

ERIKA FERNANDA TORRES SAMICO FERNANDES CAVALCANTI

**Pesquisa de *Toxoplasma gondii* e Anticorpos Anti-*Leptospira* spp. em suínos
abatidos no Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil**

RECIFE

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

ERIKA FERNANDA TORRES SAMICO FERNANDES CAVALCANTI

**Pesquisa de *Toxoplasma gondii* e Anticorpos Anti-*Leptospira* spp. em suínos
abatidos no Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

RECIFE

2011

Ficha catalográfica

C376p Cavalcanti, Erika Fernanda Torres Samico Fernandes
Pesquisa de *Toxoplasma gondii* e anticorpos anti-
Leptospira spp. em suínos abatidos no agreste do Estado de
Pernambuco / Erika Fernanda Torres Samico Fernandes
Cavalcanti. -- 2011.
82 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Medicina Veterinária, Recife, 2011.

Inclui referências e anexo.

1. Suínos 2. Abatedouros 3. *Toxoplasma gondii*
4. *Leptospira* spp. I. Mota, Rinaldo Aparecido, orientador
II. Título

CDD 636.089692

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**Pesquisa de *Toxoplasma gondii* e Anticorpos Anti-*Leptospira* spp. em suínos
abatidos no Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil**

Dissertação de Mestrado elaborada por

ERIKA FERNANDA TORRES SAMICO FERNANDES CAVALCANTI

Aprovada em 25/02/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. RINALDO APARECIDO MOTA
Orientador - Departamento de Medicina Veterinária

Dra. ÉRICA PAES BARRETO XAVIER DE MORAES
BIOVETECH

Prof. Dr. RÔMULO MENNA BARRETO VALENÇA
Centro Universitário CESMAC/AL

Prof. Dr. JOSÉ WILTON PINHEIRO JÚNIOR
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais Fernando Cordeiro Fernandes e M^a Lauricí Torres Samico Fernandes, pelo apoio contínuo, incentivo aos estudos e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por tudo que tem realizado em minha vida, pois sem Ele nada conseguiria. A Ele toda honra, toda glória e todo o meu louvor.

Aos meus pais, Lauricí e Fernando, por tudo que sou, pelo apoio, carinho, amor, por estarem sempre comigo. Meu pai, que me ajudou nas colheitas das amostras, pela paciência que teve nas minhas horas de aperreio, resumindo: Pai você faz parte deste trabalho, muito obrigada, Amo-te! Minha querida e linda mãe, reforço nessas palavras todo amor e admiração que tenho por você, melhor mãe do MUNDO! Amo-te de todo meu coração, vocês são os meus ídolos. Obrigada.

A minha amada irmã Marcela, pelo seu carinho, pela cumplicidade, apoio nos momentos difíceis e por todas as nossas horas de descontração. Muito obrigada por tudo, você também faz parte deste trabalho, amo-te, minha querida irmã.

Ao meu amor, amigo, confidente e marido Benôni, pela paciência e carinho nos meus momentos difíceis, sempre me apoiando em todos os aspectos. Amo-te!

Ao meu AMOR MAIOR, meu filho amado CAIO. Obrigada por você existir e me fazer uma pessoa melhor a cada dia. Amo você com todas as minhas forças.

Aos meus familiares por serem sempre a minha base de carinho.

Ao Médico Veterinário Eduardo Guelfer, Duduzinho, pelo apoio essencial nas colheitas.

Ao meu orientador, amigo, o meu "pai da Rural", Prof. Dr. Rinaldo Mota, pelos ensinamentos, carinho, dedicação e confiança. Um ser humano e profissional incrível, de invejável humildade. Aprendi muito nestes cinco anos juntos e quero poder continuar aprendendo por muitos e muitos anos. Obrigada por TUDO!

Ao Prof. Dr. Leonildo Galiza, pela amizade, conselhos, descontração, "quebra de galhos" e por todo carinho.

A todos que fazem o Laboratório de Bacteriologia do LANAGRO, Dra. Vânia Lúcia, Dra. Mabel Hanna, Dra. Marcília, Dra. Elizete, Luiz Everaldo, Cecília

e Solange, pelos ensinamentos e processamento das amostras. O convívio com vocês foi bastante enriquecedor. Obrigada!

Aos Professores do Departamento de Medicina Veterinária Andréa Alice, Andréa Paiva, Jean Carlos, Leucio Alves, Frederico Maia, Aderaldo de Freitas, Silvana Suely pelo constante apoio e carinho.

Ao Prof. Dr. Wilton Pinheiro Júnior (Galego) pela realização da análise estatística, os constantes conselhos e pela amizade.

Ao amigo Pedro Paulo pela ajuda na realização das análises de Leptospira.

Aos amigos Orestes e André por me ajudarem nas colheitas.

À amiga Pomy Kim pela ajuda na realização da PCR.

À Dra. Érica Moraes pela amizade e por me ceder material para o diagnóstico molecular.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas Érica Moraes, Nair Lira, Mércia Barros, Pomy Kim, Pedro Paulo, Orestes, André, Vanessa, Eduardo Guelfer, Sérgio Alcântara, Beth Sampaio, Anízia, Suênia, Eduardo Faria, Raíssa, Rodolfo, Eugênio, Sílvio, Débora... enfim a todos que fizeram parte do "meu Lab" durante os cinco anos de convivência diária. Muito obrigada!

À dona Guiomar, dona Cleidinha e a dona Márcia pelo constante apoio e amizade.

Aos meus amigos e amigas pela compreensão em muitos momentos de ausência.

Aos Médicos Veterinários dos abatedouros das onze cidades visitadas.

Aos meus "Lídiós" e aos meus "Cabeçudos" por todos os momentos de alegria e carinho. Amo vocês!

À coordenação da Pós-Graduação em Ciência Veterinária pela oportunidade e a Tom Menezes pelo apoio e ajuda durante todo o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Enfim a todos aqueles que me conhecem na íntegra e, por isso, sei que sempre serão os meus verdadeiros amigos.

Obrigada!

Agrada-te do Senhor, e ele satisfará os desejos do teu coração. Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele e o mais ele fará.

(Salmo 37: 4-5)

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho estudar a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) e *Leptospira* spp. em suínos abatidos na Microrregião do Vale do Ipojuca, Agreste do Estado de Pernambuco. Foram coletadas 305 amostras de sangue de animais provenientes de 11 municípios. Os soros foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, adotando-se ponto de corte de 1:64. Nos animais positivos para RIFI foi utilizada a técnica da PCR para detectar o DNA do *T. gondii* em fragmentos de coração. Para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. utilizou-se a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM). Das amostras analisadas, observou-se que 38/305 (12,46%) foram positivas para anticorpos anti-*T. gondii* e 267/305 (87,54%) foram negativas, distribuídas em 11 cidades. Dos animais positivos na sorologia, 21/38 (55,26%) também foram positivos na PCR. Os resultados referentes à infecção por *Leptospira* spp. demonstraram que 78/305 (25,57%) amostras foram positivas e 227/305 (74,42%) negativas, distribuídas nos 11 municípios estudados. Os sorovares mais frequentes foram *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni* e *Djasiman* com frequências de 55,12%, 17,94% e 6,41%, respectivamente. Conclui-se que os suínos abatidos nessa região foram expostos à infecção por esses agentes e levanta uma discussão sobre os riscos à saúde dos manipuladores das carcaças e dos consumidores e a necessidade de minimizá-los por meio da implantação de programas de vigilância e ações corretivas na região estudada.

ABSTRACT

The objective of this work to study the occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) and *Leptospira* spp. in pig killed in the Micro Valley Ipojuca Wasteland of Pernambuco We collected blood samples from 305 animals from 11 municipalities. Sera were submitted to the Immunofluorescence Assay (IFA) for detection of anti-*T. gondii*, by adopting a cutoff of 1:64. In animals positive for IFA was used the PCR technique to detect the DNA of *T. gondii* in fragments of heart. To search for anti-*Leptospira* spp. used the microscopic agglutination test (MAT). Among all samples, we observed that thirty-eight 38/305 (12.46%) were positive for anti-*T. gondii* and 267/305 (87.54%) were negative, distributed in 11 cities. Of the animals positive serology, 21/38 (55.26%) were also positive in PCR. Results related to *Leptospira* spp. showed that 78/305 (25.57%) positive samples and 227/305 (74.42%) negative, distributed in 11 municipalities. The most frequent serovars were *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Djasiman* and with frequencies of 55.12%, 17.94% and 6.41% respectively. It was concluded that pigs were beaten in the region exposed to infection by these agents and raises a discussion about the health risks of food handlers and consumers of carcasses and the need to minimize them through the implementation of surveillance programs and corrective actions in region studied.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 - Taquizoítos de exsudato peritoneal de camundongo infectado com cepa RH	20
Figura 2 - Cistos em cérebro de camundongo infectado com cepa M-7741.	20
Figura 3 - Oocistos não esporulado.	20
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
Figura 5 - Ciclo de transmissão da Toxoplasmose humana	26

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Frequência de suínos positivos para *Toxoplasma gondii* em diferentes Estados do Brasil 22

Tabela 2 - Frequência de suínos sororeagentes para *Leptospira* spp em diferentes Estados do Brasil 28

Artigos Científicos

Artigo 1

Tabela 1 - Distribuição das frequências de suínos positivos na RIFI por município abatidos na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil, 2011 51

Artigo 2

Tabela 1 - Distribuição de frequência de sorovares de *Leptospira* spp. em suínos abatidos na Microrregião do Vale do Ipojuca, por município no Agreste do Estado de Pernambuco, 2011 68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

≥	Maior ou igual
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ELISA	Imunoadsorção Enzimática
g	Grama
HA	Hemaglutinação
HAI	Hemaglutinação Indireta
HD	Hospedeiro Definitivo
HE	Hematoxilina-Eosina
HI	Hospedeiro Intermediário
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina classe G
IgM	Imunoglobulina classe M
IH	Imunohistoquímica
MAD	Método de Aglutinação Direta
MAT	Aglutinação Direta Modificada
mL	Mililitro
mM	Micromolar
OIE	World Organisation for Animal Health
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SAM	Soroaglutinação Microscópica
UV	Ultra-violeta
µL	Microlitro
µM	Micromolar

ANEXOS

Normas das revistas (Instruções aos autores)

Artigo 1 - The Journal of Parasitology 70

Artigo 2 – Revista Pesquisa Veterinária Brasileira 82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
	3.1 Objetivo geral	19
	3.2 Objetivos específicos	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
	3.1 Toxoplasmose suína	20
	3.2 Leptospirose suína	27
	3.3 Referências	34
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	
	4.1 Artigo 1 – Pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos abatidos no Estado de Pernambuco, Brasil	46
	4.2 Artigo 2 - Anticorpos Anti- <i>Leptospira</i> spp. em suínos abatidos no agreste do Estado de Pernambuco, Brasil	59
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
6	ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira, a exemplo de outras cadeias produtivas do agronegócio, cresceu significativamente nos últimos quatorze anos. Esse crescimento é notado quando se analisa os vários indicadores econômicos e sociais, como volume de exportações, participação no mercado mundial, número de empregos diretos e indiretos, entre outros (GONÇALVES; PALMEIRA, 2006).

As atividades relacionadas à suinocultura ocupam lugar de destaque na matriz produtiva do agronegócio brasileiro, destacando-se como uma atividade de importância no âmbito econômico e social (ROPPA, 2002).

Os suínos desempenham papel estratégico na alimentação humana. Não é por acaso que a carne suína é a mais consumida no mundo, representando 46% do consumo global contra 25% da carne bovina e 28% da carne de aves. No Brasil, devido a hábitos culturais, o quadro é diferente e se observa que os bovinos garantem 36% do mercado, as aves 34% e os suínos a 13% da demanda (MASSAR, 2006).

O Brasil é o quarto maior produtor de suínos do mundo, vindo atrás da União Européia, Estados Unidos e Canadá. Em 2006 o rebanho de suínos era de 35,2 milhões de animais, registrando-se um aumento de 3,3% em relação a 2005. A maior parte do rebanho (45,4%) está na Região Sul e o estado de Santa Catarina lidera o “ranking” nacional com 20,4% dos animais. Na região Nordeste, o rebanho de suínos é composto por 3,94 milhões de cabeças, o equivalente a 11,2% do rebanho nacional e o estado de Pernambuco concentra 7% desses animais (ABIPECS, 2009).

Os agentes infecciosos bacterianos, virais, parasitários podem causar prejuízos à produção de suínos. A leptospirose e a toxoplasmose são enfermidades que podem causar elevada morbidade, com redução no desempenho reprodutivo e aumento no custo da produção (SOBESTIANSKY, 2002).

Nesse contexto, o segmento produtivo tem cada vez mais se preocupado em assegurar a sanidade dos rebanhos através da adoção de programas sanitários. Afinal, medidas curativas são sempre bem mais onerosas para o produtor quando comparadas a medidas preventivas (MEYER; SOBESTIANSKY, 2005).

Existe uma preocupação nos diferentes estados brasileiros quanto à pesquisa da toxoplasmose e leptospirose na suinocultura, contudo não há registros de dados sobre a ocorrência da infecção por estes agentes em suínos no estado de Pernambuco. A importância destes agentes infecciosos na suinocultura e a exigência dos consumidores quanto à segurança dos alimentos é notório e exigido no âmbito da sustentabilidade da produção nacional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o *status* sanitário dos suínos abatidos no Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil quanto às infecções por *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a frequência de anticorpos anti- *T. gondii* em suínos abatidos na região Agreste de Pernambuco;

Identificar a presença do DNA do *T. gondii* em tecidos de suínos abatidos na região Agreste de Pernambuco;

Determinar a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em suínos abatido na região Agreste de Pernambuco;

Identificar os sorovares de *Leptospira* spp. em suínos abatidos na região Agreste de Pernambuco.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Toxoplasmose Suína

A toxoplasmose é uma enfermidade de distribuição cosmopolita, tendo importância médica e veterinária por ser uma zoonose e causar diversos transtornos reprodutivos em vários hospedeiros intermediários. O parasito responsável por essa doença é o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), um protozoário com reprodução intracelular obrigatória, podendo ser encontrado nos diferentes exsudatos dos animais infectados (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; UGGLA, 1986; DUBEY et al., 1995; LAUAR, 1995).

A infecção por *T. gondii* foi relatada pela primeira vez em suínos, nos Estados Unidos por Farrel et al. (1952), e no Brasil a primeira citação nesta espécie ocorreu no Estado de Minas Gerais (SILVA, 1959).

T. gondii é um protozoário coccídio intracelular obrigatório (SHERDING, 1998), que infecta a maioria dos animais homeotérmicos (FRENKEL, 1992; TENTER et al., 2000), porém seu ciclo só se completa em exemplares da família *Felidae* que são seus hospedeiros definitivos (DUBEY, 1998b).

Esse parasito é encontrado sob três formas evolutivas: taquizoítos, bradizoítos contidos em cistos teciduais e esporozoítos em oocistos esporulados (Figuras 1, 2 e 3). As três formas são os estágios infectantes no ciclo de vida do agente, tanto para os hospedeiros intermediários, quanto para os definitivos (ACHA; SZYFRES, 1987; DUBEY, 1987; DUBEY, 1998a).

Os taquizoítos são formas intracelulares e livres que se multiplicam rapidamente nos tecidos dos hospedeiros (MARTINS; VIANA, 1998; NORSWORTHY, 1998), podendo parasitar qualquer célula de qualquer tecido. Sua presença demonstra a fase aguda da infecção e possuem importância epidemiológica, pois são as formas transmitidas verticalmente durante a gestação (DUBEY et al., 1970; SHERDING, 1998).



Figura 1 - Taquizoítos de exsudato peritoneal de camundongo infectado com cepa RH (1600x) (Dubey et al.,

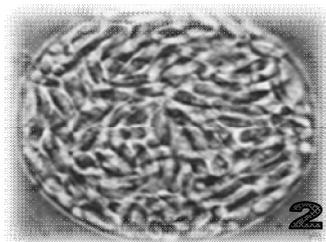


Figura 2 - Cistos em cérebro de camundongo infectado com cepa M-7741 (1600x) (Dubey et al., 1970).

