

Protocolos para investigação de *Toxoplasma gondii* em amostras ambientais e alimentares



MINISTÉRIO DA SAÚDE
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Protocolos para investigação de *Toxoplasma gondii* em amostras ambientais e alimentares

Brasília DF 2020



2020 Ministério da Saúde. Universidade Estadual de Londrina.



Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: www.saude.gov.br/bvs.

Tiragem: 1ª edição – 2020 – versão eletrônica

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Vigilância em Saúde

Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis

Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial

Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde

Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública

SRTVN, Quadra 701, via W 5 Norte, lote D,

Edifício PO 700, 6º andar

CEP: 70719-040 – Brasília/DF

Site: www.saude.gov.br/toxoplasmosose

E-mail: toxoplasmosose@saude.gov.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380,

Campus Universitário

CEP: 86057-970 – Londrina/PR

Site: www.uel.br

E-mail: italmar@uel.br/fernandaferreira@uel.br

Organização:

Felipe Danyel Cardoso Martins – DMVP/UDEL

Fernanda Pinto Ferreira – DMVP/UDEL

Italmar Teodorico Navarro – DMVP/UDEL

João Luis Garcia – DMVP/UDEL

Karina Ribeiro Leite Jardim Cavalcante – SVS/MS

Patrícia Miyuki Ohara – SVS/MS

Regina Mitsuka Breganó – DMVP/UDEL

Roberta Lemos Freire – DMVP/UDEL

Rosalynnd Vinícios da Rocha Moreira – SVS/MS

Winni Alves Ladeia – DMVP/UDEL

Colaboração:

Camila Vicente Bonfim – SVS/MS

Fernanda Barbosa de Queiroz – SVS/MS

Luiz Felipe Lomanto Santa Cruz – SVS/MS

Marcelo Yoshito Wada – SVS/MS

Nélio Cezar de Aquino – Anvisa

Rejane Maria de Souza Alves – Funasa

Vanessa de Paula Ferreira – SVS/MS

Revisão técnica:

Fernanda Pinto Ferreira – DMVP/UDEL

Italmar Teodorico Navarro – DMVP/UDEL

Roberta Lemos Freire – DMVP/UDEL

Diagramação:

Sabrina Lopes – Nucom/SVS

Normalização:

Daniela Ferreira Barros da Silva – Editora MS/CGDI

Revisão:

Tamires Felipe Alcântara – Editora MS/CGDI

Tatiane Souza – Editora MS/CGDI

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde.

Protocolos para investigação de *Toxoplasma gondii* em amostras ambientais e alimentares [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Universidade Estadual de Londrina. – Brasília : Ministério da Saúde, 2020.

42 p. : il.

Modo de acesso: World Wide Web: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_toxoplasma_amostras_ambientais_alimentares.pdf

ISBN 978-85-334-2823-2

1. Toxoplasma. 2. Diagnóstico. 3. Alimentos. 4. Meio ambiente. I. Universidade Estadual de Londrina. II. Título.

CDU 616.993.1

Catalogação na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2020/0148

Título para indexação:

Protocols for investigating *Toxoplasma gondii* in environmental and food samples

Sumário

Introdução	5
Características e impactos de surtos de toxoplasmose por via hídrica e alimentar	6
Importância de confirmação de surtos	6
Dificuldade e limitações	6
Importância do isolamento e genotipagem	7
Breve histórico	8
Etapas analíticas	10
Concentração	10
Purificação	10
Detecção	10
Detecção de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de água	12
Definição de amostra	12
Indicação	12
Material	12
Coleta	13
Concentração	13
Purificação	14
Detecção	15
Detecção de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de lodo e água de retrolavagem de filtros	16
Definição de amostra	16
Indicação	16
Material	16
Coleta	17
Concentração	17
Purificação	18
Detecção	18
Detecção de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostra de solo	19
Definição	19
Indicação	19
Material	19
Coleta	20
Concentração	20
Purificação	21
Detecção	21

Detecção de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras hortaliças folhosas	22
Definição de Amostra	22
Indicação	22
Material	22
Coleta	22
Concentração	23
Purificação	23
Detecção	24
Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de leite	25
Definição	25
Indicação	25
Material	25
Coleta	26
Concentração	26
Detecção	26
Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de queijo	27
Definição	27
Indicação	27
Material	27
Concentração	27
Detecção	28
Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de carne	29
Definição	29
Indicação	29
Material	29
Coleta	30
Concentração	30
Detecção	33
Biologia molecular	35
Extração e Purificação de Ácido Desoxirribonucleico – DNA	35
Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	36
Execução da técnica de PCR	36
Eletroforese em Gel de Agarose	37
Execução da técnica de eletroforese em gel de agarose	38
Observações finais	40
Referências	41

Introdução

A toxoplasmose é uma doença infecciosa, endêmica no Brasil, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular obrigatório de distribuição cosmopolita. A transmissão horizontal ocorre por meio da ingestão de oocistos (esporozoítas), cistos (bradizoítas) e taquizoítas. Os oocistos são eliminados nas fezes de felídeos (hospedeiros definitivos), como o gato; e, no ambiente, sofrem esporulação, contaminando areia, solo, água e vegetais. Os cistos teciduais podem ser ingeridos por meio do consumo de carnes cruas ou malcozidas. Outras vias de transmissão incluem: ingestão de leite de cabra, transfusão de sangue e transplante de órgãos (MITSUKA-BREGANÓ; LOPES-MORI; NAVARRO, 2010).

A transmissão vertical pode ocorrer quando a gestante adquire infecção primária durante a gestação, os taquizoítas atravessam a barreira placentária e atingem o feto. Apesar do caráter endêmico da toxoplasmose, a notificação de surtos em humanos é baixa quando comparada a outras doenças alimentares. Isso ocorre devido ao caráter autolimitante da infecção em indivíduos imunocompetentes, com manifestações clínicas ausentes ou de pouca expressão. A sintomatologia pode ser agravada de acordo com a quantidade do inóculo, via de transmissão, imunidade do indivíduo e virulência da cepa, conferindo sinais clínicos mais severos.

Características e impactos de surtos de toxoplasmose por via hídrica e alimentar

Devido à grande quantidade de oocistos eliminados pelos felídeos durante a primo-infecção e à alta resistência, os oocistos podem atingir muitos hospedeiros. Surtos de toxoplasmose causados por oocistos são oriundos da contaminação do ambiente, da água e de alimentos. Em surtos de veiculação hídrica, o número de pessoas afetadas é maior quando comparado aos de origem alimentar; isso ocorre porque a água é distribuída a muitos indivíduos e permanece como via de transmissão até que seja totalmente utilizada ou consumida e, assim, haja o esgotamento de oocistos na fonte. Em relação aos alimentos, a contaminação geralmente ocorre em lotes, limitando o número de casos. Todavia, a contaminação de grandes lotes distribuídos em diferentes regiões pode levar a casos dispersos em uma grande área geográfica (CHOI *et al.*, 1997; PINTO-FERREIRA *et al.*, 2019).

Importância de confirmação de surtos

Durante a ocorrência de surtos de veiculação hídrica e alimentar, a identificação da via de transmissão é de grande importância para interromper a cadeia de transmissão. A interrupção precoce reduz o número de casos. Um estudo epidemiológico é de extrema importância na seleção das possíveis fontes de infecção e vias de transmissão a serem investigadas. A confirmação destas ocorre por meio do diagnóstico laboratorial/isolamento direto do protozoário, associado às evidências epidemiológicas resultantes de estudos observacionais (e.g.: caso-controle).

