



DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* EM HORTIFRUTICULTURAS EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADAS

Carla Zangari de Souza¹; Katyelle Rafael²; Ariella Andrade Marchioro³; Bruna Tiyo⁴; Ana Paula Sanders⁵; Ana Lúcia Falavigna Guilherme⁶

RESUMO: De distribuição mundial, a toxoplasmose é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. O oocisto eliminado nas fezes de felídeos contaminados é uma das importantes formas de contaminação, com alta dispersão no meio ambiente (água, solo e vegetais), porém sua detecção ainda é um desafio. O objetivo deste estudo foi avaliar a recuperação de oocistos de *T.gondii* a partir da contaminação experimental de frutas e hortaliças consumidas cruas. Amostras de morango e alface foram contaminadas com 10, 10², 10³, e 10⁴ oocistos de *T. gondii* (cepa ME-49). Uma porção de 50g de cada amostra foi lavada com 100mL de Tween 80 (1%), o lavado foi filtrado através de uma membrana de éster de celulose, e concentrado por centrifugação. O DNA foi extraído diretamente ou após processos físicos (congelamento-descongelamento ou ultrassom). A reação em cadeia da polimerase foi realizada com os primers B22-B23 e Tox4-Tox5. A técnica de filtração por membrana foi eficiente e rápida na recuperação de oocistos. Somente foi possível recuperar em todas as concentrações, as amostras que foram submetidas aos processos físicos, utilizando os primers B22-B23. A técnica de filtração em membrana seguida dos processos realizados pode ser viável para a vigilância de saúde no controle ambiental da toxoplasmose.

PALAVRAS-CHAVE: filtração em membrana; oocistos; Reação em Cadeia da Polimerase; *Toxoplasma gondii*.

1 INTRODUÇÃO:

De distribuição mundial (TENTER, AM; *et al.* 2000), a toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Esta zoonose é transmitida aos humanos por diferentes formas evolutivas, como a ingestão de oocistos em água, frutas e verduras contaminadas, ingestão de cistos presentes em produtos de origem animal e transmissão congênita por taquizoítas (REMINGTON, JS. 2006)

Na maioria dos casos pacientes contaminados pela toxoplasmose são assintomáticos, porém podem apresentar quadros clínicos severos e irreversíveis em nível neurológico e/ou ocular (HILL & DUBEY. 2002). O oocisto parece ser a forma mais frequente de contaminação (MEIRELES, LR; *et al.* 2004), disseminado no meio ambiente através de fezes de felídeos contaminados, como gatos domésticos, que são os hospedeiros definitivos (DUBEY, JP; Frenkel JK. 1972).

Os oocistos de *T. gondii* apresentam elevada dispersão no meio ambiente, mas sua detecção representa grande desafio. A exemplo, na literatura, há poucos dados sobre o diagnóstico desta espécie em estudos com hortifruticulturas, solos, e águas (LASS, A; *et al.* 2012). Para subsidiar medidas de vigilância sanitária e epidemiológica, em todos os elos da cadeia de produção e de distribuição de hortifruticulturas é necessário a existência de técnicas laboratoriais que sejam sensíveis, específicas, rápidas e práticas para a detecção dos oocistos. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a recuperação de oocistos de *T. gondii* em hortifruticulturas experimentalmente contaminadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de oocistos de *T. Gondii*

Os oocistos esporulados (Cepa Me- 49) foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (DMVP/UDEL).

2.2 AMOSTRAS DE HORTIFRUTICULTURAS

Foram utilizadas oito amostras (250g) de morango (*Fragaria vesca*) e oito (pés) de alface crespa (*Lactuca sativa*) de estabelecimentos comerciais. Para minimizar riscos eventuais de contaminação por oocistos de *T. gondii*, estas foram previamente lavadas com água destilada. Cada amostra foi coletada em duplicata para a realização dos experimentos.



2.3 RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DAS AMOSTRAS CONTAMINADAS EXPERIMENTALMENTE

De cada amostra foi retirado 50 g para serem lavados com 100 mL de Tween 80 a 1%, sob agitação manual por um minuto, em sacos plásticos. O líquido resultante da lavagem foi filtrado em membrana de éster de celulose, 47 mm de diâmetro e 0,3 µm de porosidade (Millipore®), com auxílio de uma bomba a vácuo pressão negativa entre 10 e 15 mmHg. Em seguida a membrana foi raspada mecanicamente e o material obtido foi concentrado por centrifugação, desprezado o sobrenadante até o volume final de 1 mL (FRANCO, RMB; *et al.* 2001b).

2.4

EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA dos oocistos de *T. gondii* foi extraído diretamente ou após os processos de congelamento-descongelamento, ou ultrassom. A extração foi realizada com o Kit comercial AxyPrep™ Blood Genomic DNA (Axygen Biosciences), observando as recomendações do fabricante.

