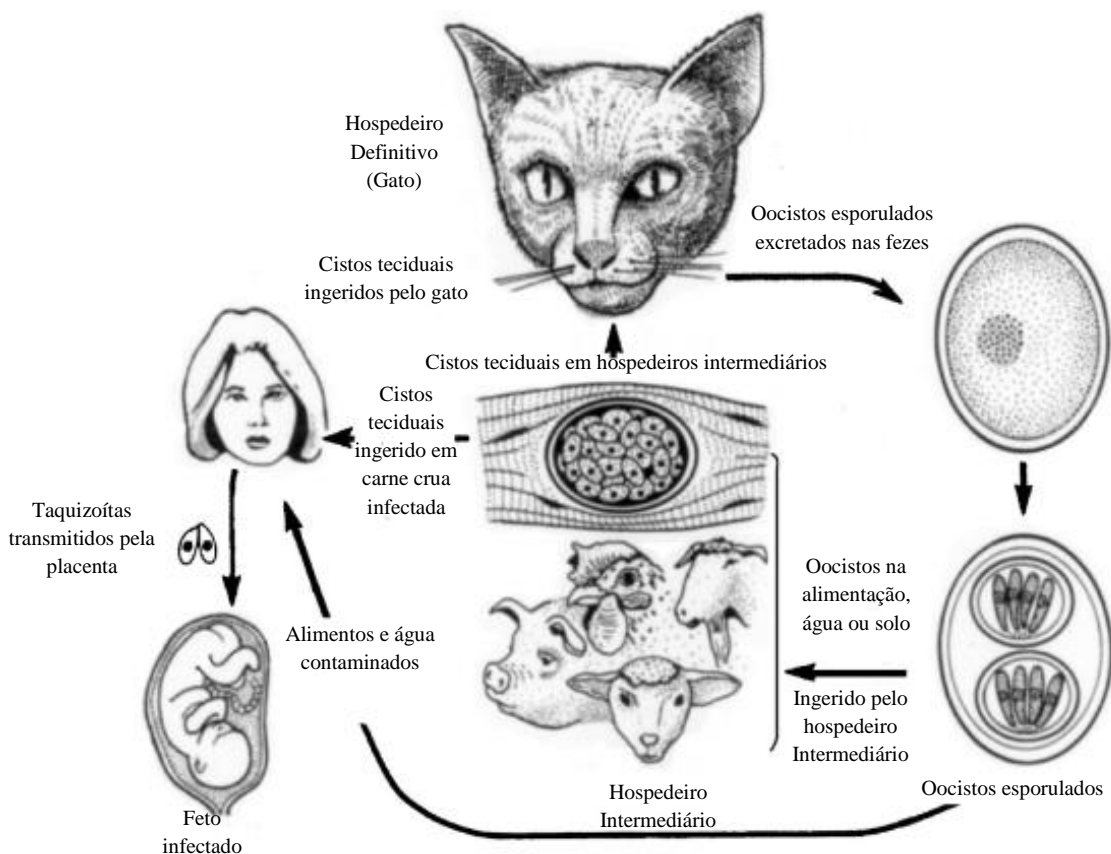
Os bradizoítas acumulam-se no citoplasma das células, formando um cisto, que são encontrados frequentemente em órgãos viscerais, tecido nervoso e músculos esquelético e cardíaco (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). Já os esporozoítos são formas que se desenvolvem dentro de esporocistos no ambiente externo após excreção dos oocistos nas fezes dos felídeos (LOPES; BERTO, 2012).

O ciclo sexuado tem início quando os cistos teciduais contendo bradizoítas ou oocistos com esporozoítas são ingeridos pelo hospedeiro definitivo (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000), após a ingestão os bradizoítas penetram nas células epiteliais do intestino delgado onde ocorre multiplicação assexuada para em seguida iniciar o ciclo sexual (gametogonia), resultando na formação de oocistos que são eliminados nas fezes, que esporulam após 1 a 5 dias no meio ambiente (CFSPH, 2005). Cada oocisto produz dois esporocistos que contem quatro esporozoítos cada, sendo altamente infectantes e que

permanecem na natureza por vários anos, podendo ser ingeridos por outros animais e o ser humano (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

No hospedeiro intermediário, após a ingestão do parasito, bradizoítas ou esporozoítas, chegam ao intestino delgado e invadem as células epiteliais, onde se transformam em taquizoítas que se multiplicam e disseminam no organismo através do sangue e linfa, depois de alguns ciclos de multiplicação o hospedeiro desenvolve um grau de imunidade, a partir desse momento os taquizoítas dão origem aos bradizoítas revestidos por uma membrana, formando um cisto (DUBEY, 2004). Esses cistos teciduais podem localizar-se no cérebro, músculos esqueléticos e cardíacos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Figura 1 - Ciclo evolutivo do *T. gondii*.



Fonte: (HILL; DUBEY, 2002).

2.2.2 Epidemiologia

A Toxoplasmose é bastante prevalente em seres humanos e animais (HILL; DUBEY, 2002), encontrando-se amplamente disseminada e com incidência variável em diferentes regiões do mundo (COSTA et al., 2008). É uma enfermidade de importância médica e veterinária, devido aos sérios problemas de saúde que causa nas diversas espécies de hospedeiros intermediários (SILVA et al., 2006).

Os felídeos desempenham um papel fundamental na cadeia epidemiológica da toxoplasmose pelo fato de eliminarem em suas fezes os oocistos que contaminam os seres humanos e animais (MILLAR et al., 2008). Nesse sentido, aproximadamente 200 espécies de mamíferos e aves já foram confirmadas com a infecção por toxoplasmose (ACHA; SZYFRES, 2003) e nos animais de produção, os caprinos, ovinos e suínos apresentam-se mais sensíveis à infecção do que os bovinos (MILLAR et al., 2008).

Estudos de Marques et al. (2009) em animais de algumas propriedades rurais do Mato Grosso do Sul detectaram anticorpos anti-*T. gondii* nas seguintes espécies: 57,14% em gatos, 22,89% em aves, 5,15% em bovinos, 47,61% em cães, 60,87% em equídeos e 14,7% em suínos. Já Silva et al. (2003) verificaram a presença de anti-*T. gondii* em 35,3% e 40,4% de ovinos e caprinos em duas regiões do Estado de Pernambuco.