Dificuldade e limitações

A conclusão dos surtos de toxoplasmose geralmente se baseia em resultados epidemiológicos, visto que o isolamento do parasita é raro. O aparecimento dos sinais clínicos e as notificações, em sua maioria, são tardios, e essa demora prejudica a confirmação laboratorial, pois amostras ambientais, como a água, renovam-se rapidamente, não restando material representativo do período do evento. Outra dificuldade inerente a esse tipo de amostra é a presença de inibidores naturais de amplificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) em diagnóstico molecular – os ácidos húmicos, produto da degradação de compostos orgânicos, são os mais comuns. Para superar essa dificuldade, devem-se usar *kits* de extração de DNA e protocolos específicos capazes de remover inibidores.

Importância do isolamento e genotipagem

Oocistos de *T. gondii* podem ser encontrados no ambiente em situações comuns, ou seja, sem que haja existência de um surto. Por esse motivo, é importante utilizar ferramentas moleculares capazes de diferenciar os genótipos de *T. gondii*. As amostras ambientais positivas devem ser comparadas aos isolados de amostras clínicas da população atingida, o que permitirá apontar associações plausíveis. Sempre que possível, essa abordagem deverá ser utilizada para se evitar erros: na determinação das fontes de infecção, nas vias de transmissão e, conseqüentemente, na resolução final do surto.

Breve histórico

O primeiro surto de toxoplasmose no mundo, descrito na literatura, ocorreu em 1965 em um seminário em Bragança Paulista, São Paulo, Brasil, afetando nove internos (MAGALDI *et al.*, 1967). Na época, o ciclo do parasita ainda não havia sido completamente elucidado e os autores suspeitaram de inúmeras formas de infecção. Após essa primeira descrição, vários outros surtos foram relatados em todos os continentes, sendo as principais vias de transmissão envolvidas: carne de animais domésticos e de caça; geofagia; leite de cabra não pasteurizado; vegetais de consumo cru; frutas e água. A água, por sua vez, foi a causa dos surtos de maior expressão no mundo, ocorridos em Santa Isabel do Ivaí, no estado do Paraná, entre 2001 e 2002, com um total de 426 afetados, e em Santa Maria (MOURA *et al.*, 2006), no Rio Grande do Sul, em 2018, com mais de 900 casos (MINUZZI *et al.*, 2020). A Tabela 1 lista os principais surtos ocorridos no Brasil desde 1965.

TABELA 1 • Principais surtos de toxoplasmose no Brasil

Ano	Local	Casos (n)	Via de Transmissão Suspeita
1965	SP	09	Carne bovina
1967	SP	99	Carne bovina
1984	MG	03	Leite de cabra
1993	PR	17	Carne de cordeiro
2000	SP	113	Água
2001	PR	426	Água
2004	RS	40	Contato com areia e solo
2005	PA	10	Embutidos (carne suína)
2006	GO	61	Carne de cordeiro
2006	GO	11	Carne de cordeiro
2006	SP	06	Carne bovina
2009	SP	11	Vegetais
2010	RJ	31	Contato com areia e solo
2010	RN	111	Vegetais
2011	RO	141	Vegetais
2011	MT	53	Vegetais
2013	PA	73	Vegetais
2014	PA	45	Vegetais
2015	PR	46	Vegetais
2015	MG	50	Água
2015	RS	88	Carne bovina
2016	PR	22	Vegetais
2017	GO	78	Queijo
2017	ES	20	Vegetais
2017	PR	56	Vegetais
2018	RS	902	Água

Fonte: (PINTO-FERREIRA *et al.*, 2019).

Etapas analíticas

Durante a infecção pelo *T. gondii* em felinos, oocistos são eliminados em grandes quantidades, podendo chegar a 10^6 oocistos por grama de fezes na fase aguda. Mesmo com tamanha eliminação, quando esses oocistos alcançam o ambiente, são diluídos no meio; portanto, nas amostras ambientais são encontrados em concentração menor do que em amostras clínicas. A diferença desses dois tipos de amostras inviabiliza a utilização de alguns métodos amplamente validados e empregados às amostras clínicas no diagnóstico ambiental. Os métodos utilizados em amostras ambientais e de alimentos incluem três etapas principais:

Concentração

A diluição dos oocistos na matriz ambiental pode levar a uma concentração de oocistos abaixo do limite de detecção. O objetivo desta etapa é concentrar um volume maior de oocistos para que as técnicas de detecção sejam capazes de detectar oocistos em amostras com baixa concentração.

Purificação

Durante a etapa de concentração, são concentrados diversos organismos e compostos ambientais, além dos oocistos; portanto, esta etapa tem por objetivo retirar o máximo de componentes que possam interferir na detecção.

Detecção

Na etapa de detecção, há a visualização direta do parasita, seja por meio da sua estrutura morfológica completa, como no caso da microscopia óptica, ou por parte dela, como o DNA observado durante as metodologias moleculares.

A confiabilidade dos resultados das análises depende, em grande parte, da adoção de procedimentos adequados para a coleta e o transporte das amostras. Após a coleta da amostra, é imprescindível que esta seja adequadamente identificada, com data, tipo de material, local coletado e responsável pela coleta.

O material deve ser acondicionado em embalagem vedada, de forma que o conteúdo interno não tenha contato com o externo. Além disso, precisa ser colocado sob refrigeração em caixa isotérmica contendo gelo para transporte até o local de processamento. Caso as amostras não sejam processadas no mesmo município, elas devem ser encaminhadas e entregues ao

laboratório de processamento em um prazo máximo de 48 horas, para que não haja degradação do material. Durante o transporte, deve-se evitar que as amostras fiquem soltas no interior da caixa; para isso, recomenda-se que seja utilizado algum material que as imobilize (e.g. papel, isopor).

Detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de água¹

Definição de amostra

- **Água tratada:** água submetida a processos físicos, químicos ou combinação destes, visando atender ao padrão de potabilidade.
- **Água bruta:** água de mananciais, superficiais ou subterrâneos, captada para ser tratada e distribuída.
- **Água de poço:** água subterrânea captada por meio de escavação/perfuração em solo ou rochas com o objetivo de produzir um furo vertical.
- **Água de mina:** água proveniente de ponto onde a água aflora à superfície do solo.

Indicação

Este protocolo é indicado para a concentração de amostras de água tratada e água bruta. Altos valores de turbidez (>50 UT) diminuem a eficiência da técnica.

Material

- Bombona plástica de primeiro uso.
- Tween 80 (Polisorbato 80).
- Bomba a vácuo (recomenda-se: TECNAL TE-058).
- Mangueira de silicone.
- Kitasato 4 litros.
- Sistema de filtro em vidro do tipo Pyrex.
- Membrana de éster de celulose de no máximo 5 µm de porosidade e 47 mm.
- Placas de Petri.
- Alça plástica calibrada.
- Pipetas de Pasteur descartável.
- Tubos para centrifugação de fundo cônico (50 mL).
- Centrífuga.

¹Protocolo adaptado de Franco *et al.* (2012).

Coleta

A coleta deve ser realizada por meio de bombonas de plástico, tanto em torneiras quanto diretamente no reservatório ou manancial (nesse caso, deve-se prevenir que o ato de coleta não revolva o sedimento). O volume a ser coletado deve ser superior ao volume necessário para a filtração descrito a seguir:

- Água bruta de mananciais superficiais: mínimo 3 litros.
- Água tratada: 100 litros.
- Água de minas e poços: 100 litros.

