



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

PAULO DE TARSO SANTANA TAVARES

**Diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras (*Gallus gallus*)
comercializadas em feiras da região metropolitana de Macapá - AP**

MACAPÁ-AP

2024

PAULO DE TARSO SANTANA TAVARES

**Diagnostico molecular de *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras (*Gallus gallus*)
comercializadas em feiras da região metropolitana de Macapá - AP**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Saúde e Produção Animal na Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho
Coorientadora: Profa. Dra. Elizabeth Machado Barbosa

MACAPÁ

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

TAVARES, PAULO DE TARSO SANTANA

Diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras (*Gallus gallus*) comercializadas em feiras da região metropolitana de Macapá - AP / PAULO DE TARSO SANTANA TAVARES. - 2024.
48 f. ; il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Saúde e Produção Animal na AMAZÔNIA (PPGSPAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2024.

Orientador: Profa. Dra. Ednaldo da Silva Filho
Coorientador: Profa. Dra. Elizabeth Machado Barbosa.

1. Toxoplasmose, PCR, Diagnóstico, *Gallus gallus*. I. da Silva Filho, Ednaldo, orient. II. Título

CDD 574.88

PAULO DE TARSO SANTANA TAVARES

**Diagnostico molecular de *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras (*Gallus gallus*)
comercializadas em feiras da região metropolitana de Macapá – AP**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Saúde e Produção Animal na Amazônia.

Data de aprovação: 29/11/2024

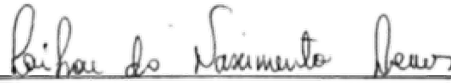
BANCA EXAMINADORA:



Prof^ª. Dra. Elizabeth Machado Barbosa - Presidente/Coorientadora
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP



Prof^ª. Dra. Tainara Tocantins Gomes Almeida
Universidade Federal do Pará – UFPA



Prof^º. Dr. Lailson do Nascimento Lemos
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP



Prof. Dr. Ricardo Marcelo Dos Anjos Ferreira
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP

AGRADECIMENTOS

À Deus, o que me concede a vida, que me permite todos os dias o dom da resignação e torna a caminhada mais suave.

Aos meus pais Paulo Tavares de Lima e Iolanda Santana Tavares (in memoriam) a quem me conceberam e me proporcionaram a criação terrena e formação de meu caráter.

À minha família pela oportunidade de convivência, em especial meus irmãos e sobrinhos. Às minhas filhas que sempre me apoiam e que estão ao meu lado demonstrando o afeto necessário. À minha querida esposa Maria Aparecida Dantas, mais que esposa, companheira e amiga, quem segura minha mão em momentos tortuosos e me faz enxergar coisas além de minhas capacidades, que sem seu apoio, talvez não tivesse nem iniciado esta caminhada e às minhas.

Aos amigos que ao longo da trajetória fui construindo, sejam eles amigos de trabalho ou mesmo aqueles que foram se “achegando”, em especial ao Alexandre Creão. Ao meu querido orientador Ednaldo da Silva Filho, cujo papel foi fundamental nesta caminhada, pessoa a qual tenho respeito e admiração, bem como à minha coorientadora Elizabeth Machado Barbosa cuja relação foi muito mais de coorientador e orientado, mas, criou-se uma relação de amizade, algo que é mais que necessário na vida acadêmica.

Às colegas de Pós-Graduação Rafaelle Casseb Guimarães, Cintia Luana Pinheiro Santos e Juliana Vasconcelos Figueiredo, colegas estas que foram fundamentais nos processamentos e resultados desta pesquisa.

Agradeço também a todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal da Amazônia e aos colegas pelas vivências e pelas intensas trocas de conhecimentos.

Por fim, neste mundo de trocas, a todos que direta ou indiretamente já passaram pela minha vida e aqueles que nela ficaram. Meu muito obrigado.

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo parasita *Toxoplasma gondii*, que pode afetar seres humanos e animais. A contaminação ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contaminados pelo parasita, como carne crua ou mal cozida, ou pelo contato com fezes de gatos infectados. Embora seja uma doença comum em todo o mundo, estudos epidemiológicos mostram que sua prevalência varia de acordo com fatores ambientais, comportamentais e culturais. Entre as espécies de animais que podem ser afetadas pela toxoplasmose estão as aves. Em muitas regiões do mundo, as galinhas são criadas em condições de vida precárias, com acesso limitado à higiene e alimentação adequadas, o que pode favorecer a disseminação do parasita. Neste sentido, o presente estudo buscou identificar a ocorrência de *T.gondii* em galinhas caipiras na região metropolitana de Macapá, através de testes moleculares PCR (Polymerase Chains Reaction) e analisar o sequenciamento genético do DNA de *T. gondii* das aves positivas. Assim, de um total de 36 animais foram coletados tecidos do encéfalo e coração, destes uma alíquota foi direcionada para a realização da PCR convencional e outra para realização do exame histopatológico (CEUA 6216180923). Através da análise molecular pela técnica de PCR convencional foram observados tecidos positivos e negativos para a presença de DNA de *Toxoplasma gondii*. Foram observados 72,2% (n=26) de animais positivos, sendo 58,3% (n= 21) animais positivos diagnosticados no tecido encefálico e cardíaco e 13,9% (n=5) no tecido encefálico. Observou-se um total de 27,8% (n=10) de animais negativos nos dos tecidos coletados. Dessa maneira, evidencia-se a necessidade de novos estudos acerca, além da urgente capacitação dos produtores para um melhor manejo de suas criações, bem como políticas públicas devem ser pensadas no Estado do Amapá a fim de mitigar os efeitos da contaminação desta proteína animal vendidas nas feiras da região metropolitana do Estado diante da possibilidade de se tornar uma emergência em saúde pública.