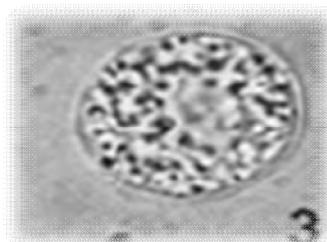


Figura 3 - Oocistos não esporulado (1600x) (Dubey et al., 1970).

Os felídeos selvagens e gatos domésticos são os únicos hospedeiros definitivos do *T. gondii* (DUBEY, 1998b; NORSWORTHY, 1998). Sua pouca especificidade foi confirmada, pois a maioria dos animais de sangue quente são considerados hospedeiros intermediários (FRENKEL, 1992). São aproximadamente 300 espécies entre carnívoros, herbívoros, roedores, primatas, aves, peixes, anfíbios e répteis que podem funcionar como hospedeiros intermediários (SWANGO et al., 1992; NEVES, 2000). Entre os mamíferos citam-se o homem, caninos, suínos, ovinos, caprinos, equinos, bovinos e coelhos (CHAPLIN et al., 1984). Os hospedeiros intermediários geralmente se infectam pela ingestão de oocistos que liberam os esporozoítos no intestino que se diferenciam em taquizoítos. Esses se disseminam pelo sangue, linfa e posteriormente se diferenciam em bradizoítos, formando cistos no tecido; esses animais também podem ingerir os bradizoítos que se diferenciam em taquizoítos e novamente em bradizoítos para encistarem-se nos tecidos (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

A evolução do ciclo do *T. gondii* encontra-se disposta na figura 4. Após a ingestão dos cistos contidos nos tecidos (principalmente dos pequenos mamíferos e aves) pelos hospedeiros definitivos, ocorre uma fase assexuada (esquizogonia) que termina com a gametogênese, onde os microgametas fecundam os macrogametas (fase sexuada), denominada ciclo enteroepitelial. É nesta fase que o hospedeiro definitivo libera os oocistos nas fezes. Estes esporulam a partir do 1º ao 5º dia após sua excreção, antes de se tornarem infectantes (FREYRE et al., 1997; DIAS; FREIRE, 2005).

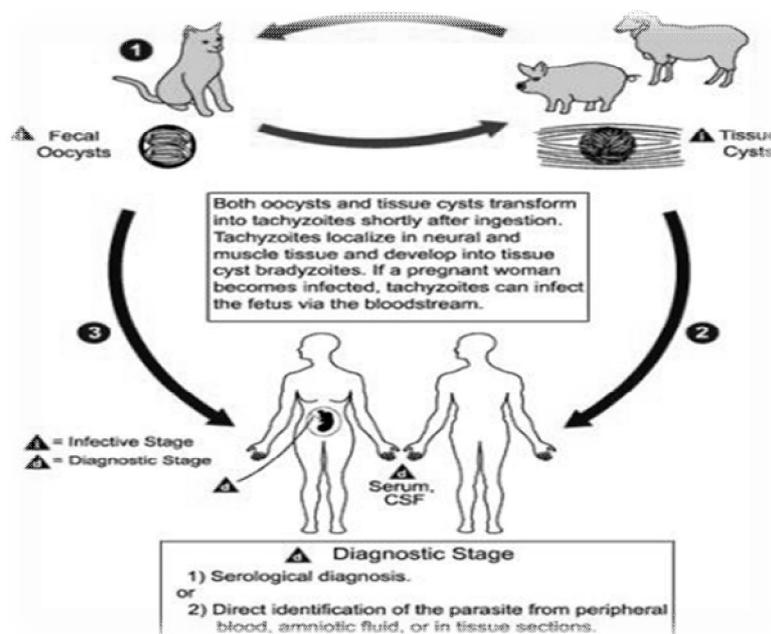


Figura 4 - Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (Tenter et al., 2000)

A distribuição do parasito ocorre de maneira desigual pelo mundo. Geralmente são encontrados em regiões úmidas e com temperaturas elevadas que permitem a sobrevivência dos oocistos no ambiente (SAWADOGO et al., 2005).

A prevalência da infecção em suínos pode variar entre regiões para conforme os hábitos sócio-culturais, fatores geográficos e climáticos (MELAMED et al., 1992).

A toxoplasmose é um sério problema para as criações de suínos e pequenos ruminantes, nas quais causa prejuízos econômicos por estar associada ao aborto e infertilidade, além de diminuir a produção dos animais infectados (CARLETTI et al., 2005).

DUBEY et al. (1991) encontraram, nos Estados Unidos, uma taxa de 23,0% em 11.229 animais destinados ao consumo. No Brasil, estudos sobre a prevalência da infecção em suínos foram realizados em diferentes regiões (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência de suínos positivos para *Toxoplasma gondii* em diferentes Estados do Brasil

Unidade Federativa	Autor	Ano	Técnica utilizada	Nº Animais	F.R (%)
São Paulo	SUARÉZ-ARANDA	2000	HA	300	21,0%
Paraná	TSUTSUI et al.	2003	RIFI	521	15,3%
Rio Grande do Sul	FIALHO; ARAÚJO	2003	HI	240	20,0%
Rio Grande do Sul	FIALHO; ARAÚJO	2003	RIFI	240	34,0%
Paraná	CARLETTI et al.	2005	RIFI	424	4,0%
São Paulo	SANTOS et al.	2005	MAT	286	17,0%
São Paulo	OLIVEIRA et al.	2007	MAD	550	20,1%
Paraná	MOURA et al.	2007	RIFI	117	8,5%
Minas Gerais e São Paulo	LANGONI et al.	2007	MAD	262	21,6%
Paraná	MILLAR et al.	2008	RIFI	408	25,5%
Bahia	BEZERRA et al.	2009	ELISA	465	18,2%
Alagoas	VALENÇA	2009	RIFI	342	26,9%
Santa Catarina	PERDONCINI	2010	HI	505	17,2%

Convenções: F.R. – Frequência Relativa; RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta; HI- Hematoaglutinação Indireta; MAD – Aglutinação Direta Modificada

Os suínos podem se infectar a partir da ingestão de água e ração contaminados com fezes de felídeos contendo oocistos, em instalações e piquetes onde o oocisto está presente.

Outra forma possível de infecção é a ingestão de cistos contidos em carne e vísceras cruas oferecidas como ração, ou ainda por infecção transplacentária (HUGH-JONES et al., 1986).

A manifestação dos sinais clínicos da toxoplasmose animal depende principalmente da resposta imune do hospedeiro infectado e da virulência da amostra de *T. gondii* (LUFTZ et al., 1984). A toxoplasmose suína normalmente é assintomática no suíno adulto, no entanto, algumas cepas de *T. gondii* podem causar infecção clínica ou morte (PRICKETT et al., 1985). A infecção em suínos é diagnosticada, na maioria das vezes, quando associada com abortos, natimortos, mortalidade de suínos com menos de três semanas de vida e infertilidade (HARTLEY; MUNDAY, 1974).

A infecção pode ocorrer em leitões de até oito semanas de idade, podendo causar transtornos nervosos, respiratórios e digestivos, causando diminuição no ganho de peso dos animais, predispondo-os ao aparecimento de outras doenças. Os leitões infectados podem apresentar sinais como febre, dificuldades de respirar e tosse, anorexia, diarréias; os animais podem também apresentar cegueira sendo assim necessário realizar o diagnóstico diferencial para outras doenças que causam transtornos nervosos como meningite por *Streptococcus suis* e doença do edema por *Escherichia coli* (ABCS, 2007).

Entre os fatores relacionados à ocorrência da infecção em suínos, o sexo dos animais foi apontado por alguns autores (BONA et al., 2006; MOURA et al., 2007; BEZERRA et al., 2009) como sendo mais frequente em fêmeas do que em machos. A idade dos animais é outro fator importante, Silva et al. (2010) relatam que a idade do animal é importante na avaliação do risco de infecção pelo consumo de carne suína e seus derivados. Pois geralmente a carne *in natura* é oriunda de animais jovens, enquanto que muitas vezes os embutidos são produzidos com carne de animais de descarte, normalmente de maior idade e mais frequentemente infectados.

Carletti et al. (2005) apontam maior frequência de positivos em matrizes, quando comparadas aos animais de terminação e Bezerra et al. (2009) verificaram que a positividade foi maior em animais oriundos de abates clandestinos. Desta maneira, o sistema de criação (intensiva x extensiva) e o grau de tecnificação (DA SILVA et al., 2008) são apontados como fatores de risco para a infecção de suínos.

O contato direto ou indireto com outras espécies de animais, tais como gatos e roedores, também tem sido incriminado como fator de risco (PEREIRA, 2005). Além disso, fatores relacionados ao manejo, como a presença de lâmina d'água nas pocilgas, bebedouro tipo canaleta e a presença de áreas alagadiças nas propriedades foram associados à maior

prevalência da infecção (BEZERRA et al., 2009). Valença (2009) no Estado de Alagoas constatou que suínos criados em granjas que realizavam a introdução de varrões tinham 1,83 vezes mais chance de se infectarem com *T. gondii* do que os animais criados em granjas que não introduziram varrões.

O diagnóstico da toxoplasmose baseia-se na história clínica, nos dados epidemiológicos e nos sinais clínicos do rebanho (AVERBACH et al., 1980), porém nem sempre esses são evidentes. O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é fundamental, uma vez que a infecção pode assumir quadros clínicos facilmente confundidos com outras enfermidades, dificultando a tomada de medidas específicas de tratamento e controle (VIDOTTO, 1990).

O diagnóstico desta protozoose pode ser realizado por métodos indiretos como a sorologia, ou pela pesquisa direta de cistos e taquizoítos em tecidos, através de cortes histológicos, seja corados pela Hematoxilina e Eosina (HE), Imunohistoquímica (IH) ou ainda através do Bioensaio, inoculando-se tecido do animal suspeito em camundongos. Em cortes histológicos corados pela HE torna-se difícil a identificação do *T. gondii*, pois o parasito não possui características tintoriais próprias que permitam distinguí-lo nitidamente das células adjacentes, podendo ser confundido com núcleos ou fragmentos nucleares que se coram de forma semelhante (ROSA et al., 2001). Porém alguns autores relataram a observação dos cistos em cortes histológicos corados com HE em órgãos como, por exemplo, em músculo cardíaco de gerbis (*Meriones unguiculatus*) (FRAZÃO –TEIXEIRA et al., 2002).

A confirmação da infecção deve ser feita por meio de testes sorológicos e/ou biópsia de linfonodos (LAPPIN, 1994). Os cistos de *T. gondii* são microscópicos e, portanto, não são detectados pelo serviço de inspeção do abate. Por isso os levantamentos são realizados através de exames sorológicos que detectam anticorpos nesses animais, indicativos de uma infecção pré-existente (CAMARGO, 1996).

A detecção de anticorpos séricos é o método mais frequentemente utilizado na determinação da infecção por *T. gondii* em suínos. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste aglutinação direta modificada (MAT) reconhecem anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície do parasito, enquanto que a hemaglutinação (HA) e o ELISA, normalmente reconhecem também os antígenos citoplasmáticos, tendendo a detectar anticorpos mais tardios (HILL et al., 2006). Segundo Dubey et al. (1995) o MAT é um teste de elevada sensibilidade para suínos, com elevada especificidade analítica, sendo menos sensível apenas que o ELISA.

Fialho e Araújo (2002) compararam o teste de hemaglutinação indireta com a RIFI em suínos, encontrando porcentagem de concordância de resultados positivos e de negativos, nas duas técnicas de 48,1% e 94,3%, respectivamente, resultando em uma porcentagem de concordância total de 78,7%. Afirmaram ainda que para fins de diagnóstico a RIFI foi superior à HAI e que esta reação tem sua principal indicação em inquéritos epidemiológicos.

A RIFI tem como vantagens ser altamente específica e sensível (Dubey, 1990; Frenkel, 1997). É considerada de fácil realização, praticamente isenta de problemas de infecção acidental para os laboratoristas e não requer organismos vivos (URQUHART et al., 1998).

Outra vantagem que a RIFI-IgG apresenta é a capacidade de evidenciar anticorpos dirigidos para os antígenos de superfície do *T. gondii*, sendo mais precoce quando comparado a HAI. Os títulos revelados na RIFI ascendem ao redor do oitavo ou 10º pós-infecção e na HAI, somente após o 14º dia. A sua desvantagem está na necessidade de equipamentos especiais e caros, como o microscópio de imunofluorescência e as anti-gamaglobulinas específicas para cada espécie (LARSSON, 1989).

A descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis em 1985 fez surgir uma nova perspectiva no diagnóstico para vários microrganismos, incluindo o *T. gondii*. A PCR veio suprir a carência de métodos diagnósticos precisos e sensíveis. É importante lembrar que a técnica molecular para detectar o DNA do *T. gondii* não substitui os métodos tradicionais (SILVA et al., 2010). A associação de dois ou mais métodos de diagnóstico indica o real estágio da infecção (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).

A biologia molecular na toxoplasmose suína apresenta muitas utilidades, tanto na pesquisa, seja em estudos experimentais ou observacionais, bem como no diagnóstico em suínos domésticos e javalis (RICHOMME et al., 2009). Tal ferramenta tem sido muito utilizada em estudos transversais, acompanhamento de tratamento e de vacinas, epidemiologia molecular, evolução populacional e diagnóstico clínico (DA SILVA et al., 2009). Várias técnicas de PCR foram desenvolvidas para o diagnóstico da toxoplasmose, utilizando diversos tipos de amostras clínicas e várias técnicas como nested-PCR, multiplex-PCR e polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP-PCR), real time-PCR, análise de microsátélites e sequenciamento, entre outras (SU et al., 2006).

Dessa forma, a detecção molecular do agente apresenta grande importância e, dependendo das técnicas utilizadas, permite caracterizar a estrutura populacional clonal e analisar a evolução populacional do parasito.

A toxoplasmose é considerada uma doença de grande importância na Saúde Pública como doença ocupacional, principalmente em indivíduos que trabalham em matadouros, chegando neste caso a uma soropositividade de até 70% entre trabalhadores desses estabelecimentos (GONÇALVES et al., 2006).

Ainda do ponto de vista da Saúde Pública a espécie suína tem merecido especial atenção dos epidemiologistas por ser uma importante fonte de infecção à população humana devido à longevidade dos cistos teciduais nas carcaças dos animais de produção. Os alimentos contaminados com oocistos contidos nas fezes dos gatos, a via transplacentária, leite não pasteurizado, ovos, carnes que foram preparadas com cocção inadequada e que continham cistos são outras possíveis vias de transmissão citadas para espécie humana (Figura 5).



Figura 5 – Ciclo de transmissão da humana (Lynfield & Guerina, 1997).

A adoção de medidas de controle da doença na criação de suínos é de extrema importância, pois a mesma pode acarretar alto custo de produção, queda na comercialização da carne bem como risco para Saúde Pública (GLASER; ÂNGULO, 1994).

Alguns cuidados devem ser tomados nas criações de suínos como: redução ou eliminação dos gatos da propriedade, manter o controle de roedores nas instalações, eliminar fêmeas sorologicamente positivas, evitar fornecer alimentação humana aos animais, incinerar as carcaças dos animais infectados são medidas de controle da doença (LAPPIN, 1994).

3.2. Leptospirose Suína

A leptospirose é uma doença causada por bactérias da família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. É uma zoonose que ocorre em grande variedade de espécies animais, entre as quais bovinos, suínos, cães, roedores, animais silvestres, humanos e está distribuída por todo mundo (OLIVEIRA; NETO, 2007).

Esta enfermidade causa inúmeros prejuízos em rebanhos de suínos destinados à reprodução em todas as partes do mundo. No entanto, o impacto econômico da doença está restrito às criações industriais no hemisfério Norte, Nova Zelândia, Argentina e Brasil (CLARK, 1996; MAILLOUX, 2001). No Brasil, a leptospirose em suínos tem sido uma das principais causas de falhas reprodutivas em vários Estados, principalmente naqueles das regiões sul e sudeste (PEREIRA, 2009).

