

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Marta Elena Machado Alves

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp. EM
AMOSTRAS DE CARNE MOÍDA, EMBUTIDO COLONIAL E FILÉ
MIGNON**

Santa Maria, RS

2016

Marta Elena Machado Alves

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp. EM AMOSTRAS DE
CARNE MOÍDA, EMBUTIDO COLONIAL E FILÉ MIGNON**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva.**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS
2016

Marta Elena Machado Alves

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp. EM AMOSTRAS DE
CARNE MOÍDA, EMBUTIDO COLONIAL E FILÉ MIGNON**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva.**

Aprovado em 19 de fevereiro de 2016

Fernanda S. Flores Vogel, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Maiara S. Tafner Ferreira, MSc. (UFSM)

Gustavo C. Cadore, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois a fé devotada a ele serve como incentivo para sempre persistir na busca dos meus ideais.

Aos meus familiares, meu pai Ademar e minha mãe Maria, pelo amor e confiança, pela dedicação e carinho incondicional e, sobretudo, o apoio em todas as etapas da minha vida. Aos meus irmãos Eder, Marion, Eloi e Everson pela alegria, incentivo, afeição, sinceridade e amizade.

Ao meu namorado Rodrigo, por todo o amor e carinho compartilhados, pelo incentivo e companheirismo de todos os dias, por desejar meu sucesso e se dedicar a ele ao meu lado continuamente a cada desafio.

À orientadora Dra. Fernanda Silveira Flores Vogel, pelos ensinamentos, amizade e pelo exemplo de profissional.

Ao professor Dr. Luis Antônio Sangioni, pela convivência, ensinamentos durante o trabalho no Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR).

Aos colegas do LADOPAR pelo apoio e amizade, pelos bons e alegres momentos compartilhados.

Aos profissionais e alunos dos Laboratórios de Bacteriologia (LABAC), Micotoxinas (LAMIC) e Doenças das Aves (LCDPA), pela receptividade e ensinamentos.

Ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva, pela oportunidade e estrutura oferecidas para a realização deste trabalho.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp. EM AMOSTRAS DE CARNE MOÍDA, EMBUTIDO COLONIAL E FILÉ MIGNON

AUTORA: Marta Elena Machado Alves
ORIENTADORA: Fernanda Silveira Flores Vogel

A sarcocistose é considerada muito importante, principalmente em animais de produção. Geralmente a infecção pelo protozoário em bovinos e suínos é assintomática, porém, alguns animais podem apresentar sinais como febre, anorexia, prostração, palidez das mucosas, corrimento nasal e ocular, dispnéia, salivação, podendo causar a morte. O ciclo de vida é heteroxeno, com um estágio assexuado nos hospedeiros intermediários (presa) e um estágio sexuado nos hospedeiros definitivos (predador). Nos carnívoros e humanos (hospedeiros definitivos), o parasito desenvolve uma fase intestinal que culmina com a produção de oocistos. As espécies consideradas zoonóticas são o *Sarcocystis hominis* e o *Sarcocystis suihominis*, sendo, respectivamente, os bovinos (*Bos taurus*) e suínos (*Sus scrofa*) os hospedeiros intermediários. Recentemente foi identificado o *Sarcocystis heydorni*, sendo o bovino seu hospedeiro intermediário e o humano o hospedeiro definitivo. No Brasil os bovinos apresentam alta prevalência de sarcocistose. Essa alta prevalência pode ser um fator de risco que contribui para a infecção humana, uma vez que está se dá através da ingestão de carne crua ou mal cozida, contendo os sarcocistos. O diagnóstico pode ser realizado pela detecção dos cistos, através do exame histológico a fresco e a digestão artificial, sendo esta última considerada a técnica mais sensível. Adicionalmente o diagnóstico molecular tem sido amplamente utilizado na detecção e caracterização das espécies-específicas. Não existe tratamento para essa doença o que torna a prevenção um passo primordial. Medidas de prevenção e controle: cozimento a 65°C ou congelamento a -4°C e cuidados nos processos de fabricação (sais de cura, defumação) dos produtos cárneos a serem empregados na alimentação humana. O presente trabalho objetivou detectar a presença de *Sarcocystis* spp. e realizar a caracterização molecular das espécies encontradas em 375 amostras de produtos cárneos, incluindo carne moída, embutido colonial e filé mignon e para isso utilizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) com amplificação do gene 18S rDNA e caracterização molecular utilizando a RFLP com as enzimas de restrição *Bcl I*, *Rsa I* e *Alu I*. A ocorrência de *Sarcocystis* spp. foi de 17% (64/375) do total de amostras. Considerando o tipo foram positivas 5,6% (7/125) amostras de filé mignon, 12,8% (16/125) de carne moída e 32,8% (41/125) de embutido colonial. Das amostras positivas as espécies caracterizadas foram *S. hirsuta* e *S. hominis* com prevalências de 93,75% (60/64) e 6,25% (4/64), respectivamente. Considerando a relevância da sarcocistose na área da saúde pública, a ocorrência das espécies encontradas nesse estudo pode ser um fator de risco que contribui para a infecção humana.

Palavras chave: Sarcocistose, 18S rDNA, PCR-RFLP, produtos cárneos, segurança alimentar

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Sarcocystis* spp. IN SAMPLES OF GROUND BEEF, COLONIAL SAUSAGE AND FILET MIGNON

AUTHOR: Marta Elena Machado Alves
ADVISOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

The sarcocystosis is considered a disease important in farm animals. Usually the protozoan infection in bovine and swine is asymptomatic, but some animals may show signs such as fever, anorexia, prostration, pale mucous, nasal and ocular discharge, dyspnea, salivation, may cause death. The life cycle is heteroxeno with an asexual stage in the intermediate host (prey) and sexual stage in the definitive hosts (predator). In carnivores, and humans (definitive hosts), the parasite develops an intestinal phase culminates with the production of oocysts. Species considered zoonotic are *Sarcocystis hominis* and *Sarcocystis suihominis*, being, respectively, cattle (*Bos taurus*) and swine (*Sus scrofa*) intermediate hosts. Recently the *Sarcocystis heydorni* was identified, and the bovine intermediate host and the definitive human host. In Brazil there is a high prevalence of the sarcocistose in cattle. This high prevalence can be a risk factor contributing to human infection, as it is through raw meat intake or undercooked containing the sarcocistos. Diagnosis can be accomplished by the detection of cysts by fresh histological examination and artificial digestion, wich is the most sensitive the most sensitive technique. Additionally the molecular diagnosis has been widely used in detection and characterization of specific species. There is no treatment for this disease which makes prevention an essential step. prevention and control measures: baking at 65 ° C or frozen at -4 ° C and care in the manufacturing process (curing salts, curing) of meat products used in human food. This study aimed to detect the presence of *Sarcocystis* spp. and perform the molecular characterization of the species found in 375 samples of meat products, including ground beef, colonial sausage in filet mignon and it used the polymerase chain reaction (PCR) to amplify the gene 18S rDNA and molecular characterization using RFLP with restriction enzymes *Bcl I*, *Alu I* and *Rsa I*. the occurrence of *Sarcocystis* spp. was 17% (64/375) of all samples. Considering the type were positive 5.6% (7/125) filet mignon samples, 12.8% (16/125) of ground beef and 32.8% (41/125) of colonial sausage. Of the positive samples were characterized species *S. hirsuta* and *S. hominis* with prevalence of 93.75% (60/64) and 6.25% (4/64), respectively. Considering the relevance of sarcocystosis in public health, the occurrence of the species found in this study may be a risk factor contributing to human infection.