Concentração

Filtração

1. Conectar a bomba a vácuo, por meio de uma mangueira de silicone, ao sistema.
2. Conectar o sistema de filtro ao Kitasato, assegurando a pressão da sucção a vácuo.
3. Posicionar a membrana disponível na superfície do sistema de filtro em vidro Pyrex.
4. Ligar a bomba a vácuo.
5. Enxaguar o sistema de filtro com Tween® 80 (0,1%).
6. Colocar a amostra de água dentro do coletor do sistema de filtro em vidro Pyrex.
7. Não exceder a velocidade de filtração de **4 L/min**.
8. Sempre que a velocidade da filtração diminuir drasticamente, efetuar a troca, pois houve a saturação da membrana filtrante (a frequência da troca de membranas dependerá da turbidez da amostra de água).
9. Ficar atento à temperatura da bomba a vácuo e, se necessário, desligar em intervalos para evitar queima do aparelho.

A eluição das membranas contendo o concentrado poderá ocorrer posteriormente. Caso a opção seja enviá-las a outro laboratório, recomendamos:

- Acondicionar as membranas utilizadas em sacos plásticos estéreis do tipo *ziplock*, contendo solução de Tween 80 (0,1%).
- Para assegurar a vedação completa, utilizar fita adesiva, garantindo que não haja perda do conteúdo.

Obs.: entende-se por embalagem vedada aquela em que não há contato do conteúdo interno com o externo, nem do externo com o interno.

- Identificar a procedência das membranas (ponto de coleta, cidade, estado).

- Refrigerar e enviar em caixa isotérmica com gelo reciclável.
- Enviar as membranas para análise em até 24 horas após a filtragem.

Eluição das membranas

1. Remover cuidadosamente a membrana do saco plástico, colocar em placa de Petri (estéril) e umedecer com solução de eluição (Tween 80 a 0,1%).
2. Realizar a extração mecânica da membrana com auxílio de alça plástica calibrada durante 20 minutos, obtendo-se o eluído.
3. Centrifugar o eluído juntamente à solução de dentro do saco plástico a 2.100 x g, durante 10 minutos.
4. Retirar o sobrenadante cuidadosamente, com auxílio da pipeta Pasteur.
5. Ressuspender o *pellet* com solução de eluição (Tween 80 a 0,1%).
 - a. Se, na etapa 3, for necessário mais de um tubo, transferir o *pellet* de todos os tubos para um único.
6. Centrifugar a 2.100 x g durante 10 minutos.
7. Retirar o sobrenadante cuidadosamente, com auxílio da pipeta Pasteur, deixando o necessário de solução para ressuspender o sedimento.
8. Acondicionar em microtubo estéril e armazenar sob refrigeração (4°C).

Quando o sedimento final for maior que 500 µL, deve-se realizar a purificação antes da detecção.

Purificação

1. Ressuspender a amostra concentrada (2-5 mL) em 40 mL de solução de sacarose (g.sp.=1,208 g/mL).
2. Centrifugar a 1.250 x g por 10 minutos.
3. Coletar os 5 mL do menisco superficial do material centrifugado com auxílio da pipeta Pasteur e transferir para um tubo de centrifugação de fundo cônico de 50 mL novo.
4. Adicionar 40 mL de água destilada e homogeneizar.
5. Centrifugar a 2.100 x g durante 10 minutos.
6. Descartar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio da pipeta Pasteur e ressuspender o sedimento formado com 0,5 mL – 1,5 mL de **água destilada (deve ser utilizado o volume suficiente para ressuspender o sedimento e formar uma mistura de aparência homogênea)**.
7. Acondicionar, em microtubo estéril, o material purificado e armazenar sob refrigeração (4°C) até o momento da detecção por exame direto ou extração de DNA.

► **NOTA:** a densidade de oocistos de *Toxoplasma gondii* é de 1,11~1,14 g/mL.

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE SACAROSE:

Densidade 1.275 g/mL: Solução A

Pesar 128 g de açúcar cristal

100 ml de água destilada

(0,8% de fenol para conservar)

Densidade 1.208g/mL: Solução B

3 partes da solução A

1 parte de água destilada

Detecção

1. Realizar a montagem de 20 uL do concentrado/purificado em lâmina e lamínula.
2. Realizar a leitura em microscopia ótica, contraste de fase ou microscopia de luz UV com excitação de 330 a 380 nm e barreira de 400 nm na objetiva de 40X.
3. Quando positiva, a amostra apresentará oocistos de aproximadamente 12 μm ; quando não esporulados, caracterizados pelo formato esférico com o interior morulado; e, quando esporulados, formato esférico a elíptico contendo dois esporocistos com quatro esporozoítas em seu interior.
4. Armazenar em 4°C até o momento da extração de DNA (*vide* observações na página 35).

Detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de lodo e água de retrolavagem de filtros²

Definição de amostra

- **Lodo de decantação:** lodo resultante da decantação após etapas de coagulação/floculação em estação de tratamento de água.
- **Água de retrolavagem de filtros:** efluente resultante da limpeza/lavagem dos filtros da Estação de Tratamento de Água.
- **Lodo de caixa-d'água e reservatórios:** sedimento acumulado no fundo de caixas de água residenciais e reservatórios, resultante da decantação durante a reservação.

Indicação

Este protocolo é indicado para detecção de oocistos de *T. gondii* em amostras de lodo de decantação, lodo de caixa-d'água e água de retrolavagem de filtros. Amostras de lodo de decantação representam grande desafio analítico, devido ao seu aspecto de lama, são consideradas extremamente complexas e de difícil concentração, durante o processamento, um grande volume de concentrado é gerado e dificulta a detecção.

Material

- Bombona plástica de primeiro uso.
- Tween 80 (polisorbato 80).
- Pipetas Pasteur descartável.
- Tubos de centrifugação de fundo cônico (50 mL).
- Centrífuga.
- Microtubos.

²Protocolo adaptado de Ladeia *et al.* (2018).

Coleta

- **Lodo de decantação:** utilizando bombonas de plástico, coletar a amostra por meio de amostrador na descarga do lodo no decantador ou no reservatório de armazenamento.
- **Água de retrolavagem de filtros:** coletar o resíduo por meio de amostrador durante o processo de retrolavagem do filtro, utilizando bombonas de plástico.
- **Lodo de caixa-d'água:** esvaziar reservatório até restar apenas o volume morto (cerca de 5-10 cm de água) do reservatório com cuidado para que a vazão não revolva o sedimento, após o esvaziamento revolver o lodo com o volume morto e coletar com auxílio de bombonas de plástico.

Obs.: Nos três tipos de amostras deve-se coletar 3 litros.

Procedimento para o envio das amostras:

- Caso as amostras não sejam processadas no mesmo município, devem ser encaminhadas em caixa isotérmica com gelo reciclável para o local de processamento.
- Evitar que as amostras fiquem soltas no interior da caixa, para isso, recomenda-se que seja utilizado algum material que as imobilize (e.g. papel; isopor).