Essa enfermidade apresenta-se nas formas aguda e crônica, dependendo do sorovar envolvido e é caracterizada por transtornos reprodutivos como abortos, natimortos, fetos mumificados e nascimento de leitões fracos e que não sobrevivem (SOBESTIANSKY et al., 2007).

Durante décadas a classificação foi apenas sorológica, onde o gênero *Leptospira* foi dividido em duas espécies, a *Lepstopira interrogans* que compreendia todas as estirpes patogênicas e *Leptospira biflexa*, reunindo as estirpes saprófitas. Recentemente, por genotipagem, as leptospiros foram reclassificadas em 16 genoespécies, sendo que os sorovares patogênicos e não patogênicos podem ocorrer dentro de uma mesma espécie. As genoespécies aceitas são: *Leptospira interrogans* senso stricto, *L. nogushi*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. biflexa*, *L. fainei*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. weilli*, *L. inadai*, *L. parva* e *L. alexanderi* (LEVETT, 2001).

Os sorovares de leptospiros mais comumente encontrados infectando e causando transtornos reprodutivos em suínos são *Leptospira interrogans* sorovares *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Gryppotyphosa*, *Bratislava* e *Copenhageni* (SOBESTIANSKY et al., 2007).

As condições ótimas de sobrevivência das leptospiros são umidade, temperatura de 28°C e pH neutro ou levemente alcalino. Estudos experimentais revelaram que o sorovar *Pomona* pode persistir até seis meses em solos saturados de umidade, sobrevivendo apenas trinta minutos em solo seco (PERRY; HEARDY, 2000).

Um dos primeiros isolamentos dos sorovares *Pomona* e *Tarassovi* em suínos no mundo foi realizado por JOHNSON (1939) na Austrália. Hidalgo; Hidalgo (1970) isolaram os sorovares *Pomona* e *Tarassovi* em suínos aparentemente saudáveis na América do Sul.

No Brasil, Guida (1948) examinou 50 rins de suínos sem lesões e procedentes de várias localidades do interior do Estado de São Paulo e isolou três amostras de leptospiros, obtidas de um lote de seis suínos procedentes do Município de Rio Claro. Pelas características de cultura e de patogenicidade, as três amostras foram idênticas, mas diferiram sorologicamente dos sorovares *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* esta última isolada de *Rattus norvegicus*.

No Brasil foram realizados vários estudos sobre a infecção por *Leptospira* spp em suínos, com frequências variando 0,76% a 67,7% (Tabela 2). Nos últimos anos, os suínos têm sido apontados como os mais importantes animais domésticos portadores de leptospira, sendo responsabilizados por ocorrências de epidemias no homem e em outras espécies domésticas (PEREIRA, 2009).

Tabela 2 – Frequência de suínos sororeagentes para *Leptospira* spp em diferentes Estados do Brasil

Unidade Federativa	Autor	Ano	Técnica utilizada	Nº Animais	F.R. (%)
Paraná	DELBEM et al.	2002	SAM	36	66,6%
São Paulo	SHIMABUKURO et al.	2003	SAM	131	36,6%
Paraná	DELBEM et al.	2004	SAM	298	44,3%
São Paulo	AZEVEDO et al.	2006	SAM	164	16,5%
Minas Gerais e São Paulo	LANGONI et al.	2007	SAM	262	1,3%
São Paulo e Minas Gerais	PEZERICO et al.	2007	SAM	262	0,76%
Paraíba	AZEVEDO et al.	2008	SAM	131	33,6%
Paraná	HASHIMOTO et al.	2008	SAM	240	67,7%
São Paulo	MIRAGLIA et al.	2008	SAM	137	39,4%
Alagoas	VALENÇA	2009	SAM	342	16,1%
Paraná	HASHIMOTO et al.	2010	SAM	230	28,00%

Convenções: F.R. – Frequência Relativa; SAM – Soroaglutinação Microscópica

Quando infectados, apresentam prolongado período de leptospiremia não acompanhado de sinais clínicos; a urina por ter pH neutro ou ligeiramente alcalino apresenta

aos 20-30 dias após a infecção, alta concentração de leptospiras viáveis que podem eliminar leptospiras por um período superior a um ano (SOBESTIANSKY et al., 2007).

Roedores e animais silvestres atuam como portadores de leptospiras e ambientes onde esses animais circulam podem estar contaminados pelas bactérias liberadas na urina, sendo uma importante via de infecção para os suínos e humanos. Os ratos, normalmente encontrados em comedouros das porcas também são incriminados na infecção de suínos (OLIVEIRA, 2007).

A primeira referência encontrada na literatura sobre leptospirose em suínos é de Wagner em 1942 (GUIDA, 1948) que descreveu na Alemanha a transmissão da doença ao homem. No Brasil, um dos primeiros relatos de uma possível transmissão da leptospira suína ao homem foi feito por Guida et al. (1959) em um surto da doença em uma granja na cidade de São Paulo, onde dois tratadores apresentaram títulos de aglutininas 400 e 800 para o sorovar *Canicola*, sem apresentarem sintomas característicos da leptospirose.

Os suínos se infectam pelo contato com material contaminado como água, piso ou ração, urina, fetos abortados ou descargas uterinas. A infecção pode ocorrer por via oral, venérea, pele lesada e mucosas. As leptospiras alcançam o fígado através de vasos linfáticos e multiplicam-se aproximadamente por cinco dias, seguindo-se de uma leptospiremia (estágio febril). Nesta fase as bactérias podem ser encontradas em vários órgãos, embora o fígado e os rins sejam os mais atingidos (SOBESTIANSKY et al., 2007).

A leptospirose suína pode apresentar-se nas formas aguda e crônica. Na primeira podem-se observar febre e mastite focal não supurativa e leptospirúria em animais adultos. Em suínos jovens, principalmente leitões, pode ocorrer febre, anorexia, icterícia, hemoglobinúria e alta mortalidade, principalmente nos recém-nascidos. Geralmente o sorovar associado a este quadro é *Icterohaemorrhagiae*. Nos animais jovens, durante a fase de aleitamento, podem ocorrer casos de encefalite caracterizados por incoordenação motora e acessos convulsivos com movimentos de pedalagem (RAMOS et al., 2002).

Na fase de leptospiremia pode ocorrer o aborto, partos distócitos, leitegadas pequenas, baixo número de nascidos totais, mumificação fetal, descargas vulvares, natimortos e nascimento de leitões fracos, baixa viabilidade pós-parto, aumento significativo do índice de mortalidade. A morte dos fetos e leitões é causada, na maioria das vezes, pela septicemia, acompanhada pela localização, multiplicação e lesões no fígado, rins e outros órgãos (LIMA, 2010).

Na forma crônica, comum nos animais adultos, pode ocorrer a leptospirose, geralmente com o sorovar *Pomona*, sendo os suínos considerados hospedeiros de manutenção para esse sorovar. A infertilidade, com a ocorrência de abortamentos e natimortos, é frequente para os sorovares *Canicola*, *Pomona* e *Icterohaemorrhagiae* (ELLIS, 1999; BASTOS, 2006).

Diversos são os fatores de risco associados à leptospirose suína, mas autores destacam como principais os bebedouros tipo canaleta, existência de áreas alagadiças próximas às instalações, falta de higienização nos reservatórios de água, bem como a presença de roedores nas propriedades (DELBEM et al., 2004).

O diagnóstico da leptospirose suína pode ser realizado através dos achados epidemiológicos e clínicos, devendo ser confirmados por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção direta ou indireta do agente (FAINE et al., 1999).

Para determinar a ocorrência da leptospirose suína em um rebanho, indica-se a associação de técnicas de diagnóstico, ou seja, a combinação de provas sorológicas e bacteriológicas (QUINN et al., 2005).

As técnicas mais utilizadas no diagnóstico são a Soroaglutinação Microscópica (SAM), ELISA e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é específica, sensível e rápida para o diagnóstico da leptospirose suína, sendo um importante meio de diagnóstico, bem como para investigações epidemiológicas. Já o ELISA apresenta como vantagens a utilização apenas de frações bacterianas, não necessitando de antígenos vivos, além da possibilidade de detectar especificamente anticorpos da classe IgM e IgG e permitir a correlação entre os resultados e o tempo da infecção (SOTO et al., 2007).

A SAM é o método de referência preconizado pela Organização Mundial da Saúde (FAINE et al., 1999). É um teste considerado sorogrupo específico e a sua interpretação é complexa devido às reações cruzadas que acontecem entre sorogrupos distintos, principalmente na fase aguda da doença (RENTKO; CLARK; ROSS, 1992; FAINE, 1994; MÉRIEN; ARTHARID, 2005). A interferência no diagnóstico também tem ocorrido com o uso de vacinas polivalentes (OLIVEIRA, 1999). Considera-se importante para a interpretação dos resultados o histórico do uso de vacinas contra a leptospirose suína nas reprodutoras que podem apresentar títulos de anticorpos vacinais. A vacina estimula a formação, principalmente de IgG, mas por um período a IgM também é produzida e detectada prioritariamente no teste de SAM (SOTO et al., 2007).

De acordo com a OMS, a leptospirose está classificada como doença transmissível de grande importância do ponto de vista sócio-econômico e/ou sanitário, cuja repercussão no comércio internacional de animais e produtos de origem animal são consideráveis (PEREIRA, 2009). O controle da leptospirose suína é baseado na imunização dos susceptíveis e nas ações sobre as fontes de infecção, que inclui medidas higiênicas, de manejo, combate a roedores e tratamento medicamentoso (OLIVEIRA; PIRES, 2004).

A leptospirose é, também, considerada como uma doença de risco ocupacional, representando risco para a Saúde Pública, principalmente para Médicos Veterinários, magarefes e funcionários de granjas suínas que estão sujeitos ao contato direto com o agente (FARR, 1995; FAINE et al., 1999). Pesquisadores de diferentes países investigaram a ocorrência da leptospirose e seu caráter ocupacional deixando nítida a natureza da atividade laboral e a infecção por este microrganismo.

O primeiro relato da leptospirose e seu caráter ocupacional foi descrito por Inada em 1915 em um grupo de mineradores japoneses. Em 1930 houve o registro da ocorrência da doença de Weil em trabalhadores do setor de limpeza pública (LEVETT, 2001).

Caminoa et al. (1990), em Buenos Aires realizaram a SAM e hemoculturas em 26 funcionários de um frigorífico e encontraram 26,92% de soropositividade. Os anticorpos contra os sorovares encontrados foram para *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* e *Hardjo*, com títulos de 100. Houve também o isolamento de uma cepa de *Icterohaemorrhagiae* a partir de um dos hemocultivos.

A prevenção da leptospirose suína é largamente dependente de medidas de saneamento da granja e de diagnóstico da doença, que muitas vezes são difíceis de serem implementadas principalmente em regiões onde a suinocultura não é tecnicizada (DELBEM et al., 2004). Partindo do conceito que as leptospiras são sensíveis a diversos detergentes e desinfetantes, programas de desinfecção na granja com a realização de vazio sanitário no sistema “all in”, “all out”, (tudo dentro, tudo fora) são medidas importantes na eliminação de leptospiras presentes nas instalações das granjas suínícolas (SOBESTIANSKY et al., 2007).

Algumas recomendações preventivas são: drenagem das áreas alagadiças próximas às instalações dos suínos, a substituição dos bebedouros do tipo canaleta pelos automáticos e a higienização periódica dos reservatórios de água. Quando não for possível a troca por bebedouros automáticos, sugere-se um programa de higienização periódica dos bebedouros do tipo canaleta, pois tal prática parece ter sido eficiente para os reservatórios de água, bem como a adoção de programa de controle de roedores (SARAZÁ; SÁNCHEZ-VAZCAÍNO, 2002).

Uribe Orrego (2003) na Colômbia pesquisaram pela SAM, 45 amostras de trabalhadores de frigorífico de bovino e suíno e encontraram amostras sororeagentes com anticorpos contra os sorovares *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Bratislava*, *Hardjobovis* e *Hardjopratižno*. Os quatro primeiros sorovares são frequentemente encontrados entre animais domésticos e silvestres, porém, os demais nunca tinham sido detectados em humanos na Colômbia. Estes autores afirmaram que o *Hardjopratižno* possui alta prevalência entre os bovinos na região estudada e estes resultados confirmaram a exposição ocupacional dos funcionários no frigorífico.

Pesquisando aglutininas anti-leptospira em 102 amostras de soro de trabalhadores de diferentes frigoríficos na Turquia, Babur et al. (2003) detectaram duas (1,96%) amostras soropositivas na SAM e os anticorpos para os sorovares *Bratislava* e *Australis*.

Várias pesquisas foram desenvolvidas no Brasil. Em Londrina, Vasconcelos et al. (1993), analisaram 57 amostras de soros de magarefes encarregados da matança e desmembramento de carcaças e detectaram 24,60% de amostras sororeagentes na SAM para os sorovares *Serjoe*, *Hardjo*, *Wolffi* e *Javanica* com títulos variando de 100 a 400, considerados como infecções crônicas.

Campagnolo et al. (2000), estudando um surto de leptospirose suína, verificaram que havia uma associação entre humanos expostos e animais infectados; esses autores verificaram que indivíduos que trabalhavam com suínos reagentes e que fumavam e bebiam durante suas atividades com os animais estavam sujeitos a um risco 14,4 e 5,1 vezes maior de se infectar, respectivamente.

De acordo com estudos de Gonçalves (2005) em um frigorífico que abate suínos no norte do Paraná, em 150 amostras de soros de funcionários foram encontrados 4% de amostras sororeagentes na SAM para os sorovares *Hardjo*, *Wolffi* e *Castellonis*, com títulos que variaram entre 100 e 400. As amostras de soros reagentes foram de funcionários do setor da graxaria, sala de matança, operador de máquinas e do carregamento de carga/animais. O autor relata ainda que a leptospirose humana está frequentemente associada à difusão da leptospirose animal. Os funcionários do frigorífico por manterem contato direto e diário com estes animais tornaram-se grupo de risco para esta enfermidade.

Como doença ocupacional, o contato direto ou indireto com animais ou carcaças contaminadas representam risco para a contaminação e por esse motivo, é imprescindível o uso de roupas de proteção como luvas, avental impermeável, botas de borrachas e óculos em

loais onde o ambiente de trabalho pode representar algum risco para a infecção ao homem (LEVETT, 2001).

É de suma importância na prevenção da leptospirose humana e animal adotar medidas de controle de roedores através de anti e desratização. Em relação ao ambiente, é necessário realizar medidas de proteção individual como o uso de calçados e vestimentas apropriadas em situações de risco como em enchentes; remoção da lama após enchentes e limpeza e desinfecção com solução de cloro no local que sofreu inundação.

3.3 Referências

ABCS – Associação Brasileira dos Criadores de Suínos - **Suinocultura Brasileira (2007)**

Disponível em < www.abcs.org.br> Acesso em: 20 de ago. 2009.

ABIPECS. **Carne Suína: consumo mundial em 2009 pode recuar 0,67%**. Disponível em: http://cepa.epagri.sc.gov.br/Informativos_agropecuarios/Carnes/carne_suina_perspectivas_05.06.09.htm> Acesso em: 28 de outubro de 2009.

ACHA, P.N. ; SZYFRES, B. Zoonosis and communicable diseases common to man and animals. **Scientific publication**, nº 503. Pan American Health Organization / World Health Organization, Washington-EUA, p. 963, 1987.

AVERBACH, S. et al. Importância clínica no diagnóstico oportuno da toxoplasmose. Diferenciação sorológica das formas agudas e crônicas. Imunoserum Técnica Ltda. 1980.

AZEVEDO, S.S. et al. Frequência de aglutininas anti-leptospiras em matrizes suínas de um rebanho do município de Ibiúna, Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 73, n. 1, p. 97-100, 2006.