Keywords: Sarcocistosis, 18S rDNA, PCR-RFLP, meat products, food safety

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Resultado da análise pela RFLP com as enzimas <i>Bcl I</i> (A) e <i>Rsa I</i> (B) em amostras de produtos cárneos.....	23
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Ocorrência das espécies de <i>Sarcocystis</i> spp. testadas por PCR-RFLP em amostras de filé mignon, carne moída e embutido colonial coletadas em estabelecimentos comerciais e feiras livres de Santa Maria – RS	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus celsius
µl	Microlitro
miliQ	Água ultrapura
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Buffer	Tampão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotideo trifosfato
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HAI	Hemaglutinação indireta
IC	Intervalo de confiança
mA	Miliampère
MAPA	Ministério da agricultura pecuária e abastecimento
min.	Minuto
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
RFLP	Restrição de fragmentos de polimorfismos
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
UV	Ultra violeta
V	Volts
W	Watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 ETIOLOGIA E HISTÓRICO	11
2.2 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO.....	12
2.3 EPIDEMIOLOGIA	13
2.4 PATOGENIA	13
2.5 ASPECTOS CLÍNICOS	14
2.6 PERDAS ECONÔMICAS.....	15
2.7 DIAGNÓSTICO	15
2.8 TRATAMENTO	16
2.9 PROFILAXIA E CONTROLE	17
2.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
3 REFERÊNCIAS	18
4 ARTIGO	21
RESUMO	21
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1 INTRODUÇÃO

A sarcocistose é comum a uma ampla variedade de vertebrados, incluindo aves, répteis e mamíferos (LOPES, 2004). Geralmente a infecção pelo protozoário é assintomática em bovinos e suínos, porém, alguns animais podem apresentar sinais clínicos como febre, anorexia, prostração, palidez das mucosas, corrimento nasal e ocular, dispneia, salivação, podendo causar a morte (NAKASATO, 2008). O gênero *Sarcocystis* é composto por mais de 200 espécies, no entanto se conhece o ciclo de 26 (DUBEY et al., 2015). É um parasita intracelular obrigatório pertencentes à família Sarcocystidae e filo Apicomplexa (NEMATOLLAHIA et al., 2015; TENTER, 1995).

O *Sarcocystis* spp. apresenta ciclo de vida heteroxeno, com um estágio assexuado nos hospedeiros intermediários (presa) e um estágio sexuado nos hospedeiros definitivos (predador). Nos carnívoros e humanos (hospedeiros definitivos), o parasito desenvolve uma fase intestinal que culmina com a produção de oocistos, contendo no seu interior dois esporocistos similares, com quatro esporozoítos cada. Nos hospedeiros intermediários, a infecção causa cistos teciduais, que são colônias de parasitos e quando maduros apresentam grande número de bradizoítos (DUBEY, 2015).

Os bovinos (*Bos taurus*) são hospedeiros intermediários das espécies *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis* e seus hospedeiros definitivos são respectivamente, cães, gatos e primatas (NAKASATO et al., 2008). O *S. hominis* e o *S. hirsuta* são pouco patogênicos para bovinos, praticamente não causando sinais clínicos (POULSEN & STENSVOLD, 2014; SAITO et al., 1995). Em suínos (*Sus scrofa*), duas espécies foram identificadas, *S. miescheriana* e *S. suihominis*, com cães e humanos, respectivamente, como hospedeiros definitivos (ROMMEL, 1985).

As espécies consideradas zoonóticas são o *Sarcocystis hominis* e o *Sarcocystis suihominis*, sendo, respectivamente, os bovinos e suínos os hospedeiros intermediários. Ainda recentemente foi identificado o *Sarcocystis heydorni*, sendo o bovino seu hospedeiro intermediário e o humano o hospedeiro definitivo (DUBEY et al., 2015). Segundo Reis (2008), no homem muitas vezes a infecção não se traduz por um quadro sintomático grave, mas as manifestações clínicas costumam ser mais pronunciadas quando a espécie infectante é *S. suihominis* e em pacientes imunocomprometidos.

No Brasil existe relato de uma alta prevalência de sarcocistose em bovinos (RUAS et al., 2001), sendo considerada muito importante, principalmente em animais de produção (LOPES, 2004). Essa alta prevalência pode ser um fator de risco que contribui para a infecção

humana, uma vez que está se dá através da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo sarcocistos. Segundo estudos preliminares de Nishikawa et al. (1983) realizado no Rio Grande do Sul, a sarcocistose é uma das principais doenças parasitárias responsáveis or baixos índices produtivos.

As formas de diagnóstico comumente empregadas são as técnicas histológicas que permite a visualização de esquizontes nos vasos sanguíneos e órgãos e a observação de cistos nos músculos à necropsia ou biopsia. Porém, muitas vezes, para diferenciação das espécies de *Sarcocystis* spp. presentes no hospedeiro essas técnicas não são eficazes (DUBEY et al., 1989, ROMEL, 1985). Considera-se o diagnóstico molecular como uma ferramenta importante para a investigação epidemiológica da sarcocistose. Isso porque diversos estudos têm utilizado reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico de infecções por *Sarcocystis* spp., com especial ênfase na identificação das espécies utilizando sequenciamento e/ou polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) do 18S rDNA (STOJECKI et. al., 2012; YANG et. al., 2002).

O presente trabalho objetivou detectar a presença do *Sarcocystis* spp. e realizar a caracterização molecular das espécies encontradas em 375 amostras de produtos cárneos, incluindo a carne moída, embutido colonial e filé mignon.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA E HISTÓRICO

O *Sarcocystis* spp. é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae (DUBEY, 1989). A primeira forma que veio a caracterizar o gênero *Sarcocystis* Lankester, 1882 foi tomado como base na presença de cistos localizados no interior das células do tecido muscular estriado. Cistos estes que com base na sua morfologia e hospedeiro parasitado deram origem ao diagnóstico de algumas espécies e a várias descrições de espécies novas (DUBEY, 1983).

Os bovinos são hospedeiros intermediários das espécies *S. cruzi*, *S. hirsuta*, *S. hominis* e *S. heydorni* e seus hospedeiros definitivos são respectivamente, cães, gatos e primatas para as duas últimas espécies (DUBEY et al., 2015; NAKASATO et al., 2008). O *S. hominis* e o *S. hirsuta* são pouco patogênicos para bovinos, praticamente não causando sinais clínicos (POULSEN & STENSVOLD, 2014; SAITO et al., 1995). Em suínos, duas espécies foram identificadas, *S. miescheriana* e *S. sui hominis*, com cães e humanos, respectivamente, como

hospedeiros definitivos (ROMMEL, 1985). As espécies consideradas zoonóticas são o *S. hominis*, *S. sui hominis* e o *S. heydorni* (DUBEY et al., 2015).

2.2 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

O gênero *Sarcocystis* é composto por parasitas intracelulares obrigatórios (NEMATOLLAHIA et al., 2015). Caracterizam-se por possuir em alguma fase de sua vida uma estrutura chamada complexo apical, estrutura importante na fixação e penetração do parasito nas células dos hospedeiros (REYS, 2008).

Sarcocystis spp. possui um ciclo de vida heteroxeno, com um estágio assexuado nos hospedeiros intermediários (presa) e um estágio sexuado nos hospedeiros definitivos (predador) (LOPES, 2004). Uma variedade de carnívoros, especialmente canídeos e felídeos, répteis, aves de rapina e marsupiais americanos estão incluídos como hospedeiros definitivos (DUBEY, 2001). Nos hospedeiros definitivos, carnívoros e homem, o parasito desenvolve uma fase intestinal que culmina com a produção de oocistos, contendo no seu interior dois esporocistos similares, com quatro esporozoítos cada (ROMMEL, 1985). Pelo fato da parede do oocisto ser muito fina, geralmente se rompe durante a excreção e os esporocistos são encontrados livres nas fezes (ROMMEL, 1985). Alguns répteis são capazes de terem um ciclo do tipo dioxeno (BANNET, 1994) ou mesmo em algumas espécies de vertebrados terem experimentalmente ciclos biológicos deste gênero mais complexo aos já observados (KOUDELA & MODRÝ, 2000).

Segundo Carlton & McGavin, 1995, quando os hospedeiros intermediários ingerem os oocistos, liberam os esporozoítos dos esporocistos, no intestino. Então, esses esporozoítos invadem os tecidos e os esquizontes são formados nas células endoteliais dos vasos sanguíneos da maioria dos órgãos. A partir disso, eles se multiplicam assexuadamente em células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos e em glóbulos brancos. Os merozoítos resultantes da formação dos esquizontes penetram nas células musculares e se encistam (DUBEY, 1989; XIANG et al., 2009; TENTER & HECKEROTH, 1999).