Em animais silvestres a infecção causada pela toxoplasmose também foi referida em estudo realizado por Ferraroni e Marzochi (1980) na Amazônia, em que de 104 animais analisados, foram reagentes 75% dos felídeos (*Felis* sp.), 63,6% dos marsupiais (*Didelphis marsupialis* e *Marmosa* sp.), 63,3% dos primatas (*Saimiri* sp.) e 61,1% dos roedores (*Proechimys* sp.).

A importância da espécie bovina e bubalina como fonte de infecção pode ser observada em algumas regiões do mundo em que levantamentos sorológicos foram realizados para demonstrar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* (Tabela 1).

Tabela 1 - Presença de anticorpos de *T. gondii* em bovinos e bubalinos segundo o teste utilizado e o percentual da presença de anticorpos anti-*T. gondii* em diversos países.

| País | Teste | Espécie | % | Referência |
|---------|------------------|----------|-------|--------------------------|
| Brasil | RIFI | Bubalino | 49,9 | Souza et al., 2001 |
| Brasil | RIFI | Bovino | 49,17 | Costa et al., 2001 |
| Turquia | RIFI | Bovino | 30,61 | Nalbantoulu et al., 2002 |
| Índia | TAM ^a | Bubalino | 100 | Selvaraj et al., 2007 |

| | | | | |
|--------|---------------------------|------------------|-------------|-----------------------------|
| Irã | RIFI ^b | Bovino | 15,91 | Nematollahi; Moghddam, 2008 |
| Brasil | HAI ^c | Bovina, bubalina | 53,4 e 57,1 | Benigno et al., 2009 |
| Brasil | RIFI | Bovino | 11,83 | Spagnol et al., 2009 |
| Brasil | RIFI | Bovino | 30,8 | Moura et al., 2010 |
| Brasil | RIFI | Bubalino | 1,1 | Silva et al., 2010 |
| Brasil | RIFI | Bovino | 1,96 | Luciano et al., 2011 |
| Brasil | RIFI | Bovino | 29,1 | Macedo et al., 2012 |
| Peru | HAI e RIFI | Bubalino | 11,2 e 8,8 | Esteves et al., 2013 |
| Brasil | RIFI e ELISA ^d | Bubalino | 86,5 | Silva et al., 2013 |
| Brasil | RIFI | Bovina, bubalina | 17,4 e 27,2 | Santos et al., 2013 |
| Brasil | RIFI | Bovino | 2,68 | Fajardo et al., 2013 |

(a) Teste de Aglutinação Modificado; (b) Reação de Imunofluorescência Indireta; (c) Hemoaglutinação Indireta; (d) Ensaio Imunoenzimático

Achados de anticorpos contra *T. gondii* apenas são indicadores da infecção no hospedeiro e não determinam a presença de cistos teciduais infecciosos (YILDIZ et al., 2014), no entanto, os cistos já foram identificados em vários tecidos e órgãos de ovinos, caprinos e bovino, bem como carne de prateleira de búfalos, sendo confirmados por técnica molecular pela detecção do DNA do parasita (RAHDAR; SAMARBAF-ZADEH; ARAB, 2012; GENÇAY et al., 2013; YILDIZ et al., 2014). Através de inoculação experimental de oocistos por via oral em espécies de ruminantes (*Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis*), também pode-se fazer o isolamento do *T. gondii* de diversos tecidos (OLIVEIRA et al., 2001).

No Brasil, surtos de toxoplasmose já foram relatados em seres humanos por meio da ingestão de alimentos e carne contaminada com cistos de *T. gondii* (LOPES; BERTO, 2012). Um surto de toxoplasmose humana ocorreu em 2004 no Distrito de Monte Dourado, Município de Almeirim no Pará, onde 40 indivíduos apresentaram perfil sorológico de toxoplasmose aguda. Na análise epidemiológica foi constatado que a provável transmissão teria sido pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos do parasito (CARMO et al., 2010). Em Goiás, no município de Anápolis, 61 casos de toxoplasmose em seres humanos foram confirmados laboratorialmente e a provável forma de transmissão da doença teria sido pela ingestão de quibe cru (SVS, 2007).

Além disso, o manuseio de carcaças e vísceras de animais contaminados também representa um risco de infecção por toxoplasma para seres humanos. Um estudo realizado em um frigorífico no Paraná demonstrou que das 150 amostras de sangue dos funcionários do matadouro analisadas, 70% foram positivos para toxoplasmose (GONÇALVES et al., 2006).

Em oito indústrias de embutidos de carne suína inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Municipal em Londrina, PR, Dias et al. (2005), detectaram em 47 amostras de sangue dos trabalhadores, 59% de positividade para *T. gondii*.

2.2.3 Transmissão

No Brasil, hábitos alimentares como a ingestão de carne crua ou mal cozida, principalmente a bovina, torna esta espécie uma importante fonte de transmissão de *T. gondii* tanto para os seres humanos quanto para outros animais domésticos carnívoros, que em algumas regiões são alimentados com sobras de carne e vísceras cruas (MILLAR et al., 2008).

Segundo Casella et al. (2010), a transmissão da toxoplasmose em animais e no ser humano pode ocorrer por três vias: fecal-oral que ocorre por meio da ingestão de oocistos excretados nas fezes dos gatos que contaminam o solo, a água e os vegetais. Outra forma é o carnivorismo, pela ingestão de cistos teciduais presentes nas carnes e produtos de origem animal crus ou mal cozidos. Há também a via transplacentária cuja transmissão ocorre da mãe para o feto pela passagem de taquizoítas, durante a infecção aguda, via circulação materna.

Em humanos a transmissão também pode ocorrer por transfusão de sangue, transplante de órgãos e acidental, por auto-inoculação em laboratório (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). De acordo com Kijlstra e Jongert (2008), a inalação de aerossóis com partículas de poeira pode ser considerada como meio de transmissão. Entretanto Pereira, Franco e Leal (2010) afirmam que o consumo de carne contaminada com o oocisto é a forma mais frequente de adquirir a infecção.

A água também é uma importante via de transmissão para a toxoplasmose. No Brasil, o primeiro surto identificado em humano de toxoplasmose por ingestão de água contaminada com oocistos ocorreu na cidade de Santa Isabel do Ivaí, PR, em 2001, onde um dos reservatórios de água da cidade estava contaminado (FUNASA, 2002).