_____. Prevalence of anti-*Leptospira* spp. Antibodies in swine slaughtered In the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, northeast region of Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.4, p.517-520, out./dez., 2008.

BABÜR, C. et al. Investigation of antileptospira antibodies in slaughterhouse workers in Ankara. **Mikrobiol Bült**, v.37, p.143-150, 2003.

BEZERRA, R. A. et al. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 78-80, 2009.

_____. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 78-80, 2009.

BONNA, I. C. F. et al. Estudo soroepidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 186-189, 2006.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose, diagnóstico sorológico. **Laboratório Bronstein**, Porto Alegre, 4 p., 1996.

CAMINOVA, R. et al. Brote de leptospirose humana em um matadero Del Partido Azul. **Acta Biochim clinical Latinoamericana**, v.24, n.1, p.61-66, 1990.

CAMPAGNOLO, E. R. et al. Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis of Missouri in humans exposed to infected swine. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 216, p.676-682, 2000.

CARLETTI, R. T. et al. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos no Estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 563-568, 2005.

CHAPLIN, E. L. et al. Cadeia epidemiológica da toxoplasmose em Guaporé/RS, relacionando humanos e seus animais domésticos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, Porto Alegre, v. 12, p. 25-34, 1984.

CLARK, L. K. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1/4, p.447-454, 1996.

DELBEM, A. C. B. et al. Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.174-177, 2002.

_____. Fatores de risco associados à soropositividade para leptospirose em matrizes suínas, **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 847-852, 2004.

DIAS, R. A. F.; FREIRE, R. L. Surtos de Toxoplasmose em seres humanos e animais. Semina: **Ciências Agrárias**, v.26, p.239-248, 2005.

DUBEY, J. P. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **Journal Experimental Medicine**, v. 132, p. 636-662, 1970.

_____. **Diagnosis of livestock abortion due to *Toxoplasma gondii***. Laboratory diagnosis of livestock abortion, 3th Edition, Edited by Clyde A. Kirkbirde, Iowa State University Press: Ames, Iowa, 1990, p. 260.

_____. National seroprevalence of *T. gondii* in pigs. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.77, p.517-521, 1991.

_____. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **Journal Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 723-729, 1995b.

_____. Toxoplasmosis. Veterinary Clinics of North America: **Small Animal Practice**, v. 17, n. 6, p. 1389-1404, 1987.

_____. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998a.

_____. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and cyclosporiasis. In: PALMER, S.R. et al.. Zoonosis. Oxford **Medical publication**, p. 579-597, 1998b.

ELLIS, W.A. Leptospirosis. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. (Ed.). **Diseases of swine**. 8.ed. Ames: Iowa State Press, 1999. p.483-493.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. Boca Raton: CRC, 1994. 353p.

_____. *Leptospira and leptospirosis*. 2.ed. Melbourne: Australia, **MediSci**, 1999.

FARR, R.; W. Leptospirosis. **Clinical Infectious Disease**, v.21, p. 1-6, 1995.

FARREL, R. L. et al. Toxoplasmosis. I. *Toxoplasma* isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 13, n. 47, p. 181-185, 1952.

FIALHO C. G.; ARAÚJO F. A. P.. Comparação entre os testes de imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em soros de suínos. **Acta Scientiarum Veterinary**, 30(3): 185-189, 2002.

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

FRAZÃO-TEIXEIRA, E. et al. Sensibilidade Comparativa do Gerbil (*Meriones unguiculatus*) e do camundongo (*Mus musculus*) inoculados com Oocistos Esporulados de *Toxoplasma gondii* (NICOLLE ; MANCEAUX, 1909) DA CEPA VEG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p.65-69, 2002.

FRENKEL, J.K. La toxoplasmosis una zoonosis. **Notas Veterinárias**, v. 2, n. 3, p. 4-13, 1992.

_____. Toxoplasmose. **In**: Veronesi R.; Focaccia R. (Eds). Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu, pp. 1290-1306, 1997.

FREYRE, A. et al. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.13-15, 1997.

GLASER, C. A.; ÂNGULO, F. J. Animal- Associated oportunic infections among personsinfected with the human immunodeficiency vírus. **Clinical Infectious Diseases** v. 18, n. 1, p. 14 24, 1994.

GONÇALVES, D. D. **Soroepidemiologia e variáveis ocupacionais e ambientais associadas à leptospirose, brucelose e toxoplasma em trabalhadores de frigorífico, 2005**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade do Estado de Londrina, Departamento de Sanidade Animal, Londrina, 2005.

GONÇALVES, R. G.; PALMEIRA, E. M. Suinocultura Brasileira. **Observatorio de La Economía Latinoamericana**, [S.I.], n. 71, dic., 2006.

GUIDA, V. O. Sobre a presença de leptospira em suínos no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.18, p.285-287, 1948.

GUIDA, V. O. et al. Leptospirose suína provocada pela *L. canicola* em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.26, p.49-54, 1959.

HARTLEY, W. J.; MUNDAY, B. L. *Felidae* in the dissemination of toxoplasmosis to man and other animals. **Australian Veterinary Journal**, 50:224-8, 1974.

HASHIMOTO, V. Y. et al. Associação entre as lesões renais microscópicas e a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp em suínos aparentemente saudáveis, abatidos em frigorífico da região norte do estado do Paraná. **Seminário, Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 875-880, 2008.

_____. Prevalência de anticorpos contra *Leptospira ssp.* em bovinos, caninos, eqüinos, ovinos e suínos no município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.521-524, 2010.

HIDALGO, L. J.; HIDALGO, R. R. Leptospirosis em el ganado y matarifes de Tumbes, Peru. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.68, n.4, p.297-305, 1970.

HILL, D. E. et al. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, p. 41-61, 2005.

_____. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1-2, p.9-17, 2006.

HUGH-JONES, M. E. et al. Prevalence of *T. gondii* antibodies in Southern Louisiana swine in 1980 and 1981. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 1050-1051, 1986.

JHONSON, D. W. Leptospirosis in Australia. In: PACIFIC SCIENCE CONGRESS, 4., 1939, Sydney, Australia. **Proceedings**. Sydney: v.5, p. 33, 1939.

KOMPALIC-CRISTO, A. et al. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 229-235, 2005.

LANGONI, L. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. em suínos abatidos em três abatedouros dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. **Arquivos Instituto Biológico São Paulo**, v.74, n.3, p.267-270, 2007.

LAPPIN, M. R. Feline Zoonotic Diseases. In: The Veterinary Clinics Of North América: **Small Animal Practice**. v. 23, n. 1, Saunders Company, January, p. 55-77, 1994.

LARSSON, C. D. Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose – reações utilizadas e representação clínica. **Cães e Gatos**, Porto Feliz, Jan/Fev, p. 5-11, 1989.

LAUAR, N. M. Toxoplasmose. In: GONÇALVES, C. A. et al. **Zoonoses**. Campinas: CATI, 1995. p: 107-113. (Manual, 31).

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Veterinary**, v.14, p.296-326, 2001.

LIMA, E. S. **Diagnóstico sorológico de Doenças Infeciosas causadoras de falhas reprodutivas em suínos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2010.

LUFTZ, B. J. et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. **Journal of American Medicine Association**, v.252, p.913-917, 1984.

LYNFIELD R., GUERINA N. G. Toxoplasmosis. **Pediatrics Review**; 18(3):75-83, 1997.

MAILLOUX, M.; Leptospiroses = Zoonoses. International **Journal of Zoonoses**, v.78, n. 12, p. 1158-1159, 2001.

MARTINS, C. S. ; VIANA, J. A. Toxoplasmose - o que todo profissional da saúde deve saber - Revisão. **Clínica Veterinária**, n. 15, Jul/Ago, p. 33-37, 1998.

MASSAR, A. N. Políticas de Desenvolvimento da Suinocultura Brasileira - Mercado Mundial de carne suína: a perspectiva brasileira: **Seminário**, Brasília, ICONE, 2006.

MELAMED J. et al. Epidemiology of ocular toxoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil. In: Dernouchamps JP, Verougstraete L, Caspers- Velu L, Tassingnon MJ, eds. Recent advances in uveites. Brussels: **Proceedings of the Third International Symposium on Uveitis**, pp. 211–214, 1992.

MÉRIEN, F.; ARTHARID, A. B. Leptospirosis a zoonotic under monitoring in New Caledonia and in the Pacific. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 200, n.374, p.45-50, 2005.

MEYER, F.; SOBESTIANSKY, J. Biossegurança, aspectos relacionados na transmissão de doenças. In: VII Simpósio Goiano de avicultura e II Simpósio Goiano de Suinocultura – AVESUI, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Gessulli, p.27-31, 2005.

MILLAR, P. R. et al. *Toxoplasma gondii*: estudo soro-epidemiológico de suínos da região Sudoeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol.28 n.1, 2008.

MIRAGLIA, F. et al. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. [online]. 2008, vol.39, n.3

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

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10a. Ed. São Paulo, Atheneu, 2000, p. 428.

NICOLLE C., MANCEAUX L. 1908. **Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi**. C R Acad Sci 147: 736.

NORSWORTHY, G. D. Toxoplasmosis. In: NORSWORTHY, G.D. et al. **The Feline Patient**, Williams ; Wilkins, p. 432-434, 1998.

OLIVEIRA, K. R. et al. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de suínos criados sob condições rústicas na microrregião de Registro – SP, pelo método de aglutinação direta (MAD). **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 2, p. 169-175, 2007.

OLIVEIRA, S. J. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? **Hora Veterinária**, v. 19, n. 111, p. 87-90, 1999.

OLIVEIRA S. J., PIRES NETO J. A. S. Aspectos etiológicos e de diagnóstico nas leptospiroses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 33, p. 36-46, 2004.

OLIVEIRA, S. J.; NETO, J. S. P.; Leptospirose em suínos. **Revista de Suinocultura industrial**, n.3, ed. 204, p. 18 a 25, 2007.

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

PEREIRA I. C. **Soroprevalência de anticorpo para 20. *Toxoplasma gondii* em suínos e características epidemiológicas de estabelecimentos de criação industrial e artesanal da região de Pelotas-RS**. Tese - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

PEREIRA, J. A. **Soroprevalência da Infecção por *Leptospira spp.* em matrizes suínas oriundas do Médio Norte do Estado de Mato Grosso, Brasil, 2009**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Sanidade Animal, Cuiabá, 2009.

PERRY, G.; HEARDY, R. **A Scientific Review of Leptospirosis and implications for quarentene policy**. Austrália: Editora Canberra, 2000. p. 115.

PEZERICO, G. B. et al. Ocorrência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii e anti-Leptospira spp. Em suínos abatidos em três abatedouros dos estados de Minas Gerais e São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.3, p.267-270, jul./set., 2007.

PRICKETT, M. D. et. al. Correlation of tissue infection and findings in pigs fed Toxoplasma gondii oocysts.. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n. 5, p. 1130-1132, 1985.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. São Paulo: ArtMed, 2005. p.179-183.

RAMOS, A. C. F.; LILENBAUM, W. Fatores que influenciam na ocorrência de aglutininas anti-Leptospira em suínos de criação tecnificada do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 20-29, 2002.

RENTKO, V. T. et al. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. **Journal Veterinary International Medical**, v.6, p.235-244, 1992.

RICHOMME C. et al. Genetic 76. characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. **Veterinary Parasitology**, p. 164: 296-300, 2009.

ROPPA, L. O vice-versa da criação de suínos. **Revista Globo Rural**, Ano 14, n. 165, julho, p. 46-50, 2002.

ROSAL C. et al. Comparação das técnicas de imuno-histoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, n.1, p.13-17, 2001.

SANTOS, C. B. A. et al. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.131, n. 3-4, p. 207-211, 2005.

SARAZÁ, M. L.; S ÁNCHEZ-VAZCAÍNO, J. M. Mecanismo de infeccion de las enfermedades animales. **Porcine**, n. 68, p.13-26, 2002.

SAWADOGO P. et al. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. **Veterinary Parasitology**, 130:89-92, 2005.

SHERDING, R. G. Toxoplasmose, Neosporose e Outras Infecções Protozoárias Multissistêmicas. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. (eds). **Manual Saunders Clínica de Pequenos animais**. São Paulo, Editora Roca, p.157- 162, 1998.

SHIMABUKURO, F. H. et. al. Searching of swine leptospiral carrier by microbial isolation and polymerase chain reaction in kidney samples from serologically positive and negative animals. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.40, n.4, p.243-253, 2003.

SILVA, J. M. L. Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 12, n. 1, p. 425-428, 1959.

SILVA A. V. et al. Ocorrência de 14. anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da região oeste do Paraná, Brasil. **Veterinária e Zootecnia** 2008; 15:263-6.

_____. *Toxoplasma gondii* em suínos com ênfase na contribuição brasileira. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, Porto Alegre, p. 120-130, 2010.

SOBESTIANSKY, J. Sistema Intensivo de Produção de Suínos – Programa de Biossegurança, Ed. Art 3, Goiânia, **Impressos especiais**, 2002.

_____. Doenças multifatoriais. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone, 2007. p. 127-141.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Doenças dos Suínos**. 1. ed. Goiânia: Cãnone, 2007. p.770.

SOTO, F. R. M. et al. Leptospirose suína: Uma Revisão. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 74, n. 4, p. 379-395, 2007.

SU, C. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal Parasitology**, 36, 841–848, 2006.

SUARÉZ-ARANDA F. et al. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Veterinary Parasitology**, v. 91, n. 1-2, p. 23-32, 2000.

SWANGO, L.J. et al. Infecções bacterianas, riquetsiais, protozoais e outras. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 296-298.

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

TSUTSUI V. S. et al. Soroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos no norte do Paraná. **Archives Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 27-34, 2003.

UGGLA, A. ***Toxoplasma gondii* in farm animals : some immunodiagnostic methods and their potential use**. Uppsala: Merkantil-Tryckeriet, 1986. p. 1-56.

URIBE ORREGO, A. et al. Leptospirosis en personas de riesgo de quince explotaciones porcinas y de la central de sacrificio de Manizales, Colômbia. **Archives Medicine Veterinary**, v. 35, n. 2, 2003.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1998. p. 273.

VALENÇA R. M. B. **Aspectos soropidemiológico das infecções por *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii* e *Chlamydomphila abortus* em suínos de granjas tecnificadas no Estado de Alagoas 2009**. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2009.

VASCONCELOS, L. M. et al. Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* em trabalhadores de cidade de Londrina- Paraná, Brasil. **Revista Latino-Americana Microbiológica**, v. 35, p. 153-157, 1993.

VIDOTTO, O. et al. Estudos Epidemiológicos da Toxoplasmose em suínos da região de Londrina-PR. **Seminário**, Londrina, v. 11, n. 1, p. 53-59, 1990.

4.1 ARTIGO

PESQUISA DE *Toxoplasma gondii* EM SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

(Formatado para ser encaminhado ao periódico The Journal of Parasitology)

RUNNING HEAD: FERNANDES ET AL. - PESQUISA DE *Toxoplasma gondii* Suínos
**PESQUISA DE *Toxoplasma gondii* EM SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

Erika F. T. S. Fernandes, XXXXXXX, XXXXXXXXX, XXXXXXXXXXXXX, Rinaldo A. Mota* Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n- Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil.

RESUMO: Objetivou-se com este estudo pesquisar anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e DNA parasitário em suínos abatidos na região Agreste do Estado de Pernambuco. Foram colhidas 305 amostras de sangue de suínos provenientes de 11 municípios e os soros foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, adotando-se ponto de corte de 1:64. Nos animais positivos na RIFI foram utilizadas as técnicas da PCR e PCR-*nested* para detectar o DNA do *T. gondii* em fragmentos de coração. Para a PCR e PCR-*nested* foram utilizados iniciadores derivados do gene B1. No exame sorológico observou-se 38/305 (12,46%) amostras positivas e 267/305 (87,54%) negativas, distribuídas nos 11 municípios estudados. Na prova molecular, 21/38 (55,26%) amostras foram positivas. Registra-se a primeira ocorrência da detecção de DNA do *T. gondii* em tecidos de suínos sorologicamente positivos no Estado de Pernambuco, Brasil. Esses resultados indicam que os suínos abatidos no Estado foram expostos à infecção por *T. gondii*. Portanto, deve-se realizar medidas estratégicas e integradas para prevenir e controlar a infecção nesta espécie e alertar os consumidores de carnes e vísceras dessa espécie animal quanto aos riscos de infecção.