Concentração

1. O volume a ser concentrado é de 500 mL.
2. Adicionar às amostras Tween 80® (1%) na proporção de 10% do volume total de amostra (e.g. para 500 mL, adicionar 50 mL de Tween 80 1%).
3. Distribuir a amostra em tubos de centrifugação de fundo cônico de 50 mL e centrifugar a 2.100 x g durante 10 minutos.
4. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, com auxílio da pipeta Pasteur, e ressuspender o sedimento.
5. Transferir o sedimento para um único tubo.
6. Centrifugar a 2.100 x g durante 10 minutos.
7. Descartar o sobrenadante cuidadosamente e ressuspender o sedimento.
8. Acondicionar em microtubo sob refrigeração (4°C) até o momento da purificação, caso a purificação seja realizada imediatamente não é necessário o acondicionamento em microtubo.

Purificação

1. Ressuspender a amostra concentrada (2-5 mL) em 40 mL de solução de sacarose (g.sp.= 1,208 g/mL).
2. Centrifugar a 1.250 x g por 10 minutos.
3. Coletar os 5 mL do menisco superficial do material centrifugado com auxílio da pipeta Pasteur, e transferir para um tubo de centrifugação de fundo cônico de 50 mL.
4. Adicionar 40 mL de água destilada e homogeneizar.
5. Centrifugar a 2.100 x g durante 10 minutos.
6. Descartar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio da pipeta Pasteur e ressuspender o sedimento formado com 0,5 – 1,5 mL de **água destilada (deve ser utilizado o volume suficiente para a ressuspender o sedimento e formar uma mistura de aparência homogênea)**.
7. Acondicionar em microtubo estéril o material purificado e armazenar sob refrigeração (4°C) até o momento da detecção.

► **NOTA:** densidade de oocistos de *T. gondii* é de 1,11~1,14 g/mL.

Detecção

1. Realizar a montagem de 20 uL do concentrado/purificado em lâmina e lamínula.
2. Realizar a leitura em microscopia ótica, contraste de fase ou microscopia de luz UV com excitação de 330 a 380 nm e barreira de 400 nm na objetiva de 40X.
3. Armazenar em 4°C até o momento da extração de DNA (*vide* observações na página 35).

Detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostra de solo³

Definição

Solo arenoso: Esse tipo de solo apresenta textura arenosa que proporciona no máximo 15% de argila e no mínimo 70% de partículas de areia em relação às partículas totais do solo.

Solos argilosos: Esse tipo de solo apresenta textura argilosa e muito argilosa, tendo na composição granulométrica de 35% a 60% de partículas do tamanho argila que confere alta capacidade de retenção de água.

Indicação

Este protocolo é indicado para a detecção de oocistos de *T. gondii* em amostras de solo. Amostras de solos argilosos são consideradas extremamente complexas por terem aspecto de argila, assim são de difícil concentração. Um grande volume de concentrado é gerado e dificulta a detecção, a fim de superar esse problema a quantidade de amostra de solo argiloso é menor em relação a solo arenoso.

Material

- Embalagem plásticas de primeiro uso (ex.: frascos para coleta de material biológico).
- Colher descartável de primeiro uso.
- Balança analítica.
- Pipetas de Pasteur descartável.
- Tubos de centrifugação de fundo cônico (50 mL).
- Centrífuga.
- Microtubos

³ Protocolo adaptado de Oliveira (2012).

Coleta

- Dividir a área de interesse em quadrantes de aproximadamente 1 m².
- Coletar aproximadamente 10 a 20 gramas de solo superficial (até 5 cm de profundidade) em cinco pontos dentro do quadrante, acondicionando-as em uma única embalagem plástica de primeiro uso, totalizando de 50 a 100 gramas de solo.
- Identifique a amostra quanto ao local e a data de coleta.
- Assegure que a embalagem com a amostra esteja completamente vedada.

Procedimento para o envio das amostras:

- Caso as amostras não sejam processadas no mesmo município, essas devem ser encaminhadas em caixa isotérmica com gelo reciclável para o local de processamento.
- Evitar que as amostras fiquem soltas no interior da caixa, recomenda-se que seja utilizado algum material que as imobilize (e.g. papel; isopor).

Concentração

Para solo argiloso:

1. Separar a amostra a ser analisada em alíquotas de 10 gramas em um tubo de centrifugação de fundo cônico de 50 mL.
2. Completar o tubo com glicina 1M até 40 mL.
3. Homogeneizar em agitador de mesa rotativa por 30 min a 20 rpm.
4. Completar com glicina 1M e repousar por 5 minutos.
5. Passar o sobrenadante para outro tubo com auxílio de pipeta Pasteur, restando no fundo apenas partículas grosseiras de solo.
6. Centrifugar o sobrenadante a 2.100 x g por 10 minutos.
7. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, até restar solução suficiente para ressuspender o sedimento.
8. Acondicionar em microtubo sob refrigeração (4°C) até o momento da purificação, caso a purificação seja realizada imediatamente não é necessário o acondicionamento em microtubo.

Para solo arenoso:

1. Separar a amostra a ser analisada em alíquotas de 30 gramas tubo de centrifugação de fundo cônico de 50 mL.
2. Completar o tubo com glicina 1M até 40 mL.

3. Homogeneizar em agitador de mesa rotativa por 30 min a 20 rpm.
4. Completar com glicina 1M e repousar por 5 minutos.
5. Passar o sobrenadante para outro tubo com auxílio de pipeta Pasteur, restando no fundo apenas partículas grosseiras de solo.
6. Centrifugar o sobrenadante a 2.100 x g por 10 minutos.
7. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, até restar solução suficiente para ressuspender o sedimento.
8. Acondicionar em microtubo sob refrigeração (4°C) até o momento da purificação, caso a purificação seja realizada imediatamente não é necessário o acondicionamento em microtubo.

Purificação

1. Ressuspender a amostra concentrada (2 mL a 5 mL) em 40 mL de solução de sacarose (g.s.p.=1,208 g/mL).
2. Centrifugar a 1.250 x g por 10 minutos.
3. Coletar os 5 mL do menisco superficial do material centrifugado com auxílio da pipeta Pasteur, e transferir para um tubo de centrifugação de fundo cônico de 50 mL novo.
4. Adicionar 40 mL de água destilada e homogeneizar.
5. Centrifugar a 2.100 x g durante 10 minutos.
6. Descartar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio da pipeta Pasteur e ressuspender o sedimento formado com 0,5 mL a 1,5 mL de **água destilada (deve ser utilizado o volume suficiente para a ressuspender o sedimento e formar uma mistura de aparência homogênea)**.
7. Acondicionar em microtubo estéril o material purificado e armazenar sob refrigeração (4°C) até o momento da detecção.

► **NOTA:** densidade de oocistos de *Toxoplasma gondii* é de 1,11~1,14 g/mL.

Detecção

1. Realizar a montagem de 20 uL do concentrado/purificado em lâmina e lamínula.
2. Realizar a leitura em microscopia ótica, contraste de fase ou microscopia de luz UV com excitação de 330 a 380 nm e barreira de 400 nm na objetiva de 40X.
3. Armazenar em 4°C até o momento da extração de DNA (*vide* observações na página 35).

Detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras hortaliças folhosas⁴

Definição de Amostra

Denomina-se de hortaliças folhosas todo e qualquer alimento cultivado em hortas, que tem como parte comestível as folhas, tais como a rúcula, alface, espinafre e couve.

Indicação

Este protocolo é indicado para detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de hortaliças folhosas.

Material

- Embalagem plásticas de primeiro uso.
- Luvas.
- Caneta para identificação de amostras.
- Caixa isotérmica com gelo reciclável.
- Tubos de centrifugação de fundo cônico de 50 mL.
- Balança.
- Centrífuga.