2.5 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

Do volume final de cada amostra foi retirado 250 µL para serem congelados em nitrogênio líquido (-196°C) por 5 minutos, seguidos de descongelamento em banho seco à 65°C por 5 minutos, repetindo-se este ciclo por cinco vezes.

2.6 ULTRASSOM

Do volume final de cada amostra foi retirado 250 µL para serem sonicados (Ultrasonic Homogeneizer) a 20 hertz, em cinco ciclos de 45 segundos com intervalo de 2 minutos. Neste processo as amostras permaneceram em banho de gelo.

2.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

Após a extração do DNA as amostras foram submetidas à técnica de PCR com os primers B22-B23 (Forward: 5'AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA3' e Reverse: 5'TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC3'), amplificando uma sequência de 115 pb do gene B1 (BURG, JL; *et al.* 1989) e Tox4-Tox5 (Forward: 5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG' e Reverse: 5'CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT3'), para amplificar uma sequência de 529 pb⁶. Em cada reação foi utilizado controle negativo (água destilada) e positivo (cepa RH). Os produtos amplificados foram visualizados em géis de poliacrilamida 4,5%, revelados pela prata e digitalmente registrados (HOMAN, WL; *et al.* 2000).

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato sobre utilização experimental de membrana de éster de celulose com adequada recuperação de oocistos de *T. gondii* em amostras de morango e alface. Por ser uma técnica de baixo custo, prática e de fácil manuseio, pode contribuir no diagnóstico laboratorial desta zoonose em amostras de hortifruticulturas, como em ações voltadas à vigilância sanitária.

Só foi possível detectar a presença de DNA de *T. gondii* em todas as concentrações testadas, tanto em amostras de morango quanto nas de alface, quando a técnica de filtração em membrana foi seguida dos processos físicos de congelamento- descongelamento ou ultrassom, e utilizando primers B22-B23 na PCR. Já com utilização dos primer Tox4-Tox5 *T. gondii* só foi detectado nas concentrações $\geq 10^3$ oocistos.

Na extração direta (sem processos físicos) *T. gondii* foi detectado nas amostras de morango e alface contaminadas somente com concentrações $\geq 10^4$ oocistos com ambos primers utilizados.

Os procedimentos físicos adotados nesta pesquisa mostraram ser uma ferramenta importante na ruptura de oocistos e consequente obtenção do DNA de *T. gondii*. Estes proporcionaram o aumento da sensibilidade no diagnóstico laboratorial das amostras testadas, inclusive, com baixa concentração de oocistos, simulando o que normalmente ocorre no meio ambiente, em amostras de água, solo e vegetais.

Os primers B22-B23 apresentaram melhores resultados em amostras com concentrações menores. Cabe lembrar que, neste experimento, morango e alface foram contaminados com cepa padrão de laboratório, mas o elevado número de genótipos de *T. gondii* existentes na América do Sul (PENA, HF; *et al.* 2008), justifica a utilização de diferentes primers em diagnóstico voltado a área de vigilância sanitária e ambiental.



4 CONCLUSÃO

A filtração em membrana de ésteres de celulose seguida por técnicas de congelamento-descongelamento ou ultrassom e PCR pode auxiliar no diagnóstico de oocistos de *T. gondii* em amostras de hortifruticulturas.

REFERÊNCIAS

- BURG, JL; GROVER, CM; POULETTY, P; BOOTHROYD, JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.27, p.1787-92, 1989.
- DUBEY, JP; FRENKEL, JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **J Protozool**, v.19, p.155-77, 1972.
- FRANCO, RMB; CATUSIO NETO, R; BRANCO, N. Detecção de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. em água pela técnica de filtração em membrana: estudo comparativo entre diferentes técnicas de eluição. **J Bras Patol**, v.37, p.205, 2001b.
- HILL, DE; DUBEY JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, p. 634-40, 2002.
- HOMAN, WL; VERCAMMENB, M; De BRAEKELEER, J; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **Inter J Parasitol**, v.30, p.69-75,2000.
- LASS, A; PIETKIEWICZ, H; SZOSTAKOWSKA, B; MYJAK, P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, p.1101-08, 2012.
- MEIRELES, LR; GALISTEO, JR; POMPEU, AJ; ANDRADE, JR HF. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. **Trop Med Int Health**, v.9, p. 876-81, 2004.
- PENA, HF; GENNARI, SM; DUBEY, JP; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p.561-69, 2008.
- REMYNGTON, JS. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. **US: Elsevier Saunders**, p.947-1091, 2006.
- TENTER, AM; HECKEROTH, AR; WEISS, LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v.30, p.1217-58, 2000.