SEARCH IN TOXOPLASMA GONDII

PIGS SLAUGHTERED IN THE REGION OF PERNAMBUCO STATE AGRESTE

ABSTRACT: The objective of this research study anti-*Toxoplasma gondii* and the parasite DNA for the parasite in pigs slaughtered in Agreste region of Pernambuco State. We collected blood samples from 305 pigs from 11 municipalities and sera underwent Immunofluorescence Assay (IFA) for detection of anti-*T. gondii*, by adopting a cutoff of 1:64. In animals positive in the IFAT were used the techniques of PCR and nested-PCR to detect the DNA of *T. gondii* in fragments of heart. For PCR and PCR-nested primers used were derived from the B1 gene. In serological tests was observed 38/305 (12.46%) positive samples and 267/305 (87.54%) negative, distributed in 11 counties. In PCR, 21/38 (55.26%)

samples were positive. The results of this study awaken to the risk of pork to infection by *T. gondii* to humans and the need for implementation of surveillance programs in this region.

* Autor para correspondência: Tel.:+55 81 33206425; fax: +55 81 3320 6400. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

A toxoplasmose é uma das parasitoses mais comuns em seres humanos e animais, sendo colocada entre as três maiores enfermidades de propagação global (Darabus et al., 2006).

Em suínos, a infecção ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminada com oocistos esporulados, por cistos contidos em tecidos de animais infectados, como roedores, aves e outros suínos ou de forma congênita (Dubey e Beattie, 1988; Dubey et al, 1995, Tenter et al., 2000).

O consumo de carne suídea exerce um papel importante na transmissão do agente, visto que os humanos podem se infectar por ingestão da carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais do *T. gondii* (Garcia et al., 1999). Estes cistos na carne de suínos podem persistir por mais de dois anos e não são identificados na inspeção *pos mortem* (Chitimia et al., 2007).

Os suínos domésticos são considerados uma importante fonte de infecção para humanos em diversos países (Dubey e Beattie, 1988;. Tenter et al, 2000; Dubey, 2009). A prevalência da infecção por *T. gondii* em suínos foi relatada em muitos países, indicando um quadro de exposição elevado (Hejlícek et al., 1997; Suárez-Aranda et al., 2000; Ortega e Saavedra, 2004; Damriyasa et al., 2004; Klun et al., 2006; Huong; Dubey, 2007; Giessen et al., 2007; Correa et al., 2008; Dubey e Jones, 2008; Gebreyes et al., 2008; Poljak et al., 2008).

Os estudos de prevalência da infecção por *T. gondii* na espécie suína têm grande relevância por ser esta espécie considerada uma das principais fontes de infecção para a espécie humana, especialmente pela ingestão de carne mal cozida. Estes estudos servem para avaliar, além da ocorrência desta infecção, o risco a que estão expostos os humanos que ingerem carne em uma determinada região (Fialho e Fialho, 2003).

No Estado de Pernambuco não se conhece a situação sanitária da carne suína consumida quanto à infecção por *T. gondii*. Dessa forma, objetivou-se com esse estudo avaliar a ocorrência da infecção por meio da detecção de anticorpos e do DNA parasitário em suínos abatidos na região Agreste do Estado de Pernambuco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas amostras de sangue de 305 suínos de ambos os sexos e idades variadas, abatidos em abatedouros de onze municípios no Estado de Pernambuco, região nordeste do Brasil. As amostras de sangue foram colhidas no momento da sangria dos animais em tubos descartáveis e transportadas ao Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Após a obtenção do soro, as amostras foram transferidas para frascos estéreis, identificadas e armazenadas a -20°C até o momento das análises.

Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* foi utilizada a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de acordo com Camargo (1974), utilizando-se diluições sequenciais na base dois até 1024, sendo considerados positivos, os títulos maiores ou iguais a 64. Como antígeno foi utilizado a cepa RH constituída por taquizoítos, além de controles positivos e negativos para a reação.

Para a detecção do DNA do *T. gondii* foram utilizadas amostras de músculo cardíaco, utilizando-se a técnica de PCR seguida da PCR-*nested* (Spalding et al., 2006). Essa técnica foi realizada nas amostras positivas na sorologia.

As amostras de músculo cardíaco dos animais positivos na sorologia foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial “Máster Mix Kit” (Promega®, Madison, Wisconsin, EUA), utilizando-se o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel de agarose a 0,8% com marcador de peso molecular 100pb, corado com brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado para verificação de sua qualidade.

Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico, 10µM de cada iniciador, 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foi feita em termociclador MJ-96G (Biocycle Co. Ltd, Hangzhou - China) e seguido de acordo com o protocolo descrito em Spalding et al. (2006). Todas as amostras negativas e controles foram submetidos à PCR-*nested*, utilizando 1µL do produto da PCR simples e adicionado à mistura de reação em um volume final de 12,5µL contendo 10µM de cada iniciador, 4,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix de acordo com o protocolo do fornecedor. O ciclo das reações consistiu de uma desnaturação do DNA inicial a 95°C (4minutos) e seguida de 35

ciclos a 95°C por 1 minuto para a desnaturação, 62°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e um período de extensão final de 10 minutos a 72°C

Os pares de iniciadores utilizados são fragmentos da sequência do gene *BI*. Para a primeira amplificação foram utilizados TOXO-C1/TOXO-N1, amplificado em 197pb. E para a segunda amplificação foram utilizados TOXO-C2/TOXO-N2, amplificado em 97pb (Burg et al., 1989, Spalding et al., 2006).

O controle positivo foi feito utilizando-se suspensão de lavados intra-peritoneal de camundongos previamente infectados com taquizoítos da cepa RH na concentração 104taquizoítos/mL para posterior extração do DNA parasitário. Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. Para confirmação da identidade dos fragmentos amplificados foi utilizado o sequenciamento de DNA. Os fragmentos de DNA analisados apresentaram valores de similaridade e identidade com as sequências já existentes no GenBank que variaram de 93 a 99% com $E = 1e - 100$.

Medidas para evitar contaminação entre amostras foram seguidas conforme recomendações de Kwok (1990) desde a colheita das amostras até a obtenção dos resultados.

Para análise dos dados, utilizou-se a dispersão das frequências absoluta e relativa (Sampaio, 1998). A caracterização da significância entre as diferenças observadas nas frequências de animais soro-reagentes segundo as variáveis estudadas (sexo, idade, problemas reprodutivos) foi determinada através do teste qui-quadrado (χ^2) de Pearson, ou Exato de Fisher, quando necessário (Zar, 1999). O nível de significância adotado foi de 5%.

3 RESULTADOS

Na sorologia, observou-se que 38/305 (12,46%) amostras foram positivas e 267/305 (87,54%) negativas. Na tabela 1 observa-se a distribuição das frequências de animais positivos por município. Das 38 amostras positivas na sorologia, onze (28,94%) apresentaram título 64; onze (28,94%) título 128; oito (21,05%) títulos 256, sete (18,42%) título de 512 e uma amostra (2,63%) apresentou título de 1024. Não houve diferença estatística significativa em relação à sorologia e as variáveis estudadas, sexo, idade e problemas reprodutivos. Encontrou-se os seguintes valores, sexo ($P = 0,371$), idade ($P = 0,111$) e problemas reprodutivos ($P = 0,164$). No resultado da PCR simples, observou-se amplificação do DNA do *T. gondii* em 6/38 (15,78%) amostras positivas na sorologia e 32/38 (84,21%) foram negativas. Já na PCR-

nested observou-se a amplificação do DNA em 15/38 (39,47%) e 23/38 (60,53%) foram negativas.

Tabela 1 – Distribuição das frequências de suínos positivos na RIFI por município abatidos na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil, 2011.

Municípios	Nº de animais positivos	Frequências
Gravatá	5	13,16%
Belo Jardim	6	15,80%
Pesqueira	1	2,63%
Lajedo	2	5,26%
Cachoeirinha	5	15,16%
Jataúba	6	15,80%
Brejo da Madre de Deus	1	2,63%
Caruaru	11	28,95%
Bezerros	1	2,63%
Total	38	100%

4 DISCUSSÃO

A frequência de anticorpos anti-*T. gondii* para os suínos observada nesse estudo foi inferior à verificada em abatedouros de outros países e também de outros trabalhos realizados anteriormente no Brasil. Suárez-Aranda et al. (2000) observaram positividade de 32,3% e Ortega e Saavedra (2004) 27,7% para animais abatidos no Peru.

Já no Estado Rio Grande do Sul, Brasil, Fialho e Araújo (2003) verificaram positividade em 33,75% dos animais provenientes de abatedouros de Porto Alegre. Ainda na região Sul, Millar et al. (2008) encontraram uma frequência de 25,50% em suínos abatidos para o consumo humano no Estado do Paraná.

Essas diferenças podem ser explicadas em parte pelo ponto de corte adotado em alguns estudos (≥ 16) diferente daquele utilizado nesse estudo que foi ≥ 64 . Outra possibilidade é o tipo de manejo adotado nos diferentes sistemas de criação de suínos utilizados em diferentes Estados do Brasil, o que possibilitaria o contato dos suínos com as fontes de infecção.

Deve-se ainda atentar para a idade dos animais abatidos. Nesse estudo os suínos amostrados eram de idades variadas o que também pode influenciar a prevalência da infecção como discutido anteriormente por Dubey et al. (1995) que relataram que a prevalência da toxoplasmose suína aumenta proporcionalmente de acordo com a faixa etária. Arko – Mansah et al. (2000) também verificaram aumento na frequência de suínos positivos de acordo com o avanço da idade (11% em suínos de 1 a 5 meses de idade; 36,4% em animais de 6 a 12 meses e 48,1% naqueles com mais de 12 meses).

Neste estudo, observou-se a amplificação do DNA do *T. gondii* em amostras de coração de suínos soropositivos na RIFI. Desses animais, 21 (55,26%) foram positivos na PCR para detecção do DNA do *Toxoplasma gondii*. O percentual da presença do DNA desse parasito nesse órgão é um achado relevante, pois levanta a discussão sobre a possibilidade de uma proporção significativa de carne comercializada na região estudada estar infectada, representando assim um risco potencial à Saúde Pública, principalmente se a carne for consumida na forma *in natura* ou má cozida (Millar et al., 2008). Nesse estudo não foi possível coletar amostras de outros tecidos para a realização da PCR, mas os resultados obtidos para amostras do coração já são importantes, pois nessa região, as pessoas têm o hábito de consumir esse órgão sem atentar para os riscos da infecção.

A maior positividade observada na PCR-*nested* pode ser explicada pelo fato dessa técnica utilizar duas amplificações sucessivas da primeira amplificação do DNA-molde, conferindo assim uma melhoria na especificidade e sensibilidade da técnica (Martins et al., 2000). Alguns autores relataram o aumento da sensibilidade e especificidade da técnica com a utilização de dois pares de primers para o PCR e PCR-*nested* uma vez que o PCR-*nested* é capaz de detectar apenas 1 taquizoítos/mL (Spalding et al., 2002).

Alguns estudos sobre a presença do DNA do *T. gondii* em tecidos suínos foram realizados anteriormente no Brasil e no Japão. Da Silva et al. (2005) relataram a presença do DNA do *T. gondii* através da PCR em 19 das 70 salsichas analisadas em 55 estabelecimentos em São Paulo. Belfort Neto et al. (2007) também encontraram em 34% das amostras de diafragmas e 66% de línguas de suínos provenientes de matadouros de Erechim no Rio Grande do Sul, Brasil. Zakimi et al. (2006) relataram que 57 de 101 amostras de linfonodos de um abatedouro de suínos na ilha de Okinawa, Japão, continha DNA do *T. gondii*, demonstrando que há uma elevada prevalência de *T. gondii* em tecidos linfóides de suínos infectados cronicamente.

Questões de segurança alimentar são cada vez mais preocupantes para os produtores, agências reguladoras e consumidores. Carnes e subprodutos da carne suína preparados de forma inadequada têm sido implicados nas infecções por *T. gondii* em humanos (Hill et al., 2004). Há décadas existem estudos sobre a influência das especiarias no processo de cura da carne de suínos e a possível viabilidade dos cistos teciduais deste parasito.

Na região estudada se consome as vísceras de suínos em pratos regionais, sem aditivo algum, hábito que pode se transformar em uma via de transmissão importante para referida região, não só para os indivíduos que ingerem, mas também para aqueles que estão envolvidos com a sua preparação. Além da carne *in natura*, embutidos crus elaborados com a carne suína podem veicular o *T. gondii* para seres humanos (Millar et al., 2008). Segundo Dubey (1986), estes produtos são responsáveis por 50% a 75% de todos os casos de toxoplasmose humana nos Estados Unidos. No Brasil não são disponibilizados dados oficiais sobre a participação das vísceras e embutidos na veiculação desse parasito.

Registra-se a primeira ocorrência da detecção de DNA do *T. gondii* em tecidos de suínos sorologicamente positivos no Estado de Pernambuco, Brasil. Esses resultados indicam que os suínos abatidos na Microrregião do Vale do Ipojuca foram expostos à infecção por *T. gondii*. Portanto, deve-se realizar medidas estratégicas e integradas para prevenir e controlar a infecção nesta espécie e alertar os consumidores de carnes e vísceras dessa espécie animal quanto aos riscos de infecção.

AGRADECIMENTOS - A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no período do estudo.

LITERATURA CITADA

Arko-Mansah; Bosompem, K. M.; Canacoo, E. A.; Wastling, J. M.; Akanmori, B. D. 2000. The seroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana. *Acta Tropica*, Basel. **76**: 27-31.

Aspinall, T.V., D. Hyde Marlee, J.E., e Sims, P.F. 2002. Prevalência de *Toxoplasma gondii* em produtos cárneos comerciais: monitorada por polymerase chain reaction alimento para o pensamento? *International Journal of Veterinary Medicine* **32**: 1193-1199.

Belfort Neto, R. V., Nussenblatt, L., Rizzo, C., Muccioli C., Silveira, R., Nussenblatt, A., Khan L. D., Sibley, R., Belfort, N. 2007. A alta prevalência de genótipos incomuns de infecção pelo *Toxoplasma* em amostras de carne de porco carne de Erechim, RS, Brasil. *Uma. Acad. Bras. Cienc.* **79**:111-114.

Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P., Boothoyd, J. C. 1989. Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan. *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**:1787-1792.

Camargo M. E. 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras Patol Clin*; **10**:143-71.

Chitimia, L., Cosoroaba, I., Cozma, V. Toxoplasmoza. 2007. Prevenirea transmiterii la om prin alimente de origine alimentara, *Revista de Medicina Veterinária* **3**: 11-30.

Correa, R., Cedeño, I., de Escobar, C., and Fuentes, I. 2008. Increased urban seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama. *Veterinary Parasitology*, **153**, 9–11.

Damriyasa, I.M. 2004. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. *Veterinary Parasitology*, **126** : 271–286.

Darabus, G.H., Oprescu I., Morariu S., Mederle N. 2006. *Parazitologie si boli parazitare*: Ed. Mirton Timisoara.

Dias, R. A. F. 2005. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, **47**:185-189

Dubey, J.P., and Jones, J.L. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, **38**, 1257–1278.

Dubey, J. P. 2009. Toxoplasmosis in pigs - The last 20 years. *Veterinary Parasitology*, **164**:89-103.

Dubey, J. P.; Weigel, M. R.; Siegel, A. M.; Thulliez, P.; Kitron, U. D.; Mitchell, M. A.; Mannelli, A.; Mateus-Pinilla, N. E.; Shen, S. K.; Kwok, O. C.; Todd, K. S. 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *Journal of Parasitology*, Lawrence, **81** : 723-729.