2.2.4 Diagnóstico

A toxoplasmose não apresenta sinais clínicos específicos o que dificulta o diagnóstico definitivo, além disso, na inspeção *post-mortem* em animais não se pode identificar macroscopicamente *T. gondii*, sendo necessário utilizar testes laboratoriais que detectam o parasita no tecido ou a presença de anticorpos específicos no soro (HILL; DUBEY, 2002; BAYRRY et al., 2012).

O diagnóstico pelo método indireto é o mais utilizado (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), sendo realizado por meio de testes sorológicos os quais incluem ensaios imunoenzimáticos (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (IFI), teste de fixação de complemento (FC), teste do corante de Sabin-Feldman, hemaglutinação direta e indireta, aglutinação em látex e testes de aglutinação modificados (CFSPH, 2005). Já pelo método direto o diagnóstico pode ser realizado pela reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR), isolamento e histologia (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é considerada de boa especificidade e sensibilidade. A vantagem desse teste é que utiliza os parasitos preservados, fixados em lâminas de microscopia, sendo prático e seguro na rotina laboratorial. Além disso, permite a identificação dos anticorpos segundo as classes de imunoglobulinas, no entanto, interferências de fatores reumatóides eventualmente presentes no soro podem apresentar resultados falso-positivos de anticorpos IgM. Os testes para anticorpos IgM podem também revelar resultados falso-negativos em virtude da competição entre os anticorpos IgG e IgM, que impedem que estes se fixem aos antígenos parasitários (COSTA et al., 2008).

A PCR permite demonstrar a presença do parasito e a capacidade de amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de fluidos corporais, tais como sangue, líquido amniótico, líquido cérebro-espinhal, humor aquoso, fluido de lavado bronco-alveolar e até urina (GOMES, 2004).

2.2.6 Medidas de prevenção e controle

Para prevenir a infecção em humanos devem ser usadas luvas durante a jardinagem e as caixas de areia usadas por crianças devem ser cobertas quando não estiverem em uso, a fim de evitar a exposição ao solo contaminado com oocistos do *T. gondii* (HILL; DUBEY, 2002).

Mulheres grávidas devem evitar o contato com cama de gatos, solo e carne crua. Além disso, gatos domésticos devem ser alimentados somente com enlatados ou alimentos cozidos e suas caixas de areia devem ser esvaziadas diariamente. Os legumes devem ser bem lavados antes de comer, devido a possível contaminação com fezes de gato. A água utilizada para consumo deve ser filtrada, evitando assim, água de lagos, lagoas e rios (DUBEY, 2004).

Práticas de manejo sanitário devem ser adotadas para os animais de produção, realizando o controle de roedores e felinos nas instalações (PERDONCINI et al., 2010). Gatos devem ser mantidos fora das áreas de armazenamento de alimentos destinados a animais

produção, a fim de evitar a contaminação desses alimentos. Além disso, o controle de roedores é fundamental para que os animais destinados à alimentação não se infectem com *T. gondii* pela ingestão de roedores que podem morrer nas áreas de produção (JONES; DUBEY, 2012).

Em propriedades rurais a castração de gatos é uma forma de controle da população de felinos, os quais não devem ser alimentados com carne crua. Fetos abortados e membranas fetais de animais devem ser incinerados ou enterrados de forma a prevenir a infecção de felinos e outros animais da fazenda (DUBEY, 2010).

Em alguns países já estão disponíveis vacinas para os animais de produção que são fabricadas com cepas não persistentes, a fim de reduzir o abortamento nas espécies mais sensíveis (ovinos e caprinos), além de reduzir o risco de infecção do homem pelo consumo de carne infectada (DUBEY, 1996). Toda carne para consumo deve ser cozida a uma temperatura mínima de 67°C (DUBEY, 2004), pois ainda são inexistentes métodos economicamente viáveis que garantam ao consumidor um produto seguro, livre de contaminação por *T. gondii* (MILLAR et al., 2008). Segundo Farjado et al. (2013) a identificação de fatores de risco é fundamental para se estabelecer métodos adequados na criação de animais, promovendo o controle e prevenção de doenças, afim de produzir uma carne para consumo humano livre das formas infectantes do parasita.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Pesquisar a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* através da técnica de diagnóstico sorológica e detecção do parasito através da técnica de diagnóstico molecular em amostras de sangue e tecido cerebral de bubalinos procedentes da Ilha de Marajó, naturalmente infectados por *Toxoplasma gondii*, comparando estas duas técnicas no diagnóstico da Toxoplasmose.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soros de bubalinos através da RIFI.
- Fazer a detecção do *T. gondii* em amostras de sangue e tecido cerebral de bubalinos pela técnica da PCR.
- Realizar estudo comparativo entre a PCR e RIFI no diagnóstico da Toxoplasmose em rebanhos bubalinos da Ilha do Marajó.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 200 amostras (sangue, n=100 e tecido cerebral, n=100) de bubalinos, procedentes da Ilha de Marajó, independente de idade e sexo, submetidos ao abate em um abatedouro-frigorífico legalizado do município de Belém, no período de agosto a novembro de 2015. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará (UFPA), Estado do Pará, sob o número 07-2015.

As amostras foram obtidas ao longo do fluxograma de abate. Para a análise sorológica (RIFI), o sangue foi colhido durante a sangria em tubos vacutainer sem anticoagulante, num volume aproximado de 8 mL e para as análises moleculares colheu-se aproximadamente 4 ml de sangue em tubo vacutainer com anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético). Os tubos devidamente identificados foram e mantidos sob refrigeração para posterior processamento.

De cada animal foi coletado o tecido cerebral, que foi identificado e acondicionado em sacos plásticos estéreis e mantidos sob refrigeração até o Laboratório de Tecnologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará (LTB-UFPA). Para a análise histopatológica, foi retirado um fragmento aleatório de aproximadamente 5 mm de espessura de cada segmento do encéfalo, que foram fixados em frascos tipo Falcon contendo formaldeído a 10% tamponado. Fragmentos de aproximadamente 20g de cada segmento do tecido cerebral foram colhidos e macerados com auxílio de um almofariz e pistilo, acondicionados em frascos plásticos estéreis e congelados até o momento da análise molecular.