Coleta

- Em hortas, coletar uma touceira de vegetal, aleatoriamente, a cada 100 m² de área cultivada.
- Descartar folhas em decomposição e excesso de solo.
- Em mercados, feiras e sacolões, coletar duas touceiras de vegetal.
- Colocar em saco plástico de primeiro uso e identificar a amostra quanto ao local e à data de coleta.
- Assegurar-se de que a embalagem com a amostra esteja completamente vedada.
- Acondicionar em caixa isotérmica refrigerada até o local de processamento.

⁴Protocolo adaptado de Ferreira *et al.* (2018).

Procedimento para o envio das amostras

- Caso as amostras não sejam processadas no mesmo município, devem ser encaminhadas em caixa isotérmica com gelo reciclável para o local de processamento.
- Evitar que as amostras fiquem soltas no interior da caixa, para que as folhas não sejam danificadas. Para isso, recomenda-se que seja utilizado algum material que as imobilize (e.g. papel; isopor).

Concentração

1. Pesar 50 g de folhas de hortaliças em um saco plástico de primeiro uso, descartando as folhas degradadas, se houver.
2. Adicionar ao saco plástico 200 mL de solução extratora glicina 1M e agitar manualmente por 5 minutos.
3. Fazer um pequeno corte em uma das extremidades do saco e distribuir o extrato em tubos de centrifugação de fundo cônico de 50 mL.
4. Centrifugar o extrato em velocidade de 2.100 x g por 10 minutos.
5. Descartar o sobrenadante, agrupar os sedimentos em um único tubo de centrifugação de fundo cônico de 15 mL. Caso seja necessário, completar com solução de glicina 1M.
6. Centrifugar a 2.100 x g por 10 minutos, descartar o sobrenadante com auxílio de uma pipeta Pasteur, mantendo apenas o sedimento.

Purificação

1. Ressuspender a amostra concentrada (2 mL a 5 mL) em 40 mL de solução de sacarose (g.sp.=1,208 g/mL).
2. Centrifugar a 1.250 x g por 10 minutos.
3. Coletar os 5 mL do menisco superficial do material centrifugado com auxílio da pipeta Pasteur e transferir para um tubo de centrifugação de fundo cônico de 50 mL novo.
4. Adicionar 40 mL de água destilada e homogeneizar.
5. Centrifugar a 2.100 x g durante 10 minutos.
6. Descartar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio da pipeta Pasteur e ressuspender o sedimento formado com 0,5 mL a 1,5 mL de água destilada (deve ser utilizado o volume suficiente para a ressuspender o sedimento e formar uma mistura de aparência homogênea).
7. Acondicionar, em microtubo estéril, o material purificado e armazenar sob refrigeração (4°C) até o momento da detecção.

► **NOTA:** densidade de oocistos de *Toxoplasma gondii* é de 1,11-1,14 g/mL.

Detecção

1. Realizar a montagem de 20 uL do concentrado/purificado em lâmina e lamínula.
2. Realizar a leitura em microscopia ótica, contraste de fase ou microscopia de luz UV com excitação de 330 a 380 nm e barreira de 400 nm na objetiva de 40X.
3. Armazenar em 4°C até o momento da extração de DNA (*vide* observações na página 35).

Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite⁵

Definição

Secreção líquida de coloração branca, opaca, produzida por glândulas mamárias de fêmeas da classe dos mamíferos lactantes, com propriedades nutricionais e apta para o consumo humano. Leite cru é o leite produzido por animais de produção que não passou por aquecimento maior que 40°C ou qualquer outro tipo de tratamento.

Indicação

Este protocolo é indicado para detecção de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite cru. Os animais com suspeita de toxoplasmose com quadro agudo podem eliminar taquizoítas pelo leite.

Material

- Algodão hidrófilo.
- Caixa isotérmica.
- Centrífuga de bancada para tubos de 50 mL.
- Frasco de coleta estéril.
- Gelo artificial para transporte.
- Luvas.
- Microtubo de 1,5 mL.
- Tubos de centrifugação de fundo cônico de 50 mL.

⁵Protocolo adaptado de Ferreira Neto *et al.* (2018).

Coleta

1. Para antissepsia dos tetos das fêmeas suspeitas de secretarem leite cru com presença de *T. gondii*, deve-se realizar técnica de *pré-dipping*.
2. Realizar a ejeção dos três primeiros jatos de leite dos tetos para evitar contaminação ambiental.
3. Coletar 50 mL de leite de fêmeas em lactação suspeitas por meio de ordenha manual. Acondicionar o leite coletado em frasco estéril refrigerado a 4°C.

Obs.: antes de proceder com a ordenha manual da amostra de leite, deve-se executar antissepsia adequada das mãos e utilizar luvas de procedimento.

4. Para transporte das amostras de leite cru até o laboratório, é necessário encaminhá-las em frascos vedados e refrigerados, com gelo artificial, em caixas isotérmicas a uma temperatura que se mantenha entre 3°C e 7°C.

Obs.: entende-se por frasco vedado aquele em que não há contato do conteúdo interno com o externo, nem do externo com o interno. O material deve chegar ao laboratório em até 48 horas após a coleta.

Concentração

O processamento das amostras de leite cru é realizado com o intuito de diminuir elementos que possam interferir negativamente no processo de extração e purificação do DNA e que possam inibir a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

1. Transferir a amostra para tubo de centrifugação de fundo cônico (50 mL).
2. Centrifugar a 1.000 x g por 10 minutos.
3. Remover a camada de gordura do sobrenadante por meio de algodão hidrófilo.
4. Ressuspender o *pellet* obtido em água ultrapura até completar o volume de 50 mL.
5. Repetir as três etapas anteriores por mais duas vezes.
6. Armazenar o *pellet* da última lavagem em microtubos de 1,5 mL a 4°C até o momento da extração de DNA.

Detecção

Para a detecção de *T. gondii* é realizada a PCR. Deve-se extrair e purificar o DNA das amostras, como consta no item “Extração e purificação de ácido desoxirribonucleico – DNA” (p. 35); e, com o produto obtido, realizar a PCR, como consta no item “Reação em Cadeia da Polimerase – PCR” (p. 36).

Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de queijo⁶

Definição

Queijo é um alimento sólido produzido a partir da coagulação do leite de vacas, cabras, ovelhas, búfalas e outros mamíferos.

Indicação

Este protocolo é indicado para detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de queijos.

Material

- Gaze.
- Pinça.
- Bisturi.
- Balança.
- Embalagem plástica de primeiro uso.
- Luvas.
- Solução de Tween 80 (0,1%).
- Tubos de centrifugação de fundo cônico (50 mL).
- Centrífuga.

Concentração

- Com auxílio de pinças e bisturis, cortar o queijo em fatias.
- Em um saco de primeiro uso, pesar 25 g da amostra colhida de vários pontos (superfície e profundidade).
- Adicionar 225 mL de Tween 80 a 0,1%, fechar o saco e macerar a amostra manualmente por 2 minutos.

⁶Protocolo adaptado de Costa *et al.* (2020).

- Filtrar a suspensão em gaze dupla e transferir para tubos de centrifugação de fundo cônico de 50 mL.
- Centrifugar a 2.100 x g por 10 minutos.
- Descartar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio da pipeta Pasteur até restar o volume mínimo necessário para ressuspender o sedimento.
- Aliquotar o sedimento em microtubo e armazenar a 4°C até a detecção.