Conforme a espécie pode ocorrer outras merogonias teciduais. Os cistos se desenvolverão em qualquer parte do tecido muscular, no entanto, os órgãos afetados com mais frequência são o coração, esôfago, diafragma e a língua (DOMENIS et al., 2011). Após a ingestão de carne contendo cisto pelo hospedeiro definitivo, os cistozoítos migram para a lâmina própria das vilosidades do intestino delgado transformando-se em macrogamontes e microgamontes (DUBEY, 1989). A fertilização destes é seguida pela formação de oocistos

que são liberados gradualmente em números muito baixos ao longo de um período de vários meses (CARLTON & MACGAVIN, 1995). Cistos jovens são preenchidos com metrócitos que dão origem aos bradizoídos. Cistos maduros são compartimentados e contêm quase exclusivamente os cistozoitos, que se tornam infecciosos cerca de 70 dias após a ingestão de oocistos pelo hospedeiro intermediário, sendo o período pré-patente é de 5 à 14 dias (ROMMEL, 1985).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A sarcocistose tem maior importância para os hospedeiros intermediários em todo o mundo, pois nestes, pode se apresentar de forma grave ocorrendo à dispersão do parasita por todo o sistema sanguíneo (RUAS et al., 2001). Nos herbívoros, esta doença é considerada muito importante principalmente em animais de produção, pois está associada ao efeito dos esquizontes nos vasos sanguíneos (LOPES, 2004). A taxa de infecção por *Sarcocystis* spp. em herbívoros pode atingir todos animais do rebanho (ROMMEL, 1985).

Na população canina, a prevalência deste protozoário está relacionada aos hábitos alimentares. Dessa forma, cães que se alimentam de carne crua, através da caça ou pelo fornecimento de carnes e vísceras cruas ou mal cozidas, contendo cistos musculares viáveis, apresentam um maior risco de infecção pelo protozoário (LABRUNA et. al., 2001). Segundo Rommel (1985), as espécies transmitidas pelo cão costumam ser mais frequentes, mas o índice de infecção com outras espécies também é substancial. Ainda, os esporocistos são encontrados em cerca de 15% das amostras de fezes coletadas aleatoriamente de cães, 5% das amostras de gato e 7% das fezes humanas (ROMMEL, 1985).

Os esporocistos podem sobreviver em pastagens por um ano, porém os surtos de doença aguda ocorrem apenas quando existir animais totalmente sensíveis criados em um ambiente livre de parasitas e expostos repentinamente a um grande número de esporocistos (RUAS et al., 2001). Os esporocistos podem estar em pastagens, nas fezes, indiretamente nas águas residuais usadas para irrigação e, também, as inundações também podem disseminar os esporocistos (ROMMEL, 1985).

2.4 PATOGENIA

Sarcocystis spp. é um parasito que desenvolve merontes na intima dos vasos sanguíneos e cistos em células da musculatura estriada e sistema nervoso central (BANNET,

1994). Os animais de produção possuem a patogenia da sarcocistose melhor conhecida (RUAS et al., 2001). No trato intestinal do hospedeiro intermediário, os esporocistos se rompem e liberam esporozoítos infectantes. Estes penetram na mucosa intestinal, são disseminados pelo sistema vascular e desenvolvem-se intracelularmente nas células endoteliais dos capilares e em outros pequenos vasos (REYS, 2008).

Esquizontes de diversas gerações, ao se desenvolverem na íntima das artérias e capilares viscerais, obliteram o fluxo sanguíneo, devido ao aumento de sua forma dentro da luz vascular ou pelas lesões provocadas devido ao seu rompimento para liberação dos merozoítos. Posteriormente, ocorre uma extensa reação semelhante a coagulação intravascular disseminada, pela agregação de plaquetas e subsequente formação de trombos. Neste período é observado uma anemia macrocítica e aumento nos níveis de fibrinogênio. Quanto à formação de cistos, observa-se a alteração nas enzimas ASAT, isoenzima CK-MB e LDH. (LOPES, 2004).

2.5 ASPECTOS CLÍNICOS

Os cistos de *Sarcocystis* spp. no músculo normalmente não causam sinais clínicos, ao passo que a maturação dos esquizontes de segunda geração pode ser acompanhada por doença grave, frequentemente resultando em morte (ROMMEL, 1985). Sendo a gravidade da doença e dos sinais clínicos mais frequentes variáveis de acordo com o grau de infecção, no entanto a infecção pelo *S. hominis* em bovinos foi ocasionalmente associado à miosite eosinofílica e a presença de *S. hirsuta* macroscópica leva a condenação de partes da carcaça bovina (WOUDA et al., 2006). Na maioria das espécies, este protozoário é responsável por causar uma doença debilitante podendo levar à morte e tem como sinais clínicos febre, anorexia, prostração, palidez das mucosas, corrimento nasal e ocular, dispneia, salivação e opstótono. (NAKASATO, 2008).

A febre transitória é observada durante a fase inicial ou esquizogônica, já os sinais clínicos na sarcocistose aguda são marcados durante a maturação da segunda geração (ROMMEL, 1985). A infecção por algumas espécies pode resultar em perda de peso, anemia, aborto e até mesmo a morte em casos de infecção elevada (DUBEY et al., 1989). Além desses sinais clínicos observados tanto em animais jovens como em adultos, pode ser encontrado em fêmeas, queda da produção leiteira, retenção de placenta e nascimentos de animais fracos (LOPES, 2004). Os animais sobreviventes à infecção geralmente se recuperam rapidamente (ROMMEL, 1985).

Os estágios sexuais do *S. suis* não causam quaisquer sinais clínicos em cães e gatos, mas podem causar grave diarreia em seres humanos. Além disso, o homem serve como hospedeiro intermediário e/ou definitivo. Após a ingestão de carne crua ou mal cozida contendo sarcocistos, o indivíduo infectado apresenta diarreia, inchaço, dispneia, taquicardia, náuseas e perda de apetite. Em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) a sarcocistose é considerada uma infecção oportunista (FAYER, 2004).

2.6 PERDAS ECONÔMICAS

Esta enfermidade é considerada muito importante, principalmente em animais de produção (LOPES, 2004). Foi demonstrada uma alta prevalência da sarcocistose em rebanhos bovinos no sul do país (RUAS et al., 2001) e segundo estudos preliminares de Nishikawa et al. (1983) entre as doenças parasitárias, a sarcocistose pode ser responsável por baixos índices produtivos. No Brasil os bovinos apresentam alta prevalência de sarcocistose (RUAS et al., 2001). Essa alta prevalência pode ser um fator de risco que contribui para a contaminação humana, uma vez que a infecção do hospedeiro definitivo se dá através da ingestão de carne crua ou mal cozida, contendo os sarcocistos (DUBEY, 1989).

2.7 DIAGNÓSTICO

Existem diversas formas de diagnóstico, sendo necessário avaliar a melhor para cada situação. Nos hospedeiros intermediários, o diagnóstico pode se dar pela observação de sinais clínicos, porém nem sempre os animais infectados apresentam sinais e quando presentes podem ser inesquecíveis. Também, pode ser realizado o exame histológico através da observação de esquizontes nos vasos sanguíneos de órgãos, como rim ou coração, e de cistos nos músculos a partir da necropsia ou biópsia (FORTES, 2004).

Métodos de diagnósticos mais básicos considerados simples e de baixo custo, porém laboriosos e fastidiosos incluem a digestão artificial, histopatologia (eosina hematoxilina), exame de amostras de tecido a olho nu e microscopia de luz. O método da digestão artificial do músculo e visualização no microscópio óptico é usado para encontrar cistos em carcaças, demonstrando os cistozoitos na amostra de músculo digerido artificialmente (ROMMEL, 1985). Este é um dos métodos de diagnóstico mais sensível, porém não permite a identificação da espécie.

O diagnóstico diferencial das espécies que afetam os bovinos é baseado em características morfológicas das paredes do *Sarcocystis* spp e pode ser conseguida por microscopia eletrônica de transmissão (DUBEY, 1989). Este método é específico, mas demorado, o que limita a sua aplicação num elevado número de amostras. Outros métodos de diagnóstico: Imunofluorescência indireta (RIFI) (MORÉ et al. 2011), ELISA (HECKEROTH & TENTER, 1999), *Western Blot* (ABDUL-RAHMAN et al., 2002). Testes sorológicos mais sensíveis, para distinguir *S. hominis* de *S. suihominis*, ainda não foram desenvolvidos (TENTER et al. 1991).