As análises para extração de DNA e testes de PCR do sangue total e do tecido cerebral foram realizadas no LTB-UFPA. Já os soros, para o teste da RIFI, foram processados no Laboratório de Toxoplasmose do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, localizado em Ananindeua, Pará. A análise histopatológica foi executada pelo Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (LABOPAT-UFRA).

4.2 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

4.2.1 Para detecção de *T. gondii* por *nested* PCR

4.2.1.1 Extração de DNA do tecido cerebral

A extração do DNA das amostras de tecido cerebral foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Biase et al. (2002), com algumas alterações. Aproximadamente 200 mg do macerado de cada amostra foi transferido para um microtubo *Eppendorf* de 2 mL e adicionado 800 µL de solução de extração (50mM de Tris-HCL, pH 8,0; 25mM de EDTA e 400mM de NaCl), mais 100µL de 10% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), 20 µL de proteinase K (10 µg/mL) e 20 µL de RNase (10 µg/mL). O extrato foi homogeneizado e incubado a 65°C durante 3 horas. Após incubação, as proteínas e detritos celulares foram precipitados pela adição de 300µL de NaCl (6M) e mantidas a 4°C durante 15 minutos. Foi realizada uma centrifugação a 14.000 RPM (Rotações por minuto) durante 20 minutos. Em seguida 500 µL de sobrenadante foi transferido para outro microtubo *Eppendorf* de 2mL, com 500 µL de cloridrato de guanidina (8M e Ph 8,0) e 500 µL de acetato de amônio (0,49M) que foram mantidos em agitação suave por 90 minutos. Depois, o DNA foi precipitado adicionando 500µL de álcool isopropílico (100%) gelado e centrifugado a 10.000 RPM durante 5 minutos. Os pellets foram lavados com 400µL de álcool isopropílico (70%). Após secagem foi adicionado 50 µL de tampão TE (10mM de Tris-HCl, pH 8,0; EDTA 1mM). As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

4.2.1.2 Extração de DNA do sangue total

O DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio, conforme o protocolo descrito por Sambrook, Ritsch e Aniatís (1989). Em um microtubo *Eppendorf* de 1,5 mL foram adicionados 300 µL de sangue total, 300 µL de tampão de homogeneização, 300 µL de tampão de Lise, 15 µL de proteinase K (10 µg/mL) e 15 µL de RNase (10 µg/mL), o extrato era incubado a 56°C durante 1 hora e homogeneizado a cada 10 minutos. Após incubação foi adicionado 600µL de fenol-clorofórmio agitados manualmente por 5 minutos e em seguida centrifugado a 13.000 RPM durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo *Eppendorf* de 1,5 mL e adicionado 600 µL de álcool- isoanil (CIA), onde foram agitados manualmente por 5 minutos e centrifugado a 13.000 RPM durante 10 minutos. O

sobrenadante foi transferido para um novo microtubo *Eppendorf* de 1,5 mL e adicionado 100 µL de acetato de sódio (3M, pH 4,8) e 500 µL de álcool isopropílico, onde foi agitado até visualizar o DNA e centrifugado a 13.000 RPM por 2 minutos, depois o sobrenadante foi descartado cuidadosamente sem perder o pellet de DNA. Foi adicionado 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 13.000 RPM por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA foi seco em placa aquecedora a 54°C por 5 minutos, foi adicionado 35 µL de tampão TE (10mM de Tris-HCl, pH 8,0; EDTA 1mM). As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

4.2.1.3 *Nested* PCR

Com o intuito de confirmar a presença do gene B1 de *T. gondii* no material genômico de sangue e tecido cerebral, as amostras foram submetidas à amplificação por *Nested*-PCR de acordo com Yildiz et al. (2014).

O par de iniciadores Toxo 1 (5'-GAACTGCATCCGTTTCATGAG-3') e Toxo 2 (5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3') foram utilizados na primeira reação da PCR e o par de iniciadores Toxo 3 (5'-TGCATAGGTTGCCAGTCACTG-3') e Toxo4 (5'-GGCGACCAATCTGCGAATACACC-3'), na segunda reação (*nested*), amplificando fragmentos de 197pb e 97pb, respectivamente.

Para a realização da primeira reação de PCR, foram utilizadas as seguintes misturas: 17,10 µL de H₂O, 2,5 µL de Buffer, 0,7 µL de DNTP, 1,5 µL de MgCl₂, 1,0 µL de cada primer, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase e 1,0 µL de DNA, enquanto que para a realização da segunda reação de PCR, os volumes consistiram de: 17,85 µL de H₂O, 2,5 µL de Buffer, 0,7 µL de DNTP, 0,5 µL de MgCl₂, 1,0 µL de cada primer, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase e 1,5 µL de DNA.

As amplificações foram realizadas em termociclador e as condições de PCR constituíram-se, para ambas as reações, de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 51°C (para as duas fases) e 30 segundos a 72°C, seguidos de uma extensão final de 7 minutos a 72°C. A cada reação foi incluído um controle positivo (DNA extraído de cepa RH de Taquizoítos de *T. gondii*) e um controle negativo (água ultrapura).

4.2.1.4 Gel eletroforese

Para a detecção dos fragmentos amplificados, 6 µL de cada uma das reações foram misturados a 2,5 µL de *GelRedTM Nucleic Acid stain* (Biotium) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), a uma voltagem constante de 80V durante 40 minutos e visualização em fotodocumentador E-BOX VX2 (Vilber Lourmat[®]). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado comparando-se com os marcadores de peso molecular 100 pb e/ou 1 Kb (DNA ladder Invitrogen[®]).

4.2.2 Para o teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

4.2.2.1 Preparo das lâminas

Os soros foram testados pela técnica de RIFI para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* de acordo com protocolo descrito por Camargo (1974). No preparo das lâminas, foi utilizada uma suspensão de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtida de lavado intraperitoneal de camundongos, infectados experimentalmente para esta finalidade. Na lâmina foram adicionados 20µL de suspensão de taquizoítos em cada poço da lâmina que logo em seguida foram deixadas para secar a temperatura ambiente e em seguida acondicionadas em caixas de polipropileno à temperatura de -20°C até o momento do uso.