Detecção

Para a detecção de *T. gondii*, é realizada a PCR. Deve-se extrair e purificar o DNA das amostras, como consta no item “Extração e purificação de ácido desoxirribonucleico – DNA” (p. 35); e, com o produto obtido, realizar a PCR, como consta no item “Reação em Cadeia da Polimerase – PCR” (p. 36).

Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de carne⁷

Definição

Carne é a massa muscular de diferentes espécies animais, e os demais tecidos que a acompanham são reconhecidos como aptos ao consumo humano.

Indicação

Este protocolo é indicado para a detecção de cistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de carne de espécies animais de sangue quente.

Material

- Agitador magnético com aquecimento ou incubadora tipo *Shaker* de bancada com aquecimento.
- Água destilada.
- Agulha 25x8 ou 25x7.
- Bisturi estéril.
- Caixa isotérmica.
- Centrífuga de bancada para tubos de 50 mL.
- Embalagem plástica de primeiro uso.
- Estreptomicina injetável.
- Fita adesiva.
- Gaze.
- Infraestrutura para atividades de biotério.
- Lâmina para microscópio óptico.
- Lamínula 24 mm x 24 mm.
- Luvas.
- Medidor de pH (pHmetro).

⁷Protocolo adaptado de Dubey (1998).

- Microscópio óptico biológico binocular com aumento de até 1.000 vezes.
- Microtubo de 1,5 mL.
- Mixer de mão.
- Penicilina injetável.
- Pepsina 1:10.000 100 g.
- Seringa de 3 mL.
- Tubos para centrifugação de fundo cônico de 50 mL.

Coleta

- Obter, pelo menos, 50 g de carne procedente de espécies de animais de sangue quente (e.g. carne bovina, suína, de frango, de outras aves, de outros ruminantes e de outros animais de sangue quente) que tenha sido consumida pelos indivíduos relacionados ao surto.

Obs.: no caso da impossibilidade de peças de carne dessa ocasião, coletar ao menos 50 g de carne que está sendo consumida no mesmo local de ocorrência do surto e que tenha a mesma procedência da carne consumida no período suspeito de infecção dos indivíduos com *T. gondii*.

- Acondicionar as peças obtidas em suas embalagens invioladas ou, se já desembaladas, acondicionar em sacos de primeiro uso e vedados com fita adesiva ou outro material que permita vedação eficaz.

Obs. 1: entende-se por embalagem vedada aquela em que não há contato do conteúdo interno com o externo, nem do externo com o interno.

Obs. 2: caso as embalagens originais das peças não apresentem vedação eficaz, deve-se colocá-las em embalagens de primeiro uso e vedar como recomendado acima.

- Identificar as amostras quanto ao corte de carne, à data de fabricação, à data de coleta e ao local de coleta.
- Para o transporte, a(s) peça(s) de carne de interesse deve(m) ser enviada(s) nas embalagens vedadas e refrigeradas, com gelo artificial para transporte, em caixas isotérmicas a uma temperatura que se mantenha entre 3°C e 7°C.

Obs.: o material deve chegar ao laboratório em até 48 horas após a coleta.

Concentração

Para ruptura dos cistos de *T. gondii* da massa muscular e liberação dos bradizoítas em solução salina, é realizada a técnica de digestão péptica proposta por Dubey (1998). O princípio da técnica é a replicação *in vitro* do processo de digestão gástrica que ocorre naturalmente nos indivíduos no momento da infecção para a liberação dos bradizoítas, para que possam invadir os enterócitos.

Execução da técnica de digestão péptica

1. Efetuar limpeza do tecido muscular, retirando outros tecidos associados (e.g. tecido adiposo, conjuntivo e epitelial), com bisturi estéril.
2. Pesar uma peça de 50 g do tecido muscular e cortar em pedaços de 1 cm a 2 cm, com bisturi estéril.
3. Em um recipiente tipo béquer (1.000 mL) tampado por papel alumínio, deve-se moer os pedaços obtidos por meio de *mixer* de mão por 15 segundos.
4. Adicionar 125 mL de solução salina (0,85%) estéril e misturar usando o *mixer* de mão em alta velocidade por 30 segundos (Tabela 2).

TABELA 2 • Protocolo de preparo de solução salina (0,85%)

Reagente	Concentração	Massa/Volume
NaCl	P.A.	8,5 g
Água destilada	–	1.000 mL*

Fonte: (DUBEY, 1998).

*q.s.p.: quantidade suficiente para.

5. Lavar a ponteira do *mixer* de mão com 125 mL de salina e adicionar o resíduo da lavagem no tecido processado.
6. Adicionar 250 mL de solução de pepsina (Tabela 3) a 37°C.

TABELA 3 • Protocolo de preparo de solução de pepsina

Reagente	Concentração	Massa/Volume
Pepsina	1:10.000 100 g	1,3 g
NaCl	P.A.	2,5 g
HCl	P.A.	3,5 mL
Água destilada	–	250 mL*

Fonte: (DUBEY, 1998).

*q.s.p.: quantidade suficiente para.

7. Incubar a mistura sob agitação em agitador magnético com aquecimento ou incubadora *Shaker* a 37°C por 60 minutos em velocidade moderada.
8. Filtrar a mistura em gaze utilizando duas folhas.
9. Transferir o volume para tubos de centrifugação de tubo cônico (50 mL).
10. Centrifugar a 1.200 x g por 10 minutos.
11. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 20 mL de tampão PBS (pH 7,2) (Tabela 4).

TABELA 4 • Protocolo para preparo de tampão PBS 10x [] (pH 7,2)

Reagente	Concentração	Massa/Volume
NaCl	P.A.	90,0 g
Na ₂ HPO ₄	P.A.	10,9 g
NaH ₂ PO ₄	P.A.	3,2 g
Água destilada	-	1.000 mL*
pH = 7,2		

Fonte: (DUBEY, 1998).

*q.s.p.: quantidade suficiente para.

12. Adicionar 15 mL de solução de bicarbonato de sódio (1,2%; pH 8,3) (Tabela 5).

TABELA 5 • Protocolo para preparo de solução de bicarbonato de sódio (1,2%; pH 8,3)

Reagente	Concentração	Massa/Volume
NaHCO ₃	P.A.	0,18 g
Água destilada	-	15 mL*
pH = 8,3		

Fonte: (DUBEY, 1998).

*q.s.p.: quantidade suficiente para.

13. Centrifugar a 1.200 x g por 10 minutos.

14. Desprezar o sobrenadante e adicionar 5 mL de solução salina estéril.

Obs.: os itens seguintes (15 e 16) são para a preparação do inóculo para bioensaio em camundongos suíços.

15. Adicionar 1.000 UI de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

16. Reservar, em microtubo a 4°C, pelo menos 3 mL do produto obtido para a técnica de bioensaio.

Obs.: os itens seguintes (17 a 21) são para o preparo da amostra para detecção de DNA de *T. gondii*. Portanto, continuar da etapa 14.

17. Centrifugar a 10.000 x g por 1 minuto.

18. Retirar o sobrenadante e adicionar 0,5 mL de água ultrapura.

19. Centrifugar a 10.000 x g por 1 minuto.

20. Retirar o sobrenadante e adicionar 0,3 mL de água ultrapura.

21. Armazenar a amostra em microtubo de 1,5 mL a -20°C até o momento da extração e da purificação do DNA.

Detecção

Para a detecção de *T. gondii* em amostras de tecido muscular, o bioensaio em camundongos suíços é utilizado para a obtenção de infectividade, patogenicidade e isolamento do parasita. Esta técnica só pode ser realizada mediante autorização de Comitê de Ética para Uso de Animais e sob supervisão de um médico veterinário habilitado.