Como auxílio no diagnóstico da infecção pode-se utilizar o teste de hemaglutinação indireta, porém vale lembrar que a presença de um título de anticorpos não está associada à presença de lesões ativas por *Sarcocystis* spp. Além disso, os animais podem morrer antes de uma resposta humoral detectável (CARLTON & MCGAVIN, 1995). O exame de fezes de cães ou gatos para pesquisa de esporocistos pode ser útil no diagnóstico, podendo ser desenvolvidos através de métodos de flutuação como Willis Molay (CARLTON & MCGAVIN, 1995; FORTES, 2004; ROMMEL, 1985). Os testes sorológicos como o RIFI e ELISA podem ser utilizados juntamente com os sinais clínicos da doença para diferenciá-la de outras etiologias, mas nem sempre existe um nível de anticorpos detectáveis, por isso, testes moleculares podem ser aplicados a fim de confirmar a infecção (LOPES, 2004).

Ainda, o diagnóstico molecular configura-se uma importante forma para a investigação epidemiológica da sarcocistose. Vários estudos vêm sendo desenvolvidos com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico de infecções por *Sarcocystis* spp., com especial ênfase a identificação das espécies utilizando sequenciamento e/ou Fragmento de Restrição Polimorfismo de Comprimento (RFLP) do 18S rDNA (FISCHER & ODENING, 1998; YANG et al, 2002). No Brasil ainda são baixos os relatos de estudos relacionados à sarcocistose, seja através do emprego de técnicas moleculares ou não (NAKASATO, 2008). Esse dado pode indicar uma baixa incidência da doença no país, ou ainda que ela é subdiagnosticada.

2.8 TRATAMENTO

Tanto para o hospedeiro intermediário quanto para o definitivo não existe tratamento eficaz. O que se preconiza quando ocorre um surto em ruminantes é a administração de Amprólio na dieta dos animais como tratamento profilático (CARLTON & MCGAVIN, 1995).

2.9 PROFILAXIA E CONTROLE

A profilaxia da sarcocistose, considerando seu ciclo evolutivo, é de extrema importância, uma vez que não existe tratamento para a doença. Consiste em medidas preventivas como boas práticas na agricultura e pecuária, não ingerir carne crua, não deixar carcaças de animais abatidos no campo prevenindo assim, a infecção do predador, além de excluir carnívoros do abrigo dos animais, manter depósitos de grãos e alimentos cobertos, utilização de testes de diagnóstico para vigilância sanitária e esclarecimento dos habitantes rurais sobre esta doença (FORTES, 2004).

Outro passo fundamental a prevenção é a inspeção de animais no momento do abate. A forma intestinal em seres humanos pode ser impedida pelo cozimento a 65 °C, evitando assim o consumo de carne crua ou mal cozida ou, o congelamento a – 4°C da carne, onde o tratamento térmico é uma medida preventiva eficaz (HVIZDOŠOVÁ & GOLDOVÁ, 2009).

2.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que não existe um tratamento eficaz para esta doença, conclui-se que medidas profiláticas e de controle devem ser adotadas visando evitar grandes perdas econômicas, uma vez que esta patologia leva à condenação dos animais gerando prejuízos aos produtores e frigoríficos. Outra medida importante é a conscientização dos produtores de animais e de toda cadeia de produção de carne bovina e suína para evitar estas infecções, especialmente pelas espécies *S. hominis* e *S. suis* que se tratam de zoonoses. Para isso é necessário o auxílio dos médicos veterinários e cientistas incentivando o diálogo e esclarecimentos sobre o tema com a finalidade de melhorar a segurança alimentar.

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi detectar a presença de *Sarcocystis* spp. e caracterizar as espécies encontradas em 375 amostras de produtos cárneos (carne moída, embutido colonial e filé mignon). Para isso, realizou-se a detecção do parasita através da técnica de PCR, pela amplificação parcial do gene 18S rDNA e caracterização molecular utilizando a RFLP com as enzimas de restrição *Bcl I*, *Rsa I* e *Alu I*. A ocorrência de *Sarcocystis* spp. foi de 17% (64/375) do total de amostras. Considerando o tipo de alimento estudado foram positivas 5,6% (7/125) amostras de filé mignon, 12,8% (16/125) de carne moída e 32,8% (41/125) de embutido colonial. Das amostras positivas as espécies caracterizadas foram *S. hirsuta* e *S. hominis* com prevalências de 93,75% (60/64) e 6,25%

(4/64), respectivamente. Considerando à relevância da sarcocistose na área da saúde pública, a ocorrência das espécies encontradas nesse estudo pode ser um fator de risco que contribui para a contaminação humana, sendo necessários maiores cuidados nos processos de fabricação.

3 REFERÊNCIAS

ABDUL-RAHMAN, S. M.; RASHAD, S. M.; DOMA, M. A. Human muscle sarcocystosis in relation to non-specific rheumatic diseases and rheumatoid arthritis. **Egyptian Rheumatology and Rehabilitation**. vol. 29, n. 5, p. 743-753, 2002. Disponível em: <http://applications.emro.who.int/imemrf/egypt_rheum_regabil_2002_29_5_743.pdf>. Acesso em 9 de out. de 2015.

BANNET, B. Investigations on the host specificity of dihomoxenous sarcosporidia in the intermediate and definitive host. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 183-188, 1994. Disponível em: <<http://phdtree.org/pdf/36530229-investigations-on-the-host-specificity-of-dihomoxenous-sarcosporidia-in-the-intermediate-and-definitive-host/>>. Acesso em: 10 de nov. de 2015.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 440 p.

DOMENIS, L. et al. Detection of a morphogenetically novel *Sarcocystis hominis*-like in the context of a prevalence study in semi-intensively bred cattle in Italy. **Parasitology Research**. v. 109, p. 1677–1687, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556683>>. Acesso em 10 de set. de 2015.

DUBEY, J. P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**. v. 95, p. 89–131, 2001. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0304401700003848/1-s2.0-S0304401700003848-main.pdf?_tid=bc8698ee-87da-11e5-88c8-00000aacb360&acdnat=1447181104_90247f15ab70fb562b57632bf277986f>. Acesso em 11 de nov. de 2015.

DUBEY, J. P. *Sarcocystis peromysci* n. sp. and *S. idahoensis* in deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) in Montana. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, n. 5, p. 1180-1182, 1983. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/z83-159#.VkJyIberQWk>>. Acesso em: 10 de Nov. de 2015.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. *Sarcocystosis of Animals and Man*. 2ed. Florida: CRC Press, 1989, 481p.

DUBEY J.P., et.al. *Sarcocystis heydorni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) with cattle (*Bos taurus*) and human (*Homo sapiens*) cycle. *Parasitol Res*. v. 114. p. 4143–4147, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-015-4645-2>>. Acesso em: 20 de fev de 2016.

FAYER, R. *Sarcocystis* spp. in Human Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 894-902, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC523554/pdf/0006-04.pdf>>. Acesso em: 12 de nov. de 2015.

FISCHER, S.; ODENING, K. Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. **The Journal of Parasitology**. v. 84, p. 50-54, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488337>>. Acesso em: 18 de out. de 2015.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4 ed. São Paulo: Cone, 2004. 137p.

HECKEROTH, A.R.; TENTER, A.M. Comparison of immunological and molecular methods for the diagnosis of infections with pathogenic *Sarcocystis* species in sheep. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**. v. 23, n. 6, p. 293-302, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10622625>>. Acesso em: 9 de out. de 2015.

HVIZDOŠOVÁ, N.; GOLDOVÁ, M. Monitoring of occurrence of sarcocystosis in hoofed game in eastern Slovakia. **Folia Veterinaria**, v. 53, n. 1, p. 5-7, 2009. Disponível em: <http://www.ramiran.net/doc09/FOLIA/01_09/Hvizdosova_53_01_2009.pdf>. Acesso em: 12 de nov. de 2015.

KOUDELA, B.; MODRÝ, D. *Sarcocystis muris* possesses both diheteroxenous e dihomoxenous characters of life cycle. **Journal of Parasitology**. v. 86, n. 4, p. 877-879, 2000. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1645/0022-3395%282000%29086%5B0877%3ASMPBDA%5D2.0.CO%3B2>>. Acesso em: 10 de nov. de 2015.