4.2.2.2 Triagem e titulação

Foi considerado como ponto de corte a diluição dos soros testes, soros controles positivos e negativos em 1:64. Os soros foram diluídos em solução salina tamponada (PBS) em pH 7,2, nas diluições: 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 e 1:2048, sendo posteriormente adicionado 20µL do soro diluído em cada poço da lâmina, previamente sensibilizada com *T. gondii*. Em seguida cada lâmina era colocada em câmara úmida para incubar a 37°C por 30 minutos em estufa. Decorrido este período as lâminas foram submetidas a três lavagens. As lavagens foram realizadas com PBS, pH 7,2, e posteriormente secas à 37°C na estufa. Em seguida, foi colocado, em cada poço, 20µL do conjugado (IgG de coelho contra IgG de bovino, marcada com isotiocianato de fluoresceína - Sigma/F-7887), contendo azul de Evans a 0,01%, previamente diluído a 1:450 e novamente incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas como descrito anteriormente e

colocadas para secar. Para montagem das lâminas utilizou-se glicerina tamponada em pH 8,0 e lamínulas.

4.2.2.3 Leitura

A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus - modelo Bx 60 F5) com aumento de 400X. Foi considerado como reação positiva a visualização de um verde fluorescente intenso e total na superfície dos taquizoítos reagentes na diluição inicial 1:64 e negativa a ausência de fluorescência ou fluorescência apical ou parcial.

4.2.3 Para Histopatológica

Para avaliar possíveis alterações microscópicas associadas à presença de pseudocistos de *T. gondii*, nos tecidos cerebrais, fragmentos fixados, dos casos positivos à análise de *nested* PCR, foram acondicionados em cassetes previamente identificados e processados segundo a técnica histológica de rotina descrita por Tolosa et al. (2003). No processamento, os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo (Leica RM2125 RTS) para obtenção de cortes de 5µm de espessura que foram dispostos em lâminas de vidro que foram desparafinizadas, hidratadas, coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE) e montadas em lamínulas com ERV-Mount®. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico nas objetivas de 10x e 40x.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 100 amostras de soro analisadas pela RIFI, 14% (14/100) foram reativas a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, com titulações de 64 e 256, não havendo animais reagentes nas demais titulações (Tabela 2).

Tabela 2 - Soropositividade e titulação de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG pela técnica de RIFI, em soro de bubalinos.

| Município | Amostras | Amostras Positivas RIFI | Titulação amostras positivas | | | | |
|---------------------|-----------|-------------------------|------------------------------|-----|----------|-----|------|
| | | | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 |
| Chaves | 40 | 8 | 6 | - | 2 | - | - |
| Salvaterra | 10 | 0 | - | - | - | - | - |
| Cachoeira do Arari | 30 | 0 | - | - | - | - | - |
| Soure | 10 | 5 | 5 | - | - | - | - |
| Santa Cruz do Arari | 10 | 1 | 1 | - | - | - | - |
| Total (%) | 100(100%) | 14(14%) | 12(85,7%) | 0 | 2(14,3%) | 0 | 0 |

No Brasil, os dados sobre ocorrência de *T. gondii* em bubalinos ainda são pouco discriminados e a literatura consultada apresenta ampla variação de resultados. Estudos utilizando a técnica de RIFI em amostras de bubalinos encontraram variações de amplitude entre 1,1% (SILVA et al., 2010) e 50,4% (OLIVEIRA, 2015), enquanto que na espécie bovina variou entre 1,96% (LUCIANO et al., 2011) e 30,80% (MOURA et al., 2010).

A ocorrência de *T. gondii* observada nos bubalinos do presente estudo está próxima aos encontrados na espécie bovina de outras regiões do país pela técnica de RIFI, onde no Estado da Bahia, Spagnol et al. (2009) observaram 11,83% (71/600) e no Estado do Rio Grande do Sul, Santos et al. (2013) registraram 17,4% (21/121). Segundo Hamidinejat et al. (2010) a infecção pelo *T. gondii* ocorre de forma semelhante nas espécies bovina e bubalina, uma vez que a resposta de anticorpos para o bioagente não persiste por toda a vida, além de diminuir com o aumento da idade.

Valores superiores aos resultados deste estudo foram observados em outros trabalhos no Estado do Pará, que utilizaram a técnica de RIFI, como: Oliveira (2015) em 2010 a 2011 verificaram uma soropositividade por *T. gondii* em búfalos que chegou a 50,4% (162/321) e em bovinos 44,1% (772/1749), com origem de diversas regiões do Estado, já Silva et al.

(2013) em 2009 a 2011, também registraram 32% (60/186) de búfalos sororeagentes no Estado do Pará, no entanto, Silva et al. (2010) verificaram uma baixa ocorrência em búfalos de 1,1% (4/374).

Comparando com outros estudos de ocorrência em bubalinos em outros estados do Brasil, os resultados encontrados foram superiores aos deste estudo, como Souza et al. (2001) em São Paulo e Santos et al. (2013) no Rio Grande do Sul, que encontraram, respectivamente, 49,9% (205/411) e 27,2% (46/169) de sororeagentes. Contudo esses dados são maiores do que os registrados por Esteves et al. (2013) no Peru, com uma soroprevalência de 8,8% (6/70).

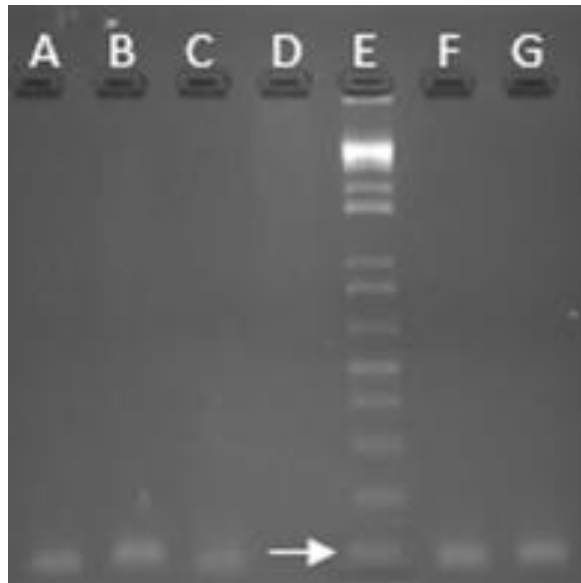
A presença do hospedeiro definitivo em diferentes regiões geográficas e as condições de manejo em fazendas (FAJARDO et al., 2013), são fatores que devem ser considerados ao avaliar essa diferença de ocorrência relatadas, principalmente em relação ao Marajó, que segundo Barbosa (2005) apresenta um sistema de manejo precário e com um sistema de criação extensiva. Além disso, os felinos selvagens podem atuar como disseminadores de oocisto nas pastagens (ESTEVES et al., 2013), sendo esta a principal fonte de transmissão para bovinos (MARANA et al., 1994) e em bubalinos a infecção é favorecida porque esses animais mantêm uma relação direta com outras espécies domésticos e silvestres (SILVA et al., 2013).