Para a detecção de DNA do parasita, o produto do item 21 da concentração deste protocolo deve ser submetido à extração e à purificação de DNA, como consta no item “Extração e purificação de ácido desoxirribonucleico – DNA” (p. 35); e, com o produto obtido, realizar a PCR, como consta no item “Reação em Cadeia da Polimerase – PCR” (p. 36).

Técnica de bioensaio em camundongos suíços

Esta técnica pode ser utilizada para análise de viabilidade do *Toxoplasma gondii* proveniente de qualquer tipo de amostra.

1. Aquecer o produto obtido da digestão péptica em solução salina e antibióticos a temperatura de 37°C.
2. Inocular 1 mL via intraperitoneal em três camundongos suíços.
3. Observar os animais 2 vezes ao dia por 42 dias, observando mudanças de comportamento e sinais clínicos como: apatia, fotofobia, paresia, piloereção, distensão abdominal e fezes ressecadas.

Obs.: se os animais apresentarem quadro de debilidade e sofrimento excedente, eles devem ser eutanasiados antes do período de 42 dias.

4. Após o óbito ou a eutanásia dos animais, deve-se retirar o exsudato peritoneal.
5. Aplicar uma gota do exsudato em lâmina de microscópio óptico, cobrir com lamínula (24 mm x 24 mm) e observar em microscópio óptico em aumento de 400 vezes.

Obs.: o bioensaio será considerado positivo se as formas de taquizoíta dos parasitas forem observadas no exsudato. Os taquizoítas apresentam forma de bastão com afinamento na porção apical, medem 3x6 µm e possuem alta motilidade.

6. Caso o exsudato peritoneal seja negativo para presença de *T. gondii*, deve-se colher o encéfalo do camundongo no qual o exsudato foi observado.
7. Realizar corte transversal na porção média do encéfalo (espessura ≤ 1 mm), colocá-lo em lâmina para microscópio e pressionar lamínula (24 mm x 50 mm) contra o corte.
8. Observar em microscópio óptico em aumento de 100 vezes para a pesquisa de cistos de *T. gondii*.

Obs.: serão considerados positivos os animais que apresentarem cistos de *T. gondii* no corte do encéfalo. Os cistos possuem de 5 μm a 50 μm de diâmetro e contêm estruturas em forma de bastão envoltas por sua parede com dimensões de 2x6-8 μm . Os animais que não apresentarem cistos não são considerados negativos, e será realizada uma segunda inoculação.

9. Realizar um macerado do encéfalo com 2 mL de salina por meio de agulha 40x12 e seringa de 3 mL.
10. Inocular, via intraperitoneal, 0,5 mL do macerado em camundongo suíço.
11. Observar o camundongo duas vezes por dia para verificação de sinais clínicos e condição de saúde.
12. Observar por um período de até três meses. Ao final do período, realizar eutanásia dos animais.
13. Colher o encéfalo do camundongo.
14. Realizar pesquisa de cistos de *T. gondii* como descrito nos itens 7 e 8.

Biologia molecular

Análises moleculares detectam moléculas relacionadas a processos metabólicos dos seres vivos pesquisados. Entre as moléculas, podem-se citar: DNA, ácido ribonucleico (RNA) e proteínas. Esses métodos apresentam boa especificidade em comparação a métodos morfológicos e boa sensibilidade pelo potencial de detectarem pequenas porções dessas moléculas.

Para detecção de *Toxoplasma gondii*, recomenda-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Detecta-se o DNA do parasita por meio de amplificações *in vitro* de fragmento com 529 pares de bases (pb) que se repetem no genoma do protozoário. Para execução da amplificação do DNA *in vitro*, a liberação do DNA do parasita para o meio (Extração) e a eliminação de outras moléculas ou partículas que possam inibir a reação de replicação gerada pela enzima polimerase (Purificação) são necessárias.

Extração e Purificação de Ácido Desoxirribonucleico – DNA

Para obtenção de resultados mais acurados na Reação em Cadeia da Polimerase, sugere-se a extração de DNA por *kits* comerciais. Os *kits* comerciais que possuem etapas de extração e purificação de DNA mais eficientes são os que apresentam indicação para extração de ácidos nucleicos de fezes e amostras ambientais (e.g. solo, para água, solo e plantas; água, para água de consumo, mananciais e água residual). Os *kits* com indicação para extração de DNA em fezes apresentam aproveitamento satisfatório em amostras teciduais e ambientais e maior acessibilidade financeira em relação aos específicos de amostras ambientais.

A necessidade de adição de etapas otimizadoras, nas fases de extração e purificação para melhor recuperação do DNA e disponibilidade para análises moleculares, varia de acordo com características das amostras e potencial de extração e purificação do *kit*. Para amostras com sedimento abundante e alto teor de matéria orgânica e inorgânica, como fezes, mananciais de água, águas residuais e solo, é recomendada a adição dessas etapas.

Na fase de extração do DNA, a etapa de congelamento (-80°C) e descongelamento (56°C) das amostras é utilizada para aprimorar a ruptura dos oocistos. Na fase de purificação, *kits* que utilizem colunas com propriedade ligante ao DNA podem necessitar de centrifugação posterior à extração e anterior à precipitação do DNA para evitar obstrução de colunas.

Os protocolos de extração e purificação são realizados de acordo com protocolo do fabricante, com adição das etapas otimizadoras quando necessário.

Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Para a detecção de *Toxoplasma gondii*, realiza-se PCR, que possui como alvo o fragmento não codificante de 529 pb repetido no genoma do parasita. De acordo com a literatura, a técnica apresentou sensibilidade de 89% e especificidade de 91%, o que denota bom uso como teste confirmatório de presença ou ausência. As sequências dos *primers* descritos por Homan *et al.* (2000) estão relacionadas no Quadro 1.

QUADRO 1 • Primers descritos por Homan *et al.* (2000) para amplificação do fragmento de 529 pb do *T. gondii*

Gene	Primer	Sequência	Referência
Fragmento não codificante de 529 pb*	Tox4	5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3'	(HOMAN <i>et al.</i> , 2000)
	Tox5	5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'	

Fonte: (HOMAN *et al.*, 2000).

*pb: pares de bases.

Execução da técnica de PCR

1. Agrupar os componentes da reação (tabelas 6 e 7) em microtubo (200 µL) identificado ou em cada cavidade de microplaca para PCR determinada para a amostra.

TABELA 6 • Componentes, concentrações e volumes em uso no Laboratório de Protozoologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para PCR para detecção de fragmento 529 pb de *Toxoplasma gondii*

Componente	Concentração de uso	Volume
Água ultrapura	–	8,25 µL
MgCl ₂	50 mM	1,25 µL
Tampão para PCR	10x	2,50 µL
dNTP*	10 mM	0,50 µL
Tox4	20 pmol/µL	1,00 µL
Tox5	20 pmol/µL	1,00 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	0,25 µL
DNA (amostra)	–	2,00 µL

Fonte: (HOMAN *et al.*, 2000).

*dNTP: desoxirribonucleico fosfatado.

TABELA 7 • Protocolo para preparação de dNTP (10 mM)

Reagentes	Concentração	Volume
Nucleotídeos:		
A	100 mM	10µL
T	100 mM	10µL
C	100 mM	10µL
G	100 mM	10µL
Água ultrapura	–	60µL

Fonte: (GREEN; SAMBROOK, 2012).