LABRUNA, M. B. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 73, n. 2, p. 183-193, 2006. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V73_2/labruna.PDF>. Acesso em: 12 de nov. de 2015.

LOPES, C. W. G. O gênero *Sarcocystis* (LANKESTER, 1882) (APICOMPLEXA:SARCOCYSTIDAE), uma questão a ser reavaliada no Brasil. **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses**, Ouro Preto, MG, 2004. Disponível em: <http://www.rbvp.ufrj.br/documentos/13supl.12004/pp13s114_16.pdf>. Acesso em: 28 de outubro de 2015.

MORÉ, G., et al. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. **Veterinary Parasitology**. v. 177, p. 162-165, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21168276>>. Acesso em: 12 de nov. de 2015.

NAKASATO, F. H., et al. *Sarcocystis* spp: revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano VI – Número 11 – Julho de 2008 – Periódico Semestral. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/lqAtOiTUIGR5FMR_2013-6-13-15-22-11.pdf>. Acesso em: 23 de out. de 2015.

NEMATOLLAHIA, A. et al. A study on rate of infestation to *Sarcocystis* cysts in supplied raw hamburgers. **Journal of Parasitic Diseases**. v. 39, n. 2, p. 276–279, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s12639-013-0339-9>>. Acesso em: 26 de out. de 2015.

POULSEN, C. S.; STENSVOLD, C. R. Current Status of Epidemiology and Diagnosis of Human Sarcocystosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 52, n. 10, p. 3524 –3530, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187749/pdf/zjm3524.pdf>>. Acesso em: 28 de out. de 2015.

REYS, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 181-186, 2008.

ROMMEL, M. Sarcocystosis of domestic animals and humans. **In Practice**. v. 7, n. 5, p. 158-160, 1985. Disponível em: <<http://inpractice.bmj.com/content/7/5/158.full.pdf+html?sid=187d494b-4410-4587-b756-1fae40e018f9>>. Acesso em: 10 de nov. de 2015.

RUAS, J.; CUNHA, C. W.; SILVA, S. S. Prevalência de *Sarcocystis* spp. (Lankester,1882) em bovinos clinicamente sadios, na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Agrociências**. v. 7, n. 3, p. 227-230, 2001. Disponível em: <<http://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/402/394>>. Acesso em: 28 de out. de 2015.

SAITO, M. et al. Toxicity and properties of the extract from *Sarcocystis cruzi*. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 57, n. 6, p. 1049-1051, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720045>>. Acesso em: 28 de out. de 2015.

STOJECKI, J. K. et al. Molecular diagnostics of *Sarcocystis* spp. Infections. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v. 15, n. 3, p. 589-596, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23214385>>. Acesso em: 20 de out. de 2015.

TENTER, A. M. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. **International Journal for Parasitology**. v. 25, n. 11, p. 1311–1330, 1995. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/002075199500068D/1-s2.0-002075199500068D-main.pdf?_tid=1e409750-7bd9-11e5-814a-00000aab0f6c&acdnat=1445860995_ccaa8c6adb28acc551b907f827c3a1d6>. Acesso em: 26 de out. de 2015.

TENTER, A. M. et al. Detection of species-specific and cross-reactive epitopes in *Sarcocystis* cystozoites by monoclonal antibodies. **Parasitology Research**. v. 77, n. 3, p. 212-216, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710803>>. Acesso em: 20 de nov. 2015.

WOUDA, W.; SNOEP, J. J.; DUBEY, J. P. Eosinophilic Myositis due to *Sarcocystis hominis* in a Beef Cow. **Journal of Comparative Pathology**. v. 135, p. 249-253, 2006. Disponível em: <<http://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=27734&content=PDF>>. Acesso em: 8 de set. de 2015.

XIANG, Z., Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. **Parasitology International**. v. 58, p. 293–296, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576909000312>>. Acesso em: 26 de out. de 2015.

YANG, Z., et al. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. **Experimental Parasitology**. v. 102, p. 212–217, 2002. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S001448940300033X/1-s2.0-S001448940300033X-main.pdf?_tid=2b0167da-775b-11e5-9a46-00000aacb361&acdnat=1445367095_8593eebd509f3e5e17a7278c93836cd3>. Acesso em: 20 de out. de 2015.

4 ARTIGO (Conforme normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

Caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em amostras de carne moída, embutido colonial e filé mignon¹

Marta E.M. Alves^{2*}, Caroline S. Oliveira², Luiza P. Portella², Fernanda S.F. Vogel², Luis A. Sangioni²

ABSTRACT. - M.E.M. Alves, C.S. Oliveira, L.P. Portella, F.S.F. Vogel, L.A. Sangioni. **[Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. in samples of ground beef, colonial sausage and filet mignon.]** Caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em amostras de carne moída, embutido colonial e filé mignon. ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio 44, Sala 5149, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Email: marta.elenamachado@gmail.com

The sarcocystosis is a worldwide spread disease and can affect birds, reptiles and many mammals, including man. The aim of this study was to detect the presence of *Sarcocystis* spp. and characterize the species found in 375 samples of meat products (ground beef, colonial sausage and filet mignon). For this, we carried out the detection of the parasite by PCR for the amplification of the partial 18S rDNA gene and molecular characterization using RFLP with restriction enzymes *Bcl* I, *Alu* I and *Rsa* I. The occurrence of *Sarcocystis* spp. was 17% (64/375) of all samples. Considering the type were positive 5.6% (7/125) filet mignon samples, 12.8% (16/125) of ground beef and 32.8% (41/125) of colonial built. Of the positive samples were characterized species *S. hirsuta* and *S. hominis* with prevalence of 93.75% (60/64) and 6.25% (4/64), respectively. Considering the relevance of sarcocystosis in public health, the occurrence of the species found in this study may be a risk factor contributing to human contamination. However the presence of the parasite does not necessarily mean potential of infection to humans, since the care in production processes can reduce the viability of infection of the cysts.

INDEX TERMS: Sarcocystosis, 18S rRNA, PCR-RFLP, meat products, food security

RESUMO.- A sarcocistose é uma doença distribuída mundialmente, podendo acometer aves, répteis e diversos mamíferos, incluindo o homem. O objetivo desse trabalho foi detectar a presença de *Sarcocystis* spp. e caracterizar as espécies encontradas em 375 amostras de produtos cárneos (carne moída, embutido colonial e filé mignon). Para isso, realizou-se a detecção do parasita através da técnica de PCR, pela amplificação parcial do gene 18S rDNA e caracterização molecular utilizando a RFLP com as enzimas de restrição *Bcl* I, *Rsa* I e *Alu* I. A ocorrência de *Sarcocystis* spp. foi de 17% (64/375) do total de amostras. Considerando o tipo de alimento estudado foram positivas 5,6% (7/125) amostras de filé mignon, 12,8% (16/125) de carne moída e 32,8% (41/125) de embutido colonial. Das amostras positivas as espécies caracterizadas foram *S. hirsuta* e *S. hominis* com prevalências de 93,75% (60/64) e 6,25% (4/64), respectivamente. Considerando à relevância da sarcocistose na área da saúde pública, a ocorrência das espécies encontradas nesse estudo pode ser um fator de risco que contribui para a contaminação humana. No entanto a presença do protozoário não significa necessariamente potencial de infecção aos humanos, uma vez que os cuidados nos processos de fabricação podem diminuir a viabilidade de infecção dos cistos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Sarcocistose, 18S rDNA, PCR-RFLP, produtos cárneos, segurança alimentar

INTRODUÇÃO

O parasita do gênero *Sarcocystis* spp. é intracelular obrigatório, sendo importante principalmente em animais de produção (Lopes, 2004). O *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis* tem como hospedeiro definitivo o cão, o gato e o primata, respectivamente, sendo os bovinos seu hospedeiro intermediário. No ciclo de vida do *S. suihominis* o homem é o hospedeiro definitivo e os suínos (*Sus scrofa*) são os hospedeiros intermediários (Ruas et al., 2000). Duas principais espécies zoonóticas para o homem são o *S. hominis* e o *S. suihominis*, onde a infecção ocorre pela ingestão de carne ou produtos cárneos crus ou mal cozidos contendo cistos do protozoário (Rommel, 1985). Geralmente a infecção não produz um quadro sintomático grave, sendo a gravidade da doença e dos sinais clínicos mais frequentes variáveis de acordo com o grau de infecção (Nakasato, 2008). Porém, as manifestações clínicas costumam ser evidenciadas quando a infecção é causada pelo *S. suihominis* em pacientes imunocomprometidos (Reys, 2008).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015), as projeções de produção de carnes para o Brasil mostram que esse setor deve apresentar crescimento nos próximos anos. Sendo de 2,0% para