Analisando os dados deste trabalho com outros realizados em diferentes regiões do Brasil observa-se uma grande variação nas taxas de ocorrências encontradas que pode ser justificada pela a sensibilidade e especificidade das técnicas de diagnóstico, assim como a falta de uma padronização quanto ao ponto de corte e qualidade dos antígenos utilizados para confecção das lâminas de RIFI, podendo ocasionar variações entre resultados obtidos por diversas pesquisas (SILVA et al., 2013).

Segundo James et al. (1996), as técnicas sorológicas apresentam uma sensibilidade e especificidade variável. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é preferida a outras técnicas por detectar o DNA do *T. gondii* com alta sensibilidade e especificidade.

Em relação à análise das amostras deste estudo por *nested* PCR foi observada positividade em 3% (3/100) das amostras de sangue total e 1% (1/100) das amostras de tecido cerebral (Figura 2).

Figura 2- Detecção de *T. gondii* através de *nested* PCR, em amostras de sangue e tecido cerebral de bubalinos. Linhas A e B correspondem a amostra de sangue positivas para *T. gondii*; Linha C corresponde ao controle positivo para *T. gondii*; Linha D corresponde ao controle negativo da reação; Linhas F e G: correspondem a amostra de sangue e tecido cerebral positiva para *T. gondii*; Linha E corresponde ao *Ladder* 100 pb (O'GeneRuler). A seta corresponde ao fragmento de 100 pb do *ladder*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Este é o primeiro resultado obtido no Brasil de detecção, através de técnica molecular de *T. gondii* em amostras teciduais na espécie bubalina. Entretanto, no Paquistão, estudos de Chaudhary et al. (2006) demonstraram por PCR o gene B1 de *T. gondii* em amostras de sangue em 22% (11/50) bubalinos e 20% (10/50) em açougueiros, enquanto que, Arshi et al. (2015), no Irã, identificaram 6,95% (16/155) de positividade em sangue de bovinos, valores bem superiores ao registrado no presente trabalho. Essa diferença pode ser explicada pelas diversidades climáticas entre regiões, além da peculiaridade dos sistemas de produção em diferentes países, que podem, segundo Benigno et al. (2009), determinar diferentes comportamentos na infecção por *T.gondii*.

Analisando os resultados do teste sorológico com o teste molecular, neste estudo, 14% (14/100) dos animais foram soropositivos pela RIFI e 3% (3/100) em amostras de sangue e 1% (1/100) em amostras de cérebro pela PCR, no entanto, apenas um animal teve a amostra de cérebro positiva tanto na PCR quanto na RIFI. A diferença entre positivos pela técnica de RIFI e PCR pode ser observada em apenas um estudo encontrado na literatura consultada, realizado na espécie canina por Sorte et al. (2015) em Cuiabá, MT, que observou a prevalência de *T. gondii* em amostras de sangue de cães de área urbana e rural com 48,7% (131/269) soropositivos pela técnica de RIFI e 15,6% (42/269) positivos pela PCR.

No presente estudo os animais positivos na pesquisa molecular de amostras sanguíneas foram negativos na pesquisa imunológica, tal fato pode ter ocorrido em virtude da resposta imune do hospedeiro, uma vez que com o parasito ainda circulante no sangue os

níveis de IgG tendem a ser mais baixos não sendo detectados na RIFI. Silva e Chioccola (2010), em pesquisa experimental em camundongos verificaram que durante uma infecção aguda por *T. gondii* os níveis de IgM estão elevados e os níveis de IgG estão baixos, apresentando uma avidéz baixa e os taquizoítas podem estar presentes na circulação sanguínea, no entanto, na infecção crônica os níveis de IgM diminuem e os níveis de IgG aumentam apresentando uma alta avidéz e os taquizoítas não são mais detectáveis no sangue, o que sugere que as amostras dos referidos animais podem ter sido coletadas durante a fase aguda da doença.

Nesse estudo, nas amostras de cérebro, apenas 1% (1/100) foi positiva ao *nested* PCR, resultado este que está bem abaixo do que foi encontrado na Turquia por Yildiz et al. (2014), em amostras cerebrais de ovinos, onde 78,2% (36/46) dos animais foram positivos pela PCR. A razão para tão grande diferença, pode ser entendida pelas metodologias utilizadas para obtenção do material genômico, visto que no presente estudo a extração de DNA foi obtida a partir da amostra de tecido cerebral macerada, enquanto que Yildiz et al. (2014), extraíram o DNA a partir de cistos do tecido cerebral diluídos em Percoll gradiente. Esses cistos, segundo Silva e Chioccola (2010), na fase crônica da infecção por *T.gondii*, são facilmente encontrados no tecido cerebral.

Contudo, o tamanho da massa encefálica e a susceptibilidade da espécie a infecção são fatores que devem ser considerados ao comparar esses resultados. Ainda deve ser levado em conta que nos bubalinos as prevalências por *T. gondii* são menores que as registradas para os ovinos (HILL; DUBEY, 2002).

As quatro amostras positivas pela *nested* PCR foram analisadas histologicamente em relação ao tecido cerebral, o qual não apresentou nenhuma estrutura morfológica característica do cisto de *T. gondii*. Resultados semelhantes ao encontrado por Silva, Brandão e Ferreira (2013) em amostras de cérebro e outros tecidos de ovinos, que apesar de encontrarem lesões microscópicas estas não puderam ser necessariamente atribuídas ao *T. gondii* uma vez que não identificaram a forma cística nas referidas amostras, diferindo dos achados de Berenreiterova et al. (2011) que encontraram cistos de *T. gondii* em todas as áreas do cérebro de camundongos infectados experimentalmente.