2. Centrifugar (*spin*) as reações em microcentrífuga para microplaca de PCR.
3. Alocar as amostras em termociclador.
4. Configurar o programa da PCR para realização dos ciclos da PCR para amplificação da sequência alvo de 529 pb. A relação a seguir apresenta as configurações executadas no Laboratório de Protozoologia Veterinária da UEL (Tabela 8).

Obs.: os ciclos são: desnaturação, para quebra das ligações de hidrogênio entre as duas fitas de DNA; anelamento, para ligação dos *primers* à porção inicial (Tox4) e final (Tox5) da sequência de 529 pb do DNA; e extensão, para que a TaqPolimerase possa executar a replicação dos fragmentos de 529 pb. As temperaturas diferentes nos ciclos fornecem a energia ideal para cada uma das etapas, e os segundos fornecem o tempo necessário para que cada uma ocorra.

TABELA 8 • Protocolo de PCR utilizado no Laboratório de Protozoologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina para detecção de fragmento 529 pb de *Toxoplasma gondii*

Etapas	Temperatura	Tempo (s)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	300	1
Desnaturação	95°C	30	35
Anelamento	63°C	30	
Extensão	72°C	60	
Extensão final	72°C	300	1

Fonte: Elaboração própria.

Eletroforese em gel de agarose

A visualização do tamanho da sequência-alvo obtida após as etapas de amplificação é realizada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose. São consideradas positivas as amostras que apresentarem banda de DNA na altura de 529 pb.

Execução da técnica de eletroforese em gel de agarose

1. Preparar gel de agarose de 1,5% (m/v) (tabelas 9 e 10) e aguardar gelificar.

TABELA 9 • Protocolo de preparo do tampão Tris/EDTA/Ácido bórico – TEB (10x[])

Reagentes	Concentração	Massa/Volume
Tris	P.A.	107,78 g
Ácido bórico	P.A.	55,03 g
EDTA	P.A.	7,45 g
Água destilada	–	1.000 mL*
pH = 8,4		

Fonte: (GREEN; SAMBROOK, 2012).

*q.s.p.: quantidade suficiente para.

TABELA 10 • Protocolo para preparo de gel de agarose (1,5% – m/v)

Reagentes	Concentração	Massa/Volume
Agarose	P.A.	0,0150 g
TEB	1x[]	1,0000 mL
SYBR™ Safe	10.000x[]	0,0333 µL

Fonte: (GREEN; SAMBROOK, 2012).

2. Adicionar duas partes de azul de bromofenol (1:800) a cinco partes do produto da reação de PCR. Homogeneizar até formar mistura homogênea (Tabela 11).

Obs.: azul de bromofenol tem função de pigmentar e dar peso ao produto da reação.

TABELA 11 • Protocolo para preparo de azul de bromofenol (1:800)

Reagentes	Concentração	Massa/Volume
Azul de bromofenol	P.A.	0,0125 g
Ficoll®	P.A.	1,25 g
TEB	5x[]	10 mL*

Fonte: (GREEN; SAMBROOK, 2012).

*q.s.p.: quantidade suficiente para.

3. Colocar o gel de agarose em uma cuba acoplada à fonte elétrica, em sentido da carga negativa (cavidades do gel) para carga positiva (porção final do gel).

4. Submergir o gel de agarose em TEB 1x[].

5. Transferir 7 µL da mistura obtida de cada amostra para cavidade de gel de agarose a 1,5% (m/v).

6. Configurar a fonte para a voltagem desejada de acordo com o volume da cuba, e o tempo de distribuição de corrente elétrica de acordo com a concentração do gel e o tamanho do fragmento.

Obs.: nesse caso, recomenda-se regulação da voltagem para aproximadamente 1 V : 33 cm³ da cuba e tempo de 30 min.

7. Submeter o gel à luz ultravioleta ($\lambda = 254$ a 300 nm) para observação do tamanho dos fragmentos gerados.

Observações finais

Na microscopia ótica, oocistos de *T. gondii* são indistinguíveis dos de *Neospora* e *Hammondia*. Oocistos de coccídeos, quando expostos à luz UV, emitem fluorescência em cor azul, facilitando a sua visualização em amostras mais complexas.

Quando positiva, a amostra apresentará oocistos de aproximadamente 12 µm; quando não esporulados, caracterizados pelo formato esférico com o interior morulado; e, quando esporulados, formato esférico a elíptico contendo dois esporocistos com quatro esporozoítas. Devido à dificuldade da detecção por microscopia causada por: baixo volume final de amostra analisada, presença de estruturas de confundimento e a não diferenciação entre oocistos de *Neospora* e *Hammondia* e *Toxoplasma gondii*, recomenda-se a utilização concomitante dos métodos moleculares descritos nas páginas 35 e 36.

Os resultados laboratoriais devem ser avaliados em conjunto às análises epidemiológicas conduzidas, uma vez que a negatividade não exclui a possibilidade da presença de oocistos de *T. gondii*. Deve-se considerar que as técnicas de diagnóstico para amostras ambientais apresentam baixa sensibilidade, entre outras causas pela dificuldade em se coletar e/ou concentrar grandes volumes.

Referências

- CHOI, W. Y. *et al.* Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 175, n. 5, p. 1280-1282, 1997.
- COSTA, M. A. da *et al.* Artisan fresh cheese from raw cow's milk as a possible route of transmission in a toxoplasmosis outbreak, in Brazil. **Zoonoses Public Health**, Berlin, v. 67, n. 2, p. 122-129, Mar. 2020.
- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 75-77, Jan. 1998.
- FERREIRA, F. P. *et al.* The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 327-337, jul./set. 2018.
- FERREIRA NETO, J. M. *et al.* An outbreak of caprine toxoplasmosis - investigation and case report. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 5, 2018.
- FRANCO, R. M. *et al.* Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 2, p. 119-135, abr./jun. 2012.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- HOMAN, W. L. *et al.* Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 69-75, Jan. 2000.
- LADEIA, W. A. *et al.* Molecular surveillance of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* in sludge and spent filter backwash water of a water treatment plant. **Journal of Water and Health**, London, v. 16, n. 5, p. 857-860, Oct. 2018.
- MAGALDI, C. *et al.* Surto de toxoplasmose em um seminário de Bragança Paulista (Estado de São Paulo): aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 141-171, dez. 1967.

MINUZZI, C. E. *et al.* Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from placental tissues of pregnant women who received toxoplasmosis treatment during an outbreak in southern Brazil. **PloS One**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. e0228442, Jan. 2020.

MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F. M. R.; NAVARRO, I. T. (org.). **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**. *E-book*. Londrina: Editora Eduel, 2010. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/cdtqr/pdf/mitsuka-9788572166768.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2020.

MOURA, L. de *et al.* Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 326-329, Feb. 2006.

OLIVEIRA, C. M. B. **Determinação de protocolo para detecção de cistos de *Giardia spp.* e ovos de helmintos, em solos**. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

PINTO-FERREIRA, F. *et al.* Patterns of Transmission and Sources of Infection in Outbreaks of Human Toxoplasmosis. **Emerging infectious diseases**, [s. l.], v. 25, n. 12, p. 2177-2182, 2019.

ISBN 978-85-334-2823-2



9 788533 428232

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde
www.saude.gov.br/bvs

DISQUE
SAÚDE **136**



MINISTÉRIO DA
SAÚDE

Governo
Federal