¹ Recebido em
Aceito para publicação em

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio 44, Sala 5149, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: carolsobotyk@gmail.com, lupiresportella@gmail.com, fefevogel@gmail.com, lasangioni@gmail.com, *Autor para correspondência: marta.elenamachado@gmail.com.

carne bovina e de 1,9% para carne suína. Os produtos cárneos consumidos crus ou mal cozidos, são considerados alimentos de alto risco epidemiológico. Entre os produtos cárneos consumidos crus encontram-se disponíveis ao consumo humano, o filé mignon, a carne moída e o embutido colonial. O filé mignon geralmente é utilizado para a confecção do *Carpaccio*, um prato que nos últimos anos se tornou um produto muito popular, facilmente encontrado em bares e restaurantes, o qual consiste em finas fatias de carne crua, tradicionalmente ingerido com azeite, queijo parmesão e especiarias diversas (Lucquin et al., 2012). A carne moída pode ser usada para fazer quibe cru (Braga e Ferreira, 2013), e por fim, o embutido colonial que é um derivado cárneo produzido por processos de cura e fermentação confeccionados a partir da carne suína e bovina (mista) ou apenas suína (Silva et al., 2011).

Para realização do diagnóstico o uso de técnicas moleculares é uma ferramenta importante na investigação epidemiológica da sarcocistose. Isso porque diversos estudos utilizam a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico de infecções por *Sarcocystis* spp., com ênfase na identificação das espécies utilizando sequenciamento e/ou fragmento de restrição de comprimento de polimorfismo (RFLP) e amplificação do gene 18S rDNA (Yang et al., 2002; Stojceki et al., 2012).

Neste estudo objetivou detectar a presença do *Sarcocystis* spp. e realizar a caracterização molecular das espécies encontradas em 375 amostras de produtos cárneos, incluindo a carne moída, embutido colonial e filé mignon.

MATERIAL E MÉTODOS

Os produtos cárneos testados são oriundos de estabelecimentos da cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, totalizando 375 amostras (125 para cada produto cárneo testado). A carne moída e filé mignon foram coletados de diferentes locais de venda, todos inspecionados pelos órgãos de inspeção municipal, estadual ou federal, já o embutido colonial misto (carne suína e bovina) foi coletado de locais com inspeção municipal e de feiras que comercializam produtos coloniais. A seleção das amostras ocorreu aleatoriamente alcançando todos os pontos da cidade. No transporte as amostras foram armazenadas em caixa isotérmica refrigerada e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da extração de DNA. Fragmentos de 50 mg foram submetidos à extração de DNA com o kit comercial (*Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®*, Madison - USA), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante com modificações na etapa de lise, de acordo com Moré et al. (2011). O DNA extraído foi acondicionado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes da realização da PCR verificou-se a pureza do DNA através do *Picodrop*, sendo consideradas adequadas às amostras com concentração mínima de 100 ng/ml de DNA (Eslani et al., 2014).

Para detecção do agente *Sarcocystis* spp. através da amplificação parcial do gene 18S rDNA, utilizou-se as sequências de Sarco F - 'CGCAAATTACCCAATCTGA' e Sarco R - 'ATTCTCATAAGGTGCAGGAG', sendo o volume final de 25µl, contendo 200ng/µL de DNA molde, 1X de PCR Buffer, 0,04mM de cada dNTP, 0,4µM de cada iniciador e 1,25u GoTaq® DNA Polymerase (Promega®). A reação de amplificação do DNA foi realizada em termociclador (T100™ ThermalCycler - BIORAD) com as seguintes condições: 35 ciclos com desnaturação inicial 94 °C/5 min., desnaturação 94 °C/45 seg., anelamento 55 °C/45 seg., extensão 72 °C/45 seg. e extensão final 72 °C/5 min. Visualizaram-se os produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com *Gel Red* (Invitrogen®) e fotografados sob efeito de luz ultravioleta. Foi realizado o exame a fresco de amostra de coração bovino para coleta de cistos e confecção do controle positivo, sendo extraída pela mesma técnica usada para as demais amostras. Consideraram-se positivas para *Sarcocystis* spp. as amostras que apresentam um produto esperado de 700pb.

Para o desenvolvimento da RFLP foram utilizadas as enzimas de restrição *Bcl I* 10 u/µl e *Rsa I* 10 u/µl (*Promega®*, Madison - USA) com o intuito de diferenciar as espécies *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis* positivas pela PCR. Ainda, por ser a confecção dos embutidos com carne suína, procurou-se pesquisar a espécie *S. suihominis* através da enzima de restrição *Alu I* 10 u/µl (*Promega®*, Madison - USA). Visualizaram-se os resultados em gel de agarose 2%, corados com *Gel Red* (Invitrogen®). De acordo com Yang et al. (2002) para o *S. cruzi* são cortados fragmentos apenas com *Rsa I*; *S. hirsuta* são cortados com ambas as enzimas e *S. hominis* permanece sem restrição com as duas enzimas. E para a enzima *Alu I* são observados dois fragmentos. O controle positivo foi caracterizado como *S. cruzi*, pois foi cortado apenas pela enzima *RSa I*. Na análise estatística utilizou-se o teste do Qui-quadrado e intervalo de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo a ocorrência de amostras positivas foi de 17% (64/375 - IC: 13,4 – 21,3) do total de amostras oriundas da cidade de Santa Maria – RS. Considerando o tipo de produto cárneo foram positivas 5,6% (7/125 - IC: 2,3 – 11,2) amostras de filé mignon, 12,8% (16/125 - IC: 7,5 – 19,9) de carne moída e 32,8% (41/125 - IC: 24,7 – 41,8) de embutido colonial (Quadro 1).

Das amostras positivas pela PCR, o *S. hirsuta* esteve presente em 93,75% (60/64 - IC: 84,7 – 98,2) e o *S. hominis* em 6,25% (4/64 - IC: 1,72 – 15,23). A relação entre as espécies possui diferença significativa ($p < 0,05$). Ainda, a relação entre os resultados obtidos para as amostras de filé mignon e carne moída, sendo $p > 0,05$ demonstrando não haver diferença estatística significativa. No entanto, a relação tanto entre filé mignon e embutido quanto carne moída e embutido apresenta $p < 0,05$ com diferença significativa. Mesmo sendo todas as amostras de embutido colonial

positivas pela PCR de origem mista não houve restrição pela enzima *Alu I* nessas amostras (Yang et al., 2002), sugerindo que a espécie *S. suis* não esteve presente na amostragem testada. A análise por RFLP das espécies de sarcocistas identificadas está nas Fig. 1 e 2.

A detecção e identificação de patógenos nos alimentos são cruciais para a saúde pública, nesse sentido o desenvolvimento da biologia molecular tem contribuído para melhorar os métodos de diagnóstico e a caracterização das espécies de *Sarcocystis*, quando em comparação com outros métodos, as investigações moleculares são métodos mais precisos na identificação da etiologia de diversas doenças (Stojecki et al., 2012). Ainda, pesquisas envolvendo *Sarcocystis* spp. são imprescindíveis para o desenvolvimento de medidas eficazes para a prevenção e controle da doença, Khaniki e Kia (2006) encontraram uma prevalência de 6,2% (5/80) de cistos em amostras de carne para hambúrguer no Irã por métodos histológicos. Supostamente essa diferença quando comparada a este estudo, pode ser devido as variáveis pesquisadas e talvez pelo método empregado.

No Brasil os bovinos apresentam alta prevalência de sarcocistose, sendo o *S. cruzi* o mais frequente acometendo bovinos (Ruas et al., 2001). Conforme estudos anteriores mais de 90% dos animais adultos estavam infectados em muitos países, incluindo Argentina, com o tecido mais afetado sendo o músculo cardíaco (Böttner et al., 1987; Dubey et al., 1989; Moré et al., 2008). Nas amostras de filé mignon a prevalência foi de 5,6% (7/125). Não existem pesquisas específicas nesse corte de carne, porém devido sua utilização na confecção do *Carpaccio* é importante o esclarecimento sobre a ocorrência do parasita nessa porção muscular.