Dubey, J. P.; Beattie C. 1988. *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Boca Raton, Florida. USA. 220.

Dubey, J. P. 2007. *Toxoplasma gondii* in low a sows: Comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* bioassays in mice and cats. *Journal Parasitology*, **81**:48-53.

Dubey, J. P. 1986. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J. Am. Vet. Assoc.*, **188**: 1035-1037.

Fialho, C. G., Araufo, F. A. P. 2003. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre- RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, **33**: 893- 897.

Garcia, J. L. 1999. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos,bovinos, ovinos, e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. *Ciência Rural*, **29**: 91-97.

Garcia, J. L., Gennari, S. M., Navarro, I. T., Machado, R. Z., Senhorini, I. L. 2004. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into Iscom. *Experimental Parasitology*, San Diego, **108**: 40-46.

Garcia, J. L., Gennari, S. M., Machado, R. Z., Navarro T. I. 2006. *Toxoplasma gondii*: detecção por bioensaio, histopatologia e reação em cadeia da polimerase em tecidos de suínos infectados experimentalmente. *Exp. Parasitol.* **113**:267-271.

Gebreyes, W.A., Bahnson, P.B., Funk, J.A., McKean, J., and Patchanee, P. 2008. Seroprevalence of *Trichinella*, *Toxoplasma*, and *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional swine production systems. *Foodborne Pathogens and Disease*, **5**: 199–203.

Giessen, J. 2007. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*, **148**: 371-374.

Hejlícek, K. 1997. Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases*, **33**: 480-485.

Hill, D. E., Sreekumar, C., Gamble, H. R., Dubey, J. P. 2004. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *Journal of Food Protection* **67**: 2230-2233.

Klun, I. 2006. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, **135**: 121-131.

Kwok, S., 1990. Procedures to minimize PCR-product carry-over. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. San Diego: Academic Press, 482.

Jauregui, L. H., Higgins, J., Zarlenga, D., Dubey, J. P., Lunney, J. K. 2001. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol*, **39**: 2065-2071.

Joseph, P., Calderon, M. M., Gilman, R. H., Quispe, M.L., Cok, J., Ticona, E., Chavez, V., Jimenez, J. A., Chang, M. C., Lopez, M. J., Evans, C. A. 2002. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol*, **40**: 4499-4503.

Lam, T. T. H., Dubey, J. P. 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Pigs From Vietnam. *Journal of Parasitology*: **93**: 951-952.

Martins, L. C.; Paschoal, I. A.; Nowakowski, A. V.; Silva, S. A. B.; Costa, F. F.; Ward, L.S. 2000. Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **33**: 253-257.

Mendonça, A. O. 2004. Detection of *Toxoplasma gondii* in swine sausages. *Parasitologia Latinoamericana*, **59**:42-45.

- Millar, P. R. 2008. *Toxoplasma gondii*: estudo soro-epidemiológico de suínos da região sudoeste do estado do Paraná. Pesquisa Veterinária Brasileira, **28**: 15-18.
- Ortega, R. Y., Saavedra, G. M. 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine from slaughterhouses in Lima, Peru, and Georgia, U.S.A. pigs Journal of Parasitology, Lawrence, **90**:902-904.
- Poljak, Z., Dewey, C.E., Friendship, R.M., Martin, S.W., Christensen, J., Ojkic, D., Wu, J., and Chow, E. 2008. Pig and herd level prevalence of *Toxoplasma gondii* in Ontario finisher pigs in 2001, 2003, and 2004. Canadian Journal of Veterinary Research, **72**: 303–310.
- Richomme C., Aubert, D., Gilot-Fromont E. 2009. Genetic 76. characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. Vet Parasitol. **164**:296-300.
- Silva, D. A. O. 2005. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). Journal of Parasitology, **91**: 1212-1216.
- Spalding, S. M. Toxoplasmose. In: Rossetti, M. L. 2006. Doenças infecciosas: diagnóstico molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 102-111.
- Suaréz-Aranda, F. 2000. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. Veterinary Parasitology, Amsterdam, **91**: 23-32.
- Tenter, A. M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal for Parasitology, **30**: 1217–1258.
- Thrusfield, M. 2004. Epidemiología Veterinaria Acribia. Zaragoza-España. 339.
- Tsutsui, V. S., Freire, R. L., Garcia, J. L. 2007. Detection of 92. *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. Arq Bras Med Vet Zootec., **51**:30-4.

Venkatachalam, R., Zimmerman, W. J. 1976. Viability of *Toxoplasma gondii* in relation to processing of meat. J Anim Sci. **42**:1346.

Yai, L. E. O.i; Vianna, M. C. B., Soares R. M., Cortez, A., Freire R. L., Richtzenhain, L J, Gennari S.M. 2003. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 40: 227-234.

Zakimi S., Kyan H., Oshiro, M. 2006. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. J Vet Med Sci. **68**:1105-7.

4.2 ARTIGO

ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp. EM SUÍNOS ABATIDOS NO AGRESTE DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

(Formatado para ser encaminhado a Revista Pesquisa Veterinário Brasileira)

Anticorpos Anti-*Leptospira* spp. em suínos abatidos no Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil.

Erika Fernanda Torres Samico Fernandes¹, Mabel Hanna Vance-Harrop²; Vânia Lúcia de Assis Santana²; Pedro Paulo Feitosa de Albuquerque¹; Marcela Fernanda Torres Samico Fernandes¹; André de Souza Santos¹; Orestes Luiz de Souza Neto¹; Rinaldo Aparecido Mota¹.

ABSTRACT - Fernandes, E.F.T.S.¹, Vance-Harrop, M.H.²; Santana, V.L.A.²; Albuquerque, P.P.F.¹; Samico, M.F.T.F.¹; Santos, A.S.¹; Souza-Neto, O.L.¹; Mota, R.A.¹. 2011. [**Antibodies, *Leptospira* spp. in pigs slaughtered in the region of Pernambuco State Agreste**]. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros s/n Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

The objective of this research study anti-*Leptospira* spp. in pigs slaughtered in the region of Pernambuco State Agreste. We collected blood samples from 305 pigs from 11 municipalities and the sera were submitted by the microscopic agglutination test (MAT) for detection of anti-*Leptospira* spp. Were considered positive for titers ≥ 100 . In serological tests was observed 78/305 (25.57%) positive samples and 227/305 (74.42%) negative, distributed in 11 municipalities. The most frequent serovars were *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Djasiman* and with frequencies of 55.13%, 17.95% and 6.41% respectively. We concluded that the pigs were exposed to *Leptospira* spp. and the results will arise for the risk of infection to workers from the abattoir, emphasizing the need for implementation of surveillance programs in this region.

INDEX TERMS: Leptospirosis, slaughterhouses, pigs, serology

Recebido em

Aceito para publicação em

1 Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-900. Recife – PE, Brasil. *Autor para correspondência: rinaldo.mota@hotmail.com – Fone: 81 3320.6425; Fax: 81 3320.6400

2. Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO), setor de Bacteriologia, Rua D Manoel Medeiros Recife - PE, 52171-030.

RESUMO: Objetivou-se com este estudo pesquisar anticorpos anti-*Leptospira* spp. em suínos abatidos na região Agreste do Estado de Pernambuco. Foram colhidas 305 amostras de sangue de suínos provenientes de 11 municípios e os soros foram submetidos à Soroaglutinação Microscópica (SAM) para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram título ≥ 100 . No exame sorológico observou-se 78/305 (25,57%) amostras positivas e 227/305 (74,42%) negativas, distribuídas nos 11 municípios estudados. Os sorovares mais frequentes foram *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni* e *Djasiman* com frequências de 55,13%, 17,95% e 6,41%, respectivamente. Conclui-se que os suínos estudados foram expostos à infecção por *Leptospira* spp. e os resultados obtidos despertam para o risco da infecção para os trabalhadores dos abatedouros, ressaltando-se ainda a necessidade de implantação de programas de vigilância na região estudada.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leptospirose, abatedouros, suínos, sorologia

INTRODUÇÃO

Os índices de produção e produtividade de granjas de suínos podem ser influenciados por vários fatores, como genéticos, ambientais, nutricionais e infecciosos, entre outros (Scheifer 2009). Entre as doenças infecciosas, a leptospirose ocupa um papel de destaque por causar transtornos reprodutivos, febre, nascimento de leitões fracos, icterícia, hemoglobinúria, sintomas nervosos e gastrintestinais (Oliveira et al. 2007).

Embora possam causar lesões em vários órgãos, localizam-se preferencialmente nos rins, onde se multiplicam e são eliminadas na urina, assumindo aí uma grande importância na saúde pública, pois é considerada como uma doença ocupacional.

Apesar da leptospirose em suínos ser reconhecida mundialmente pelos transtornos na esfera reprodutiva (Oliveira 1994), estes animais quando infectados durante a fase de terminação são considerados como portadores sãos, e quando abatidos passam despercebidos pelo Serviço de Inspeção Veterinária (Ellis 1999).

No Brasil, investigações sorológicas para detecção de infecção por leptospirosas em suínos abatidos para o consumo humano foram realizados por Delbem et al. (2002); Hashimoto et al. (2008); Azevedo et al. (2008), sendo relatadas as seguintes frequências de anticorpos anti-*Leptospira* spp. 66,67%, 14,58%, 33,60%, respectivamente. O isolamento da

bactéria foi realizado por Shimabucuro et al. (2003) com o objetivo de demonstrar o papel dos suínos como reservatório, onde os autores isolaram das 88 amostras renais cultivadas em meio de EMJH, uma amostra positiva, sendo esta proveniente de animal sorologicamente positivo na prova de SAM.

Considerando a falta de informações epidemiológicas sobre a infecção por leptospiros em suínos no Estado de Pernambuco, objetivou-se com esse trabalho estudar a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em animais abatidos no Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas 305 amostras de sangue de suínos de ambos os sexos, idades variadas, sem histórico de vacinação, oriundos de granjas não tecnificadas e provenientes de 11 municípios localizados na região Agreste do Estado de Pernambuco, no período de julho a outubro de 2009.

O tamanho da amostra foi determinado considerando-se uma prevalência esperada para infecção por *Leptospira* spp. de 33,6% (Azevedo et al. 2008), com nível de confiança de 95% e erro estatístico de 5% (Thrusfield 2004).

As amostras de sangue foram obtidas no momento da sangria na linha de matança, em tubos descartáveis. Após a obtenção do soro, as amostras foram transferidas para frascos estéreis identificados e encaminhadas sob refrigeração ao setor de Bacteriologia do Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO).

Para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi utilizada a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) de acordo com o Ministério da Saúde (1995), utilizando-se os seguintes sorovares: *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Javanica*, *Canicola*, *Castellonis*, *Pyrogenes*, *Cynopteri*, *Autumnalis*, *Sentot*, *Djasiman*, *Australis*, *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Wolffi*, *Sejroe*, *Saxkoebing*, *Bataviae*, *Tarassovi*, *Panama*, *Patoc*, *Andamana*, *Celledoni*, *Shermani*, *Brastilava*, *Hardjo*. Foram considerados positivos os soros com títulos iguais ou superiores a 100.

Para análise dos dados, utilizou-se a dispersão das frequências absoluta e relativa (Sampaio 1998). A caracterização da significância entre as diferenças observadas nas frequências de animais soro-reagentes segundo as variáveis estudadas (sexo, idade, problemas

reprodutivos) foi determinada através do teste qui-quadrado (χ^2) de Pearson, ou Exato de Fisher, quando necessário (Zar 1999). O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Neste estudo pioneiro realizado no Estado de Pernambuco, envolvendo a infecção por *Leptospira* spp. em suínos em matadouros, observou-se que 78/305 (25,57%) das amostras foram positivas e 227/305 (74,42%) negativas. A frequência de animais positivos de acordo com o sexo foi de 38/305 (12,45%) para fêmeas e 40/305 (13,11%) para machos. Não houve diferença estatística significativa em relação à sorologia e as variáveis estudadas, sexo ($P = 0,525$), idade ($P = 0,241$).

Na tabela 1 observa-se a distribuição das frequências dos sorovares por município e nota-se que o mais frequente foi o *Icterohaemorrhagiae* com 55,13%.

DISCUSSÃO

Resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo foram obtidos em trabalhos realizados anteriormente em suínos em diferentes localidades no Brasil. Nos Estados do Paraná, Alagoas e Minas Gerais foram relatadas frequências de 79,16%, 98,16%, 65,71%, 41,80%, 67,10% de anticorpos para o sorovar *Icterohaemorrhagiae* nos suínos destinados ao abate e em matrizes em granjas tecnificadas (Delbem et al. 2002, Delbem et al. 2004, Hashimoto et al. 2008, Valença 2009, Osava et al. 2010).

O sorovar *Icterohaemorrhagiae* apresenta como principal reservatório os roedores sinatropicos, indicando a importância desses animais como prováveis fontes de infecção nas criações que fornecem suínos para os abatedouros na região estudada. Os suínos se infectam pelo contato com a urina de animais com leptospirose ou com ambiente e alimentos contaminados. Nesse sentido, o rato (*Rattus rattus*) ocupa uma posição de importância na cadeia de transmissão, principalmente para o sorovar *Icterohaemorrhagiae*. (Shimabucuro et al. 2003).

Valença (2009) em estudo sobre fatores de riscos associados à infecção por *Leptospira* spp. em granjas no Estado de Alagoas constataram a falta do controle de roedores, sugerindo que esse fato foi a provável fonte de infecção por esse sorovar. Para Boqvist et al. (2002) as

granjas que não realizavam estratégias de controle de roedores apresentaram 7,8 vezes mais chances de ocorrência de infecção dos animais.

Nos suínos, os sorovares mais frequentes em infecções causadas por *Leptospira* spp. são: *Pomona*, *Tarassovi*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Bratislava*, *Gryppotyphosa* (Sobestiansky et al. 1999) e a distribuição destes sorovares varia de acordo com o país e até mesmo em regiões dentro de um mesmo país (Michina & Campbell 1969, Faine et al. 1999, Pereira 2009).

Apesar dos sorovares *Pomona*, *Bratislava* e *Tarassovi* serem considerados adaptados aos suínos (Azevedo et al. 2008) não foi observada evidência sorológica desses sorovares nesse estudo. O *Pomona* foi identificado em estudos anteriores realizados no Brasil (Larsson 1984, Faria 1989, Oliveira 1998) e é considerado ainda na Austrália (Chappel et al. 1998) como o sorovar de maior importância em criações suinícolas. O mesmo pode ser observado em relação ao sorovar *Bratislava* também relatado no Brasil (LIMA 1996). A provável explicação para este fato pode ser a infecção acidental, pois os suínos deste estudo foram criados em sistema não tecnificado, podendo assim ter contato com outras espécies de animais que favorece a infecção pelos sorovares encontrados. Maiores detalhes a respeito do manejo sanitário, controle de roedores e acesso de outros animais não foram disponibilizados nesse estudo.

São pontuais os estudos que demonstram a importância do sorovar *Copenhageni* em suínos, embora esse sorovar tenha sido o de maior ocorrência em alguns desses trabalhos (Boqvist et al. 2002). O sorovar *Copenhageni* também tem como principais reservatórios os roedores sinatropicos (Heath & Johnson 1994), indicando a importância desses animais como prováveis fontes de infecção nas criações que fornecem suínos para os abatedouros da região estudada.

Os sorovares menos frequentes nesta pesquisa como o *Djasiman* também foi relatado anteriormente em suínos por Modolo et al. (2000). Em relação ao sorovar *Hebdomadis* pesquisas demonstraram sua maior importância para bovinos (Shimabucuro et al. 2003). Em suínos nesse estudo, provavelmente a infecção ocorreu de forma acidental, provavelmente pela existência de criações consorciadas com outras espécies, pois os suínos abatidos na referida região são provenientes de criatórios domiciliares.

Os suínos quando se infectam geralmente apresentam pouco ou nenhum sinal da doença, mas mantém a bactéria como portador renal, eliminando-a na urina de forma

intermitente e por longo período (Gonçalves et al. 2006). Nesse caso, as pessoas que trabalham nos matadouros podem se infectar com a urina e outras secreções.