De acordo com Sudan et al. (2015), o tamanho da amostra e a fase parasitária são fatores de grande relevância para pesquisa histopatológica, já que o parasita pode apresentar distribuição focal em tecidos, dificultando assim a detecção por técnicas rotineiras de histopatológica.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pelo presente estudo demonstraram uma baixa ocorrência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soro de bubalinos através da RIFI, portanto, pode-se concluir que a infecção por este protozoário encontra-se presente em bubalinos criados na Ilha de Marajó.

Foi possível detectar a presença do material genômico do *T. gondii*, através da PCR, em amostras de sangue e tecido cerebral de bubalinos criados na Ilha de Marajó, no entanto, há a necessidade de mais estudos, utilizando a técnica molecular no diagnóstico da toxoplasmose uma vez que, a detecção do bioagente em búfalos torna ainda mais relevante à importância desses animais na cadeia epidemiológica da toxoplasmose como prováveis fontes de infecção principalmente para o ser humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCB-Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. **Raças**. Disponível em: <www.bufalo.com.br>. Acesso em: 22 jan. 2016.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. Washington: PAHO, 2003. 395 p.
- ARSHI, A. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* from native cattle in southwest of Iran. **Animal and Veterinary Sciences**, v.3, n.4, p.102-105, 2015.
- BARBOSA, N. G. S. Bubalinocultura no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.1, p.34-38, 2005.
- BAYARRI, S. et al. ***Toxoplasma gondii* in meat and food safety implications - A Review**. In: Zoonosis. LORENZO-MORALES, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/zoonosis/toxoplasma-gondii-in-meat-and-food-safety-implications-a-review>> Acesso em: 15 jan 2016.
- BENIGNO, R. N. M. et al. Avaliação soroepidemiológica da toxoplasmose em bovídeos criados no Marajó e encaminhados para abate em Belém, Pará. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v.9, n.1, p.14-23, 2009.
- BERENREITEROVA, M.; et al. The Distribution of *Toxoplasma gondii* Cysts in the Brain of a Mouse with Latent Toxoplasmosis: Implications for the Behavioral Manipulation Hypothesis. **PLoS ONE**, v.6, n.12, p.1-14, 2011.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p. 293-298, 2007.
- BERNARDES, O. Integração associativismo e arranjos na cadeia produtiva da bubalinocultura: Situação atual e perspectivas. In: SIMPÓSIO DA CADEIA PRODUTIVA DA BUBALINOCULTURA. 2., São Paulo, 2011. **Anais...** São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2011. p.1-10
- BIASE, F. H. et al. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.3, p.313-315, 2002.
- BOLETIM Agropecuário do Estado do Pará 2015. [da] FAPESPA - Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará. Belém, 2015. 38 p.
- BRASIL. Decreto de 30 de julho de 2007. **Plano de Desenvolvimento Territorial Sustentável do Arquipélago do Marajó**. Governo do Estado do Pará, 2007.
- CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, n.30, p.87-107, 1974.

CARMO, E. L. et al. Surto de toxoplasmose humana no distrito de Monte Dourado, Município de Almeirim, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.1, p.61-66, 2010.

CARNEIRO, A. C. A. V. **Caracterização molecular de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de crianças com toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais**. 2011. 191 f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CASELLA, A. M. B. et al. **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 2010. 71 p.

CFSPH - The Center for Food Security & Public Health. **Toxoplasmosis**. Iowa State University. 2005. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/toxoplasmosis.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

CHAUDHARY, Z. I. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* infection in butchers and buffaloes by polymerase chain reaction and latex. **Pakistan Journal Zoology**, v.38, n.4, p.333-336, 2006.

COLA, G. A. et al. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do teste de aglutinação modificado na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ratos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.717-722, 2010.

COSTA, G. H. N.; et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.1, p.61-66, 2001.

COSTA, T. L. et al. *Toxoplasma gondii*: Toxoplasmose, com ênfase no diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**, v.37, p.191-207, 2008.

DIAS, R. A. F. et al. *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.

DINÂMICA da pecuária bovina e bubalina no estado do Pará: 1990-2010 - Análise das campanhas de vacinação contra febre aftosa: 2009 e 2010/ Instituto de Desenvolvimento Social, Econômico e Ambiental do Pará; Agencia de defesa Agropecuária do Pará.- Belém: IDESP, ADEPARA, 2012. 76p.

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

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

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

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 220 p.

ESTEVEZ, K. V. et al. Determinación de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en el distrito de Jenaro Herrera, Loreto, Perú. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v.24, n.3, p.390-395, 2013.

FAJARDO, H. V. et al. Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais State, Southern Brazil. **Parasites & Vectors**, v.6, p.191, 2013.

FERRARONI, J. J.; MARZOCHI, M. C. A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos humanos da Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.75, n.1-2, p.99-109, 1980.

FUNASA-Fundação Nacional de Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, 2002. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_ano02_03.pdf. Acesso em: 18 set. 2015.

GENCAY, Y. E. et al. A potential infection source for humans: Frozen buffalo meat can harbour tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. **Food Control**, v.30, p.86-89, 2013.

GOMES, M. C. O. Sorologia para toxoplasmose. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v.6, n.2, p.8-11, 2004.

GOMES, E. B. Análise exploratória da potencialidade de consumo mundial à carne e o leite de búfala. In: PERSPECTIVAS E TENDÊNCIAS EM BIOENERGIA E PRODUÇÃO DE ALIMENTOS. São Paulo, 2013. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Tecnologia de Ourinhos, 2013. p.1-4.

GONCALVES, D. D. et al. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, 135-140, 2006.

HAMIDINEJAT, H. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in South-West of Iran. **Tropical Biomedicine**, v.27, n.2, p.275-279, 2010.

HILL, D.; DUBEY, P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n.10, 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.

JAMES, G. S. et al. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.1572-1575, 1996.

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

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 163-172 p.

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

LANGONI, H. et al. Serological profile of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, SP, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.12, n.1, p.142-148, 2006.

LIU, Q. et al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v.8, p.292, 2015.

LOPES, C. C. H.; BERTO, B. P. Aspectos associados à toxoplasmose: uma referência aos principais surtos no Brasil. **Saúde e Ambiente em Revista**, v.7, n.2, p.01-07, 2012.

LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; GARCIA, A. R. Panorama da bubalinocultura na Amazônia. In: Encontro Internacional da Pecuária da Amazônia, 1, 2008, Belém, PA. Meio ambiente e pecuária: [anais]: FAEPA; Instituto Frutal; SEBRAE-PA, 2008.