Em pesquisas realizadas por Pena et al. (2001) com quibe cru na cidade de São Paulo 100% (50/50) foram positivas para *Sarcocystis* spp., concluindo que o preparo de quibe cru com carne pode ser fonte de transmissão do *S. hominis* para humanos. Na região sul do RS, Ruas et al. (2001) determinaram a prevalência do parasita em bovinos clinicamente sadios, onde detectaram por observação à fresco, cistos em 100% dos corações analisados (305/305), 58,2% (177/305) dos masseteres, 58,2% (177/305) dos músculos intercostais e em 47,5% (144/305) dos diafragmas. Assim, a partir da análise da frequência na região e observação da produção de carne moída (mistura de porções variadas de carne bovina), pode-se inferir o aumento na ocorrência de *Sarcocystis* spp. em relação ao filé. No entanto, estatisticamente essa relação não apresenta diferença significativa ($p > 0,05$).

Esse aumento é ainda maior quando analisamos a prevalência de *Sarcocystis* spp. em embutido colonial onde ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$), sugerindo que os animais que deram origem à matéria-prima utilizada na fabricação dos embutidos eram criados de forma desconhecida, provavelmente, permitindo o livre acesso de outros hospedeiros definitivos do parasito às instalações de criação (Lopes, 2004). No entanto a presença do protozoário não significa necessariamente potencial de infecção aos humanos, uma vez que a utilização adequada de sais de cura na fabricação dos embutidos e o processo de defumação podem diminuir a viabilidade de infecção dos cistos (Kijlstra e Jongert, 2008).

Das amostras positivas, o *S. hirsuta* está caracterizado em 93,75% (60/64) e o *S. hominis* em 6,25% (4/64) apresentando diferença significativa entre elas ($p < 0,05$). Portanto, sugere-se que felinos e humanos, que são hospedeiros definitivos para os respectivos protozoários colaborando para a contaminação com oocistos, têm contato e acesso livre as instalações dos bovinos, que são os hospedeiros intermediários (Nakasato et al., 2008). A ocorrência do *S. hominis* pode ser um fator de risco que contribui para a contaminação humana, uma vez que, a infecção do hospedeiro definitivo se dá através da ingestão de carne crua ou mal cozida, contendo os sarcocistos (Ruas et al., 2001).

Vários fatores são responsáveis pela disparidade dos resultados obtidos, por exemplo, a sensibilidade do teste diagnóstico empregado e/ou coleta de porções de tecido em que o protozoário não estivesse presente. Segundo Ruas et al. (2001) o miocárdio é o músculo mais frequentemente infectado, seguido pelo músculo esofágico, masseter, intercostais e diafragma. A predileção do parasita por esses órgãos é devido ao bom suprimento sanguíneo. Além disso, provavelmente a maior ocorrência de cistos no miocárdio esteja relacionada com a patogenia da doença, pois ao atingir a circulação sistêmica, o protozoário alcança, por via venosa, o coração, alojando-se no miocárdio (Dubey, 1989).

A técnica utilizada para detecção do parasita é outra variável importante. Sendo considerada a técnica mais sensível a digestão artificial, também são recomendadas para detecção de cistos microscópicos o exame histopatológico e o exame a fresco de amostra de tecidos (Moré et al., 2011). Adicionalmente o diagnóstico molecular tem sido amplamente utilizado na detecção e caracterização das espécies-específicas, incluindo o *Sarcocystis* spp. (Yang et al., 2002). Servindo como alternativa a ser empregada em amostras processadas, congeladas ou que sofreram alguma ação capaz de tornar inviável a identificação do cisto através de microscopia, porém quando comparada ao exame a fresco a PCR é menos sensível (Moré et al., 2011) devido a diversas variáveis, considerando a possibilidade de as amostras terem uma baixa quantidade de DNA (Wilson, 1997).

Conforme Yang et al. (2002) a técnica baseada em RFLP pode ser aplicada para distinguir espécies morfologicamente semelhantes de *Sarcocystis* spp. A identificação das espécies é importante, principalmente, pela relevância desta parasitose, pois o homem pode adquirir a doença através da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo os sarcocistos (Fayer, 2004). E também, ainda existe uma falta de clareza associada à patogenicidade deste parasito e o potencial zoonótico do *Sarcocystis* spp. (Stojecki et al., 2012). A prevenção da infecção por *Sarcocystis*

spp. pode ser obtida pelo cozimento a 65°C ou pelo congelamento a -4°C dos produtos cárneos a serem empregados na alimentação humana (Srivastava, 1986).

CONCLUSÕES

No presente estudo os resultados encontrados revelam a presença do parasita *Sarcocystis* spp. nos três produtos testados, sendo caracterizados pela RFLP como *S. hirsuta* e *S. hominis*. A ocorrência do *S. hirsuta* foi maior em relação ao *S. hominis* constatando que este parasita está presente em maior proporção nos produtos cárneos testados. O *S. hominis*, parasito de maior importância na saúde pública esteve presente em amostras de carne moída e embutido colonial, já o *S. hirsuta* foi encontrado nos três produtos cárneos alvos desta pesquisa. Ainda, a maioria das amostras positivas foram as de embutido colonial 32,8% (41/125). Assim, esses resultados sugerem que os animais que deram origem à matéria-prima eram criados de forma desconhecida e provavelmente os felinos e o humanos têm contato e acesso livre às instalações dos bovinos permitindo o desenvolvimento do ciclo evolutivo dessas espécies de *Sarcocystis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braga H.F. & Ferreira I.M. 2013. Quibe cru: qualidade sanitária e perigo à saúde. Rev. Bras. Pesq. Saúde, v.15, p.123-129. Disponível em: <<http://periodicos.ufes.br/RBPS/article/view/7609/5272>>. Acesso em 4 de nov. de 2015.
- Böttner, A., Charleston, W.A., Pomroy, W.E. & Rommel, M. 1987. The prevalence and identity of *Sarcocystis* in beef cattle in New Zealand. Vet. Parasitol. v. 24, p. 157–168. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3113040>>. Acesso em 15 de out. de 2015.
- Dubey J.P., Speer C.A. & Fayer R. 1989. Sarcocystosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton, Florida, 215p.
- Dubey J.P., et.al. 2015. *Sarcocystis heydorni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) with cattle (*Bos taurus*) and human (*Homo sapiens*) cycle. Parasitol Res. v. 114. p. 4143–4147. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-015-4645-2>>. Acesso em: 20 de fev. de 2016.
- Eslami G., Zohourtabar A. & Mehrizi S.R. 2014. First molecular identification of *Sarcocystis hirsuta* in Iranian beef: A case report. J Food Qual Hazards Control. v. 1, p. 32-34. Disponível em: <http://jfqhc.ssu.ac.ir/files/site1/user_files_f703af/admin-A-10-1-18-1a484ff.pdf>. Acesso em 21 de nov. de 2015.
- Fayer R. 2004. *Sarcocystis* spp. in Human Infections. Clin Microbiol Rev, v. 17, p. 894-902. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC523554/>>. Acesso em 3 de set. de 2015.
- Khaniki G.R.J. & Kia E.B. 2006. Detection of *sarcocystis* cystis from meat supplied for hamburger in iran by histological method. J. Med. Sci. v. 6, p. 18-21. Disponível em: <<http://www.scialert.net/qredirect.php?doi=jms.2006.18.21&linkid=pdf>>. Acesso em 18 de out. de 2015.
- Kijlstra A. & Jongert E. 2009. *Toxoplasma* - safe meat: close to reality? Trends Parasit. v. 25, p.18-22. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951847>>. Acesso em 11 de nov. de 2015.
- Lopes C.W.G. O gênero *Sarcocystis* (LANKESTER, 1882) (APICOMPLEXA:SARCOCYSTIDAE), uma questão a ser reavaliada no Brasil. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 13, 2004, Ouro Preto. Rev. Bras. Parasitol.Vet. v.13, suplemento 1, 2004. Disponível em: <http://www.rbpv.ufrrj.br/documentos/13supl.12004/pp13s114_16.pdf>. Acesso em 5 de nov. de 2015.
- Lucquin, I., Zagorec, M., Champomier-vergès, M. & Chaillou, S. 2012. Fingerprint of lactic acid bacteria population in beef carpaccio is influenced by storage process and seasonal changes. Food Microbiol. v.29, p.187-196. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22202872>>. Acesso em 20 out. de 2015.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil, 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal>>. Acessado em 05 de out. de 2015.
- Moré G., Basso W., Bacigalupe D., M.C. Venturini & L. Venturini. 2008. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. Parasitol Res. v. 102, p. 671–675. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-007-0810-6>>. Acesso em 15 de out. de 2015.
- Moré G., Abrahamovich P., Jurado S., Marin J.C., Rambeaud M., Venturini L. & Venturini M.C. 2011. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. Vet. Parasitol. v. 177, p. 162-165. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21168276>>. Acesso em 29 de set. de 2015.
- Nakasato F.H., Saito A.S., Taneno J.C., Garcia M.M. & Neves M.F. 2008. *Sarcocystis* spp: revisão de literatura. Rev. Cient. Elet. Med. Vet. n. 11, Jul. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/lqAtOiTUIGR5FMR_2013-6-13-15-22-11.pdf>. Acesso em 6 de set. de 2015.
- Pena H.F. DE J., Ogassawara S. & Sinhorini I.L. 2001. Occurrence of cattle *sarcocystis* species in raw kibbe from arabian food establishments in the city of São Paulo, Brazil, and experimental transmission to humans. J. Parasitol. v. 87, p. 1459–1465. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780838>>. Acesso em 13 de out. de 2015.
- Reys L. 4. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 888p.
- Rommel M. 1985. Sarcocystosis of domestic animals and humans. In Pratic. v.7, p.158-160. Disponível em: <<http://inpractice.bmj.com/content/7/5/158.full.pdf+html>>. Acesso em 29 de set. de 2015.