Conclui-se que os suínos estudados foram expostos à infecção por *Leptospira* spp. e os resultados obtidos despertam para o risco da infecção para os trabalhadores dos matadouros, ressaltando-se ainda a necessidade de implantação de programas de vigilância na região estudada.

Agradecimentos: Ao Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO), setor de Bacteriologia pela realização da Soroaglutinação Microscópica.

REFERÊNCIAS

- Azevedo, S. S., Oliveira, R.M., Alves, C.J., Assis, D.M., Aquino, S.F., Farias, A.E.M., Assis, D.M., Lucena, T.C.C., Batista, C.S.A., Castro, V., Genovez, M.E.. Prevalence of Anti-*Leptospira* spp., 2008. Antibodies in swine slaughtered in the public slaughterhouse of Patos City, Paraíba State, Northeast Region of Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 75 (4): 517-520.
- Boqvist, S., Ho, T. V. T., Vågsholme, I., Magnusson, U. 2002. The impact of *Leptospira* seropositivity on reproductive performance in sows in southern Vietnam. *Theriogenology*, 58: 1327–1335.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 1995. Manual de Leptospirose. Brasília, 98p.
- Chappel, R.J., Ellis, W.A., Adler, B., Amon L., Millar, B.D., Zhu, S.S., Prime, R.W. 1992. Serological evidence for the presence of *Leptospira interrogans* serovar *bratislava* in Australian pigs. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, 69(5): 119-120.
- Chappel, R.J., Prime, R.W., Millar, B.D., Jones, R.T., Cutler, R.S., Adler, B. 1998. Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with *Leptospira interrogans* serovar *pomona* slaughtered in abattoir in Victoria, Vet. Microbiol, Austrália, 62(3): 235-242.
- Delbem, A. C. B., Freire, R. L. , Silva, C. A., Müller, E. E., Dias, R. A., Neto, J. S. F., Freitas, J. C. 2004. Fatores de risco associados à soropositividade para leptospirose em matrizes suínas. *Ciência Rural*, 34 (3), 847-852.

- Ellis, W. A. Leptospirosis. In: Disease of swine. 1999. Ames: The Iowa State University Press, 483-493.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. *Leptospira* and leptospirosis. Medical Science, Melbourne, 1999.
- Faria, J.E., Ribeiro, M.F.B., Santos, J.L., Patarroyo Salcedo, J.H., Dale, R. 1989. Frequência de aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de suínos das microrregiões de Viçosa e Ponte Nova – MG. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 41(5): 381-388.
- Favero, A. C. M., Pinheiro, S. R., Vasconcellos, S. A., Morais, Z. M., Ferreira, F., Neto, J. S. F. 2002. Sorovares de *Leptospiras* predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. Ciência Rural, Santa Maria, 32(4): 613-619.
- Gonçalves, D. D., Teles, P. S., Reis, C.R., Lopes, F. M. R., Freire, R.C., Navarro, I. T., Alves, L. A., Muller, E. E., Freitas, J. C. 2006. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in Paraná state Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 48: 135-140.
- Hashimoto, V. Y, Anzai, E. K., Lima, B. A. C., Silva, F. G., Alves, L. A., Freire, R. L., Teles, P. S., Garcia, J. L., Müller, E. E., Freitas, J. C. 2008. Associação entre as lesões renais microscópicas e a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. em suínos aparentemente saudáveis, abatidos em frigorífico da Região Norte do Estado do Paraná. Ciências Agrárias, Londrina, 29(4): 875-880.
- Heath, S. E., Johnson, R. Leptospirosis. 1994. J.A.V.M.A, 205(11): 1518-1523.
- Larsson, C.E., Yasuda, P.H., Santa Rosa, C.A., Costa, N.O. 1984. Lepstopirose suína. Inquérito sorológico e bacteriológico em municípios dos estados de São Paulo, do Paraná e de Santa Catarina. Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 21(1): 43-50.
- Modolo, J.R. , Langoni, H., Gottschalk, A.F. , Stachissini, A.V.M., Berto, D.A. 2000. Seroprevalence of *Leptospira interrogans* serovar djasiman in quarantined pigs. Indian Vet. J., 77(2): 155-156.

- Oliveira, S. J., Bortolanza, F., Passos, D. T., Pires-Neto, J. A. S., Fallavena, L. C. 2007. Diagnóstico molecular de *Leptospira* spp em matrizes suínas descartadas / Molecular diagnosis of *Leptospira* spp in culled sows. Braz. j. vet. res. anim. Sci., 44(1): 18-23.
- Osava, C. F., Salaberry, S. R. S., Nascimento, C. C. N., Lima-Ribeiro, A. M. C., Moreira, R. Q., Castro, J. R., B. Rigo, V. H. 2010. Ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em diferentes sistemas de criação de suínos Biosci. J., Uberlândia, 26(2): 202-207.
- Pereira, J. A. Soroprevalência da Infecção por *Leptospira* spp. em matrizes suínas oriundas do Médio Norte do Estado de Mato Grosso, Brasil, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Sanidade Animal, Cuiabá, 67p.
- Ramos, A.C.F., Souza B.G.N. 2006. Lilenbaum, W. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. Theriogenology, 66: 1021-1025.
- Sampaio, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2003. 221p.
- Scheifer, M. Análise de alguns fatores relacionados ao tamanho de leitegada em suinocultura comercial 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Departamento de Ciências Agrárias, Curitiba, 53p.
- Shimabucuro, F.H., Dominues, P.F., Langoni, H. 2003. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospirosas pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 40(4): 243-253.
- Thrusfield, M. Epidemiologia Veterinária. 2. ed., São Paulo: Roca, 2004. 556p.
- Valença R. M. B. Aspectos soropidemiológico das infecções por *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii* e *Chlamydia abortus* em suínos de granjas tecnificadas no Estado de Alagoas 2009. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 134p.
- Zar, J.H. Biostatistical analysis. 4ª Ed. New Jersey, Prentice-Hall Inc. 1999.663p

Tabela 1 – Distribuição de frequência de sorovares de *Leptospira* spp. em suínos abatidos na Microrregião do Vale do Ipojuca, por município no Agreste do Estado de Pernambuco, 2011

MUNICÍPIOS	GR	SBU	BJ	SAN	PES	LAJ	CAC	JAT	BMD	CAR	BEZ	TOTAL
Icterohaemorrhagiae	20,93%	27,91%	18,60%	2,33%	11,63%	4,65%	2,33%	4,65%	2,33%	2,33%	2,33%	55,13%
Copenhageni	4,65%	6,98%	4,65%	0,00%	4,65%	4,65%	0,00%	2,33%	2,33%	2,33%	0,00%	17,95%
Djasiman	0,00%	2,33%	2,33%	0,00%	0,00%	4,65%	2,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	6,41%
Hebdomadis	2,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	2,33%	2,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,85%
Pyrogenes	4,65%	0,00%	2,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,85%
Panama	0,00%	0,00%	4,65%	0,00%	0,00%	0,00%	2,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,85%
Sentot	2,33%	4,65%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,85%
Javanica	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,65%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	2,56%
Castellonis	2,33%	0,00%	2,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	2,56%
TOTAL	37,21%	41,86%	34,88%	2,33%	16,28%	20,93%	9,30%	6,98%	4,65%	4,65%	2,33%	100,00%

Legenda: GR – Gravatá; SBU - São Bento do Uma; BJ - Belo Jardim; SAN – Sanharó; PES – Pesqueira; LAJ - Lajedo ; CAC – Cachoeirinha; JAT – Jataúba; BMD - Brejo da Madre de DEUS; CAR – Caruaru ; BEZ – Bezerros.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi pioneiro na detecção de infecção por diferentes sorovares de *Leptospira* spp. e *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos no agreste do Estado de Pernambuco. Contudo, esse é o primeiro passo para que novos estudos mais aprofundados e abrangendo um maior número de amostras e regiões sejam realizados para promover ações preventivas de controle da leptospirose e toxoplasmose em suínos.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os suínos abatidos na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil estão expostos à infecção por *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. Estes resultados são importantes do ponto de vista de saúde pública, visto que os trabalhadores dos abatedouros estudados encontram-se expostos ao risco ocupacional da infecção por *Leptospira* spp.

A presença de DNA de *T. gondii* em tecidos destes animais levanta uma preocupação quanto à possível infecção por ingestão da carne crua comercializada nessa referida região. Deve-se incentivar a adoção de medidas estratégicas e integradas no local de estudo, a fim de prevenir e controlar as infecções em suínos que trarão implicações para o controle destas enfermidades em humanos na região estudada.

ANEXOS

J. Parasitol., 2008,

_ American Society of Parasitologists 2008

THE JOURNAL OF PARASITOLOGY

POLICY AND GUIDELINES FOR AUTHORS

The *Journal of Parasitology* is the official journal of the American Society of Parasitologists (ASP). The *Journal* is nonprofit and dues of the membership support the cost of publication. Manuscripts in English are accepted from investigators in any country regardless of whether they are members of the Society.

The *Journal* publishes official business of the ASP and results of new, original research, primarily on parasitic animals.

POLICY

Conditions of acceptance

Manuscripts are received by *Journal of Parasitology* with the understanding that:

- 1) all authors have approved submission;
- 2) the results or ideas contained therein are original;
- 3) the work has not been published previously;
- 4) the paper is not under consideration for publication elsewhere and will not be submitted elsewhere unless rejected by the *Journal of Parasitology* or withdrawn by written notification to the editor of the *Journal of Parasitology*;
- 5) if accepted for publication and published, the article, or portions thereof, will not be published elsewhere unless consent is obtained in writing from the editor of the *Journal of Parasitology*;
- 6) reproduction and fair use of articles in the *Journal of Parasitology* are permitted in accordance with the United States Copyright Revision Law (PL94-533), provided the intended use is for nonprofit educational purposes. All other use requires consent and fees where appropriate;
- 7) the obligation for page charges and redactory fees is accepted by the authors.

Articles reporting original research, invited reviews, and research notes are evaluated by at least 2 anonymous reviewers selected by an associate editor. Critical comments are reviewed and published on the judgment of the editor. The final decision of whether to publish is made by the editor after reviews and opinions of the editorial board are considered.

Animal care and use

The ASP conforms to the “U.S. Government Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research and Training.” Work involving vertebrate animals reported in any paper submitted to the *Journal of Parasitology* must have been conducted within the following guidelines adapted from a statement by The American Association for Laboratory Animal Science (1989, *Laboratory Animal Science* **39**: 267).

- 1) The transportation, care, and use of animals for research and teaching must conform with the appropriate national guidelines (in the U.S.A., the Animal Welfare Act) and other applicable laws, guidelines, and policies. Authors should refer to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (U.S. DHEW Publication Number [NIH] 86–23, as revised in 1985 or subsequently).
- 2) Experiments using animals should be designed and conducted with full consideration given for their relevance to human or animal health, the acquisition of knowledge, or the welfare of society.
- 3) Animal species selected for experimentation must be appropriate for the results expected, and the number used should be the minimum justified by sound statistical analysis.
- 4) All experimental and maintenance procedures require the avoidance of creating conditions that would lead to animal discomfort, distress, or pain, consistent with sound scientific practices.
- 5) If animals are to be subjected to momentary distress or pain, appropriate anesthesia must be employed. Painful experiments must not be conducted on unanesthetized animals that have been paralyzed by chemicals or other procedures.
- 6) Animals used in experiments that cause chronic pain or distress must be killed as soon as the experiments are concluded.
- 7) Veterinary care for laboratory animals is essential. Animals maintained in the laboratory must be kept in conditions appropriate for that species and under conditions that contribute to their health and comfort.
- 8) All persons using laboratory animals should be well trained for the conduct of experiments on living animals.

9) When exceptions to these principles are required, decisions regarding animal use must be made by the appropriate institutional animal care and use committee.

10) The use of animals obtained from natural populations must be in accordance with regulations and policies of appropriate federal or state agencies.

Page charges and redactory fees

The first 3 pages of each published manuscript are without charge. The charge for pages in excess of three shall be \$45 per published page for articles with at least one author who is a member, and \$75 per published page for articles with no authors who are members. Nonmembers intending to publish in the Journal of Parasitology are encouraged to become members of the Society. The current annual dues are \$75.00 (students \$35.00). Authors are allowed five alterations free of charge. Each subsequent alteration costs \$5.00. Authors are reminded that added or removed characters may necessitate other corrections. If you have included figures in color, then please note that the cost of a color plate is \$500 for printed copy, and \$75 for online version only, and is the responsibility of the authors. So please let us know if the figures should be printed in color or not, and if they should be in the printed/online versions or both. If they are not to be printed in color it would be best to replace them with Black and White figures at this stage. If you are unable to do so, Allen Press will convert them to Black and White. These charges are subject to change without notice.

Return of materials

Rejected papers: When the decision is made not to publish a paper, the original typescript and illustrations are returned to the author with the author's copy of the reviews and a cover letter. All other materials are destroyed. Rejected manuscripts are not reconsidered.

Papers returned for revision: Materials necessary for reference or to be revised are returned to the author at the time a revision is requested. If the revision is not received within 6 mo, or if other arrangements have not been made with the editor, the manuscript is considered to have been withdrawn and the materials are destroyed.

Forms of publication

Articles: The Journal publishes articles reporting original research, primarily on parasitic animals.

Research notes: This form of publication represents discrete, definitive information (as opposed to preliminary results) that does not lend itself to inclusion in a typical, more comprehensive article. A new or modified technique may be presented as a research note only

if the technique is not to be used in ongoing studies. Ordinarily, techniques are incorporated into the materials and methods section of a regular article. The Journal will no longer publish notes that deal with host or location records, except for the most unusual cases; if a prospective author has an exceptional case, he/she should first contact the Editor to determine the paper's potential acceptability.

Review articles: Only invited reviews are published. Unsolicited reviews should not be submitted, but topics may be suggested to the editor or members of the editorial board.

Critical comments: Critical comments are for correcting errors of published fact, providing alternative interpretations of published data, or presenting new theories based on published information.

Book reviews: Books having a broad interest to the membership of the Society are reviewed by invitation.

GUIDELINES FOR AUTHORS

Electronic submission

The *Journal of Parasitology* accepts papers online via our AllenTrack arrangement with Allen Press. Authors are encouraged to submit manuscripts from an Internet-connected computer, with any operating system and any platform, anywhere in the world, day or night. In preparing your manuscript for submission, please use the guidelines printed in the February issue of the *Journal of Parasitology* every other year. The system will allow authors to check the status of their manuscript and add updated files at a later date. The only software required is the Adobe Acrobat Reader (available for free from www.adobe.com). Authors not wishing to submit via the AllenTrack system may continue to submit hard copies to the editorial office by ordinary mail or courier service.

Like all submissions, access to papers submitted electronically is strictly controlled by login and user privileges, thus assuring authors that their papers are secure and inaccessible to anyone except the editor or his designee.

To submit a paper via the Internet, the following procedure should be used: Go to <http://jparasitology.allentrack.net>. The first time you use the system you will register for an account. You will use your account login and password when you return to the site to check on the status of your paper.

The first time you log on, you will have 2 choices (1) Submit a Paper, or (2) Author Guidelines. (Please examine the

Guidelines carefully—they will save you time and help you make the best use of the system.) After you submit the paper, you will have a third option that links you to information on your submission. Once your files are uploaded to the database, they are converted as needed to PDF files that can be viewed, downloaded, and printed. Most word processing files, e.g., Word, Word- Perfect, text, Postscript, and rich format, are convertible. Word (MS word) for the text, is what we prefer.

Figures can be uploaded in JPEG, TIFF, GIF, EPS, PDF, or Postscript formats. Line art, halftones, and color figures should be scanned as follows: grayscale/halftone images should be scanned at 450 dpi, color figures should be scanned at 300 dpi; and line art should be scanned at 1200 dpi. **PLEASE NOTE** that all figures should be submitted as separate files and **NOT** part of the text. When your ms. has been accepted for publication we may ask that hard copies of your figures be mailed to the Editorial Office. The reason for this request is related to the enormous variation in the quality of printers used in reproducing figures during scanning. With original hard copies in hand, we can ensure quality reproduction.