LUCIANO, D. M. et al. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.4, p.351-353, 2011.

MACEDO, M. F. S. B. et al. Serum occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cows slaughtered in an abattoir for human consume. **Ciência Rural**, v.42, n.6, p.1065-1069, 2012.

MARANA, E. R. M. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos de corte, abatidos em matadouros do norte do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.15, n.1, p.38–40, 1994.

MARQUES, J. M. et al. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de uma comunidade rural do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.4, p.889-898, 2009.

MILLAR, P. R. et al. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.3, p.693-706, 2008.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v.363, n. 9425, p.1965 –1976, 2004.

MOURA, A. B. et al. Detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte abatidos em Guarapuava, PR, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v.15, n.2, p.94-99, 2010.

NALBANTOGLU, S. et al. Sero-prevalance of *Toxoplasma gondii* by the sabin-feldman and indirect fluorescent antibody tests in cattle in the Turkish Republic of Northern Cyprus. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.26, p.825-828, 2002.

NEMATOLLAHI, A.; MOGHDDAM, G.H. Survey on seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle in Tabriz (Iran) by IFAT. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.3, p.40-42, 2008.

OLIVEIRA, F. C. R. et al. Distribuição e viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) em tecidos de *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* infectados com oocistos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 23, n.1, p.28-34, 2001.

OLIVEIRA, A. F. M. et al. Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos na região Norte Fluminense. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.1, p.53-54, 2005.

OLIVEIRA, A. L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.2, p.122-134, 2005.

OLIVEIRA, J. P. **Distribuição espacial de anticorpos IgG para *Toxoplasma gondii* em um estudo soroepidemiológico realizado em bovídeos no Estado do Pará.**2015.117f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

PERDONCINI, G. et al. Prevalência de *Toxoplasma gondii* em aves e suínos: um problema para saúde pública. **Revista Unoesc & Ciência**, v.1, n.1, p.57-64, 2010.

PEREIRA, K. S.; FRANCO, R. M. B.; LEAL, D. A. G. Transmission of toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.60, p.1-9, 2010.

RAHDAR, M.; SAMARBAF-ZADEH, A. R.; ARAB, L. Evaluating the prevalence of *Toxoplasma gondii* in meat and meat products in Ahvaz by PCR method. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.5, p.570-573, 2012.

SAMBROOK, J. F.; RITSCH, E. F.; ANIATIS, M. T. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1696p.

SANTOS, L. M. J. et al. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in water buffaloes and meat cattle in Rio Grande do Sul State, southern Brazil. **Acta Parasitologica**, v.58, n.3, p.334-336, 2013.

SELVARAJ, J. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in buffaloes. **Journal of Veterinary Parasitology**, v.21, n.1, p.41-42, 2007.

SILVA, A. V. et al. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v.33 ,n.1, p.115-119, 2003.

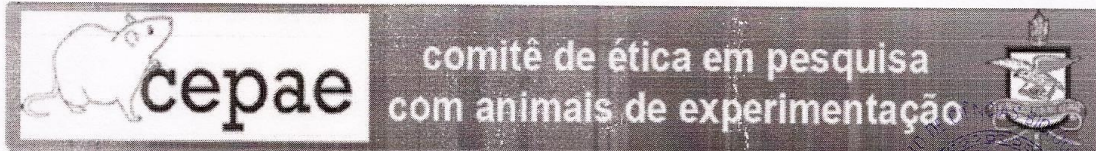
SILVA, F. W. S. et al . Toxoplasmose: uma revisão. **Ciência Animal**, v.16, p.71-77, 2006.

- SILVA, S. P. et al. Anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas no estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.443-446, 2010.
- SILVA, T. A. C.; CHIOCCOLA, V. L. Fase aguda da infecção por *Toxoplasma gondii*: avaliação do parasitismo sanguíneo e a resposta humoral em camundongos isogênicos AS/n. **Scientia Medica**, v.20, n.1, p.88-92, 2010.
- SILVA, A. F.; BRANDÃO, F. Z.; FERREIRA, A. M. R. Isolamento de *Toxoplasma gondii* em tecidos de ovinos destinados ao abate em um matadouro sem fiscalização sanitária do estado do rio de janeiro. **Arquivos e Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.16, n.2, p.211-212, 2013.
- SILVA, J. B. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.5, p.581-585, 2013.
- SOUZA, L. M. et al. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.1, p.39-48, 2001.
- SPAGNOL, F. H. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos em matadouros do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.2, p.42-45, 2009.
- SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA, S; M. Toxoplasmose. **Biológico**, v.71, n.1, p.13-15, 2009.
- SORTE, E. C. B. et al. Serological and molecular detection of *Toxoplasma gondii* in dogs of urban and rural areas of Cuiaba, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrária**, v.36, n.6, p.3705-3712, 2015.
- SUDAN, V. et al. Comparison of histopathology and PCR based assay for detection of experimentally induced toxoplasmosis in murine model. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.8, n.6, p.447-450, 2015.
- SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, n. 8, p.01-06, 2007. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano07_n08.pdf> Acesso em: 10 dez. 2015.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **The International Journal Parasitology**, v.30, p.1217-1258, 2000.
- TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.2, p.364-369, 2009.
- TOLOSA, E. M. C.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Manole, 2003. 331 p.

WEBSTER, J. P. Review of “Toxoplasmosis of animals and humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. **Parasites & Vectors**, v.3, p.112, 2010.

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

ANEXO



PARECER CEPAE 07-2015

Projeto: Pesquisa direta e indireta de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em búfalos no Estado do Pará.

Coordenador: Profa. Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias.

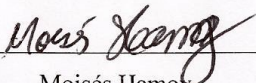
Área Temática: Patologia Veterinária (Doenças infecto contagiosas)

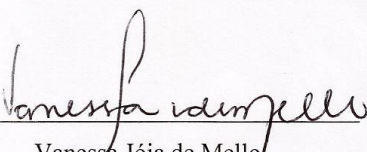
Vigência: Início: 01/08/2015 Término: 31/07/2019

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria No 0276/2015 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais (Búfalos abatidos para o consumo humano) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 30 de julho de 2015


 Moisés Hamoy
 Presidente do CEPAE-UFPA


 Vanessa Jóia de Mello
 Vice –Presidente do CEPAE-UFPA