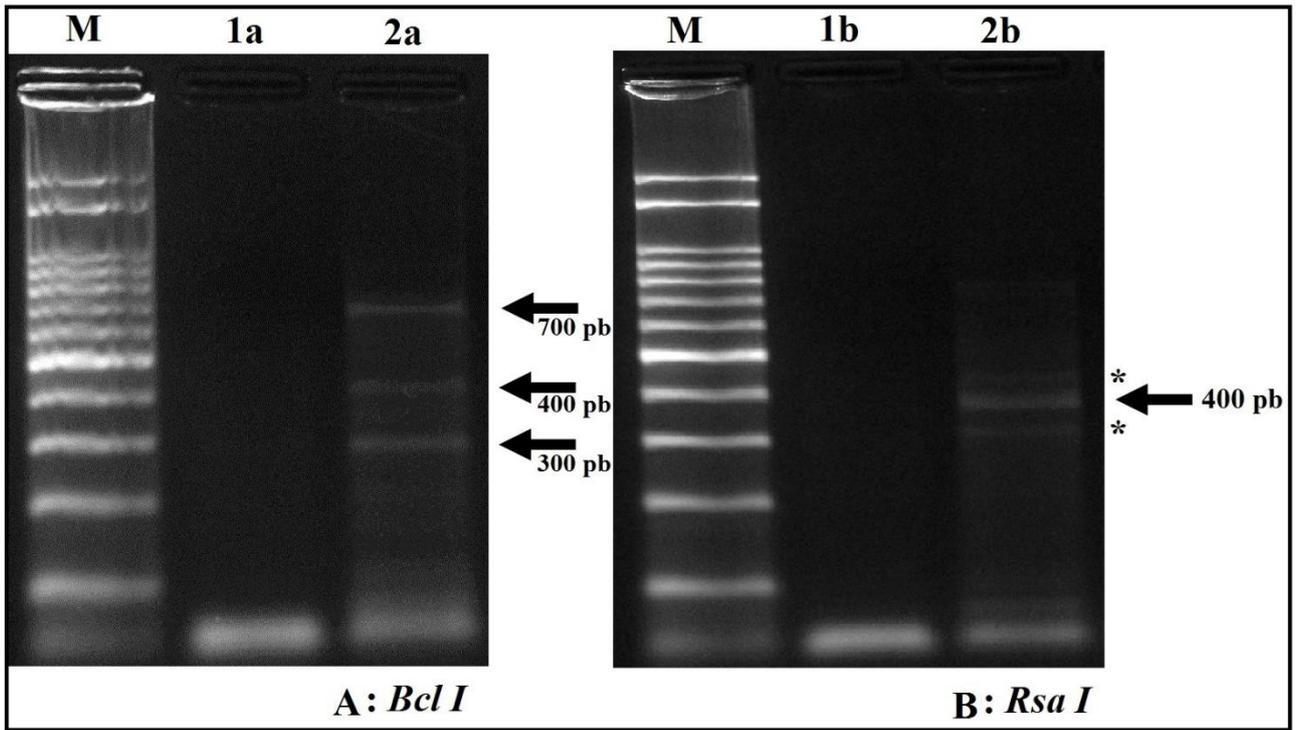
- Ruas J.L., Cunha C.W. & Silva S.S. 2001. Prevalência de *Sarcocystis* spp. (LANKESTER, 1882) em bovinos clinicamente saudáveis, da região do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Bras. Agrocienc, v.7, p.227-230. Disponível em: <<http://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/402/394>>. Acesso em 29 de set. de 2015.
- Silva C. DA, Savariz F.C., Follmann H. DAL M., Nuñez L., Chapla V.M. & Silva C.F.DA. 2011. Análise físico-química de salames coloniais comercializados no município de Toledo, Estado do Paraná. Acta sci., Technol. v.33, p.331-336. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/7775>>. Acesso em 2 de out. de 2015.
- Srivastava P.S., Saha A.K. & Sinha S.R.P. 1986. Effects of heating and freezing on the viability of sarcocysts of *Sarcocystis levinei* from cardiac tissues of buffaloes. Vet. Parasitol. v.19, p.329-332. Disponível em: <<http://europemc.org/abstract/MED/3085325>>. Acesso em 8 de out. de 2015.
- Stojecki K., Karamon J., Sroka J. & Cencek T. 2012. Molecular diagnostics of *Sarcocystis* spp. Infections. Pol J Vet Sci., v. 15, p. 589-596. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/pjvs.2012.15.issue-3/v10181-012-0090-7/v10181-012-0090-7.xml>>. Acesso em 20 de out. de 2015.
- Yang Z., Li Q., Zuo Y., Chen Xin-Wen, Chen Yong-Jiu, Nie L., Wei Chang-Gue, Zen Jia-Shun, Attwood S.W., Zhang Xue-Zheng & Zhang Ya-Ping. 2002. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. Exp. Parasitol. v.102, p.212-217. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S001448940300033X/1-s2.0-S001448940300033X-main.pdf?_tid=2b0167da-775b-11e5-9a460000aacb361&acdnat=1445367095_8593eebd509f3e5e17a7278c93836cd3>. Acesso em 20 de out. de 2015.
- Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Env. Microbiol. v.63, p.3741-3751. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168683/>>. Acesso em 18 de out. de 2015.

Quadro 1 – Ocorrência das espécies de *Sarcocystis* spp. testadas por PCR-RFLP em amostras de filé mignon, carne moída e embutido colonial coletadas em estabelecimentos comerciais e feiras livres de Santa Maria, RS –

Amostras	Filé mignon	Carne moída	Embutido colonial
<i>S. hirsuta</i>	7/125 (5,6)	15/125 (12)	38/125 (30,4)
<i>S. hominis</i>	0/125 (0)	1/125 (0,8)	3/125 (2,4)
<i>S. sui hominis</i>	0/125 (0)	0/125 (0)	0/125 (0)
Total	7/125 (5,6)	16/125 (12,8)	41/125 (32,8)

Legendas das Figuras

Fig. 1. Resultado da análise pela RFLP com as enzimas *Bcl I* (A) e *Rsa I* (B). M: marcador de peso molecular de 100pb; 1a e 1b: *S. hominis* sem cortes em ambas enzimas (A-B); 2a e 2b: *S. hirsuta* cortado com as duas enzimas (A-B).



*símbolo indica fragmentos de dois tamanhos diferentes migraram em conjunto.