The system will ask you to confirm that the files have been converted correctly, i.e., check your files to make sure the system converted each element properly. Your paper will be considered as officially submitted only after the system receives your confirmation. As you go through the steps, watch for red arrows. These tell you that you need to take action on something. Converting your files should take just a few minutes, but occasionally they will take longer. Conversion time may vary with your connection.

In any case, you are no longer required to make multiple copies of your text and figures, or package your manuscript, or ship it via regular mail service to the editorial office. Most importantly, it will be delivered instantaneously!

When the paper is in the system we will assign it a tracking number and an associate editor to whom it will be transferred electronically from our office. Once the associate editor has it, the manuscript will be sent immediately, by electronic means, to appropriate referees.

Hard copy submission

All manuscripts must be prepared and submitted according to the guidelines of this section and those of the subsequent section appropriate for the category of the report.

Paper: Manuscripts are to be typed on one side only of good quality, white paper. Thin onion skin or rice parchment papers are **not** acceptable. *Typing:* **All parts of original manuscripts** are to be typed double-spaced (no more than 3 lines/25 mm), with all margins being at least

25 mm wide. Type should be at least 12 point (elite); **photoreduction, even in tables, is not acceptable.**

Proportional spacing and hyphenation should not be used, i.e., do not justify right-hand margin. Do not leave extra space between paragraphs in the text. Only a single font should be used; genera and species should be in italics. Authors' names in the literature cited section should be typed with capitals for the initials and first letter of the last name and lowercase for all other letters (despite the fact that these names are printed in large and small capital letters in the Journal).

Submission: For a new manuscript, submit the original and 3 copies prepared according to the Policy and Guidelines contained herein. When a manuscript has been accepted for publication by the editor, specific instructions for preparation of the revision on a diskette will be supplied. Please note that if it is not possible to prepare the revision on a diskette, then 2 hard copies of the revision prepared according to the Policy and Guidelines statement will be suitable. It remains the responsibility of the author to retain a copy of the manuscript for reference and to protect against loss. Manuscripts should be addressed to: Dr. Gerald W. Esch, Editor, Journal of Parasitology, Department of Biology, Wake Forest University, P.O. Box 7629, Winston-Salem, North Carolina 27109.

Articles

Manuscripts are to be organized in the following format and sequence, with all pages, beginning with that for the running head, numbered consecutively.

Running head: Provide the last names of authors (use et al. for more than 2) and a shortened title. The entire running head may not exceed 60 characters and spaces. Style: RH: JONES ET AL.—LIFE CYCLE OF *H. DIMINUTA*

Title: Immediately after the running head give the title of the article, names of authors, and address of the first author. Include the email address, in italics, of the corresponding author only.

The title and authors' names should be in bold type, and the same font size as the text. All other information should be in roman type. Titles should be short and descriptive. Avoid "empty words" such as preliminary studies on . . . and biology or ecology of Do not use author and date citations with scientific names in the title. **In the title only**, numbers less than 11 are spelled out; numbers indicating papers in a series will not be accepted. Present addresses and addresses for remaining authors, if different from that of the first author, are given as footnotes, and are to follow the Figure Legends with one space between the legends

and the footnotes. You should also designate who the corresponding author is by using one of the footnote designations. Footnote designations are as follows: *, †, ‡, §, __, #, ¶, **, ††. (See examples [pp. 227–229] at end of guidelines.)

Abstract: This should follow directly after the author's address with no additional spacing between them. You should provide an abstract of the paper that does not exceed 200 words.

The abstract should be factual (as opposed to indicative) and should outline the objective, methods used, conclusions, and significance of the study. The abstract is headed with the word **abstract**, indented, and typed in bold capital letters, ending with a colon also in bold type. Text is run in after the colon, is not subdivided, and does not contain literature citations.

Introduction: The introduction should follow the abstract and should be un-headed. The introduction should establish the context of the paper by stating the general field of interest, presenting findings of others that will be challenged or developed, and specifying the specific question to be addressed. Accounts of previous work should be limited to the minimum information necessary to give an appropriate perspective. The introduction may not be subdivided and extra spacing between paragraphs is not permitted here or throughout the text.

Materials and methods: This section should give sufficient information to permit repetition of the study by others. Methods and apparatus used should be indicated, but specific brand names and models need to be mentioned only if significant. The source, e.g., city and state, both spelled in full, of special equipment or chemicals should also be given. Previously published or standard techniques are to be referenced, but not detailed. Generic descriptions should be given for unusual compounds used. The primary heading for this section should be typed in all bold capital letters and started at the left-hand margin of the page. The heading is unnumbered and ends without punctuation. Second-level headings in bold type should be on a separate line beginning at the left-hand margin. The initial letter of the first word is the only capital letter except capitals needed for proper nouns. These headings are unnumbered and end without punctuation. Third-level headings are indented for a paragraph, italicized, and end with a colon, also italicized. The initial letter of the first word is the only capital letter, except capitals needed for proper nouns. Text is run in immediately following this heading. Further subdivision should not be needed. If the materials and methods section is short, it should not be subdivided; it is unnecessary to provide headings, beyond the primary head, for a series of subsections comprising single paragraphs.

Results: This section should contain a concise account of the new information. Tables and figures are to be used as appropriate, but information presented in them should not be

repeated in the text. Avoid detailing methods and interpreting results in this section. The results section may be subdivided and headed as for the materials and methods section. Taxonomic papers have a distinct style that must be adhered to in preparing a manuscript. In **taxonomic papers** the results section is to be replaced by a section headed **DESCRIPTION**, beginning at the left-hand margin. The primary heading is followed by the italicized scientific name in bold type of the taxon studied; it begins at the left-hand margin. Synonyms and reference to figures follow, each as a separate line at the left-hand margin (these are not in bold type or italicized). The text of the description follows as a new paragraph beginning with *Diagnosis*.

The description is followed with a **taxonomic summary** section, headed as described for second-level headings in the instructions for the materials and methods section. The taxonomic summary section comprises a listing of the type host, other hosts, site, locality, and specimens deposited. Each of these topics is headed as a third-level heading, e.g., italicized, and indented as described for the materials and methods section.

The *Host* subsection must include the full scientific name of the host, the authority's name, and an indication if *Symbiotype* specimens were deposited in a vertebrate museum along with accession numbers. The *Locality* should include map coordinates as well as the name of the locality, e.g., ocean, river, etc., and the geopolitical region. *Prevalence and density* data are included when known. The taxonomic summary is followed by a remarks section, headed as described for secondlevel headings in the instructions for the materials and methods section.

The **remarks** section replaces the discussion of other articles and gives comparisons to similar taxa; it is typed in boldface and begins at the left margin. The first letter is capped and the rest are lowercase. This sequence of subsections is repeated for each taxon. If in taxonomic papers the description section does not comprise all of the results and discussion, he format outlined is to be incorporated into the usual section of results.

Museum accession numbers for appropriate type material (new taxa) and for voucher specimens (surveys) are required; if deposited in the U.S. National Parasite Collection at Beltsville, Maryland, the accession number is preceded by the acronymUSNPC No. Appropriate photographic material should be deposited for descriptions of coccidia. Frozen tissues must also include accession numbers if deposited in a museum.

Discussion: An interpretation and explanation of the relationship of the results to existing knowledge should appear in the discussion section. Emphasis should be placed on the

important new findings, and new hypotheses should be identified clearly. Conclusions must be supported by fact or data.

All letters in **DISCUSSION** are boldfaced, capped, and started at the left-hand margin. The primary heading and subdivisions, if needed, in this section are as described for the materials and methods section.

Acknowledgments: These should be concise. Ethics require that colleagues be consulted before being acknowledged for their assistance in the study. The heading for this section is as for the primary head described for the materials and methods section.

Subdivisions are not used in this section.

Literature cited: Citations are arranged alphabetically. All references cited in the text must appear in the literature cited section, and all items in this section must be cited in the text. Citation of unpublished studies or reports is not permitted, i.e., a volume and page number must be available for serials and a publisher, city, state, and full pagination for books. Abstracts not subjected to peer review may not be cited. Work may be cited as “in press” only if proof has been produced. If absolutely necessary, a statement may be documented in the text of the paper by “pers. comm.”, providing a copy of that page signed by the person cited accompanies the manuscript. In those cases, the citation is indicated in the style: (X. Y. Smith, pers. comm.).

Personal communications do not appear in the literature cited section. Do not indent anything; Allen Press has a computer program that will handle all citations and indent as appropriate.

Style in the text:

(Allen, 1989)

(Allen and Smith, 1989)

(Allen et al., 1989)(Jones, 1987; Allen, 1989)—chronological (Jones 1987; Allen, 1989; Smith, 1989)—chronological and alphabetical within year (Jones, 1987, 1988a, 1988b, 1989)

Multiple authors with the same year of publication should be (Smith, Jones et al., 1988; Smith, Walker, and Jones, 1988), **not** (Smith et al., 1988a, 1988b) Style in the literature cited section (note that indentations are no longer required):

Journal article, 1 author Nollen, P. M. 1990. Chemosensitivity of *Philophthalmus megalurus* (Trematoda) miracidia. *Journal of Parasitology* **76**: 439–440. Journal article, 2 authors Edwards, D. D., and A. O. Bush. 1989. Helminth communities in avocets: Importance of the compound community. *Journal of Parasitology* **75**: 225–238.

Book Schmidt, G. D., and L. S. Roberts. 1989. Foundations of parasitology, 4th ed. Times Mirror/Mosby College Publishing Company, St. Louis, Missouri, 750 p.

Chapter in edited book Nesheim, M. C. 1989. Ascariasis and human nutrition. *In* Ascariasis and its prevention and control, D. W. T. Crompton, M. C. Nesbemi, and Z. S. Pawlowski (eds.). Taylor and Francis, London, U.K., p. 87–100. Thesis or dissertation Monks, W. S. 1987. Relationship between the density of *Moniliformis moniliformis* and distribution within the definitive host population. M.S. Thesis. University of Nebraska- Lincoln, Lincoln, Nebraska, 64 p.

Note that abbreviations are not used for titles or serial publications and that spaces appear between initials. The literature cited section has a primary heading as described for materials and methods.

Footnotes: Footnotes are used only for the title page of regular articles to indicate authors' addresses and to whom correspondence should be sent. Those for tables are typed directly under the table to which they pertain. Footnotes appear at the end of the manuscript directly after the Figure Legends (see example at end of guidelines).

Tables: Tables are used only to present data that cannot be incorporated conveniently into the text. Ordinarily values from statistical tests are not published as tables; tests employed and probability accepted for significance can be stated in the materials and methods section with significant differences indicated in tables by footnotes or in the text by a statement.

Tables must be designed to fit in 1 or 2 columns. Only rarely may they be designed to fit the height of a printed page.

Generally, if the width does not fit the height of a typed page, the table is too wide. Tables may be continued on following pages to accommodate length, but pages may not be taped together, photoreduced, single-spaced, oversized, or otherwise modified to contain more material.

Tables are numbered with Roman numerals in a continuous series and so referenced, in sequence, in the text. Captions are typed above the data on the same page. Species names are spelled out in full (and italicized) the first time used in each caption. All columns in a table must have headings, with the first letter of the first word and proper nouns capitalized, e.g., Number sampled, % Recaptured.

Horizontal lines should be avoided in the body of the table; vertical lines are not permitted. If such symbols are necessary, the table must be prepared as a line drawing and treated as a

figure. Use of letters and numbers as superscripts or subscripts is not permitted. Table designations must be used in the obligate sequence that follows: *, †, ‡, §, ‒, #, ¶, **, ††.

Figures: All figure captions are to appear consecutively, in sequence, directly after the literature cited section. Do not place figure captions on the same page as the figures. Each figure or plate of figures must have a caption. The caption is written in paragraph style, beginning with the word “FIGURE.” Captions are typed in roman, except when italic type is required, e.g., a genus and species. For plates, a summary statement should precede the specific explanation of each figure. Avoid repeating information for each figure that can be placed in the summary statement. Species names are spelled out in full the first time used in each caption. The caption must contain an explanation of all abbreviations used on the figures and indicate the value of lines or bars used to show size (unless the value is shown directly on the figure). Size should not be indicated by magnification in the caption because the figure might not be printed at the size calculated. Figures are numbered consecutively in the sequence mentioned in the text. Nonparenthetical references to figures in the text are not abbreviated, i.e., Figure 1; Figures 1, 2; Figures 1– 3; references to figures in parentheses in the text are abbreviated, i.e., Fig. 1, Figs. 1, 2; Figs. 1–3. All symbols used in a figure must be defined when possible by a key within the body of the figure. Style, including the form of abbreviation, must be that used in the *Journal*. When symbols are set in the caption, the following are available:

Others require artwork and the additional expense may be billed to the author. Freehand labeling of figures is not acceptable.

Figures may be used singly or grouped in a plate. In either case, the originals must be mounted on illustration board with a margin of at least 25 mm on all sides. Photographs and line drawings may not be combined in a single plate. If such a composition is necessary, the additional expense may be billed to the author. All figures are to be identified on the back by author name and figure number with the top indicated. Single figures are not numbered on the front, but each figure in a plate must include a number or letter, applied directly to the figure and, when possible, without an added background. Figures arranged to form a plate are to be abutted tightly without space or masking between.

Figures and plates are printed in 1 (88 mm wide) or 2 (182 mm wide) columns. Length may be up to 229 mm, but in practice it should be shorter to allow room beneath for the caption as published in the *Journal*. Publication may be delayed if the caption cannot be included on the same page as the figure(s).

Correcting proof and ordering reprints

Authors are responsible for the accuracy of their proofs and, therefore, what ultimately is printed in the *Journal*. **Corrected proofs must be returned to the editor promptly**, ideally on the same day as received. Receipt of proof is not acknowledged; authors are notified when proof is not received. Proofs are to be corrected, not revised. Additions usually are disallowed except to correct errors made in typesetting and by the editor.

Correction of errors made by the author may be billed to the author at the rate of \$5.00 each. Queries on the proof are to be answered by “yes” or “no”; do not use “ok” or “stet.”

A form for ordering reprints accompanies the proof. Only the author designated to receive correspondence receives proof and reprint order forms. It is the responsibility of this author to clear the proof with other authors and to provide the opportunity for them to order reprints.

Reprint orders are to be returned to Allen Press at the address on the form. Orders received after printing of the issue containing the article cannot be filled.

SCHEDULE FOR PRINTING INSTRUCTIONS

These instructions, or a revision, will be printed in the February issue of the *Journal* every 2 years. Reprints are available from the editor, or they can be found online at: <http://asp.unl.edu>.

ACKNOWLEDGMENTS

These instructions are a revision of policies and practices formulated by previous editors. The staff at Allen Press, especially Annielaurie Seifert, contributed ideas and advice for the revision.

Gerald W. Esch, Department of Biology, Wake Forest University, P.O. Box 7629, Winston-Salem, North Carolina 27109.

Objetivo e política editorial

O objetivo da revista Pesquisa Veterinária Brasileira é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve porém conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência em Word 7.0), ao editor da revista Pesquisa Veterinária Brasileira, no endereço abaixo. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, os editores, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões (ou combinações destes três últimos), Agradecimentos e Referências:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) um Abstract, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos index terms;

c) o Resumo deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, Resumo e Abstract trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

d) a Introdução deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

e) em Material e Métodos devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores; f) em Resultados deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na Discussão os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma

obrigação do autor e da revista de publicá-los;

h) as Conclusões devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

i) os Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

j) a lista de Referências, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, Style Manual for Biological Journals (American Institute for Biological Sciences) e/ou Bibliographic Guide for Editors and Authors (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; Resumo e Abstract serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da 1ª página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma:

"(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo:

(Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas

as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (slides) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os quadros deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de a em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.