Palavras-Chave: Toxoplasmose, PCR, Diagnóstico, *Gallus gallus*.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is an infectious disease caused by the parasite *Toxoplasma gondii*, which can affect humans and animals. Contamination mainly occurs through the ingestion of food contaminated by the parasite, such as raw or undercooked meat, or through contact with the feces of infected cats. Although it is a common disease worldwide, epidemiological studies show that its prevalence varies according to environmental, behavioral, and cultural factors. Among the species of animals that can be affected by toxoplasmosis are birds. In many regions of the world, chickens are raised in poor living conditions, with limited access to proper hygiene and nutrition, which can favor the spread of the parasite. In this sense, the present study aimed to identify the occurrence of *T. gondii* in free-range chickens in the metropolitan region of Macapá through molecular PCR (Polymerase Chain Reaction) tests and to analyze the genetic sequencing of *T. gondii* DNA from positive birds. Thus, from a total of 36 animals, brain and heart tissues were collected, with one aliquot directed for conventional PCR and another for histopathological examination (CEUA 6216180923). Through molecular analysis using conventional PCR, tissues positive and negative for the presence of *Toxoplasma gondii* DNA were observed. A total of 72.2% (n=26) of animals were positive, with 58.3% (n=21) positive in both brain and heart tissues and 13.9% (n=5) positive in brain tissue only. A total of 27.8% (n=10) of animals were negative in the collected tissues. Thus, the need for further studies is evident, as well as the urgent training of producers for better management of their flocks, and public policies should be considered in the State of Amapá to mitigate the effects of contamination of this animal protein sold in the metropolitan region's markets, given the possibility of becoming a public health emergency.

Keywords: Toxoplasmosis, PCR, Diagnosis, *Gallus gallus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Notificação individual de toxoplasmose em gestantes, nos Municípios residentes do Amapá, entre 2019-2023.....	24
Quadro 2	Notificação individual de toxoplasmose Congênita, nos Municípios residentes do Amapá, entre 2019-2023.....	24
Figura 1	Mapa da Região metropolitana de Macapá com as respectivas feiras.....	35
Figura 2	Sequência com identidade ID: LN714499.1.....	40
Figura 3	Árvores de distancia genéticas dos animais testados.	40
Tabela 1	Primes forword e reverse de <i>T. Gondii</i>	36
Tabela 2	Descrição das fases, temperatura, tempo e ciclo da reação de PCR para <i>T gondii</i>	37
Tabela 3	Análise de associação de discordância dos resultados entre os tecidos de acordo com os indivíduos pelo teste de McNemar.....	39
Tabela 4	Identificação dos animais positivos e negativos de acordo com a feira de compra, origem e municípios.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome de Imunodeficiência Humana
BIOMOL - Laboratório de Microbiologia/Imunologia
CEUA - Comitê de Ética e Uso Animal
CTA - Centro de Testagem e Aconselhamento
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HIV - Vírus de Imunodeficiência Humana
IgA -Imunoglobulina A
IgE – Imunoglobulina E IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
ISAGA - Immunosorbent Agglutination Assay
MEIA - Ensaio Imunoenzimático Com Micropartículas
NGS - Sequenciamento de Nova Geração
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
SAE - Serviço de Assistência Especializada
SAN - Segurança alimentar e nutricional
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS - Superintendência de Vigilância em Saúde
TAE - Tris / Ácido Acético /EDTA
UFRA - Universidade Federal Rural da Amazônia
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	12
2.	OBJETIVOS.....	13
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1.	Toxoplasmose.....	14
3.1.1.	Agente etiológico.....	14
3.1.2.	Ciclo biológico.....	15
3.1.3.	Epidemiologia.....	16
3.1.4.	Formas de Transmissão.....	17
3.1.5.	Toxoplasmose em Galinhas.....	17
3.1.6.	Toxoplasmose em Humanos.....	18
3.1.7.	Diagnósticos.....	20
3.1.7.1.	Diagnóstico Sorológico.....	21
3.1.7.2.	Diagnóstico Molecular.....	21
3.1.8.	Tratamento em humanos e animais.....	22
3.1.9.	Controle e Prevenção.....	23
3.2.	Importância da toxoplasmose para saúde publica no Estado do Amapá.....	23
3.3.	Importância dos marcadores moleculares para a segurança alimentar.....	26
	REFERÊNCIAS.....	27
4.	CAPÍTULO I.....	31
	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EM GALINHAS CAPIRAS (<i>GALLUS GALLUS</i>) COMERCIALIZADAS EM FEIRAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE MACAPÁ – AP.....	31
	Introdução.....	33
	Material e Métodos.....	34
	Animais, coletas de amostras e aspectos éticos.....	35
	Análises Laboratoriais.....	36

Extração de DNA.....	36
Verificação da qualidade do DNA a ser obtido.....	36
<i>Primers</i> , Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Eletroforese.....	36
Purificação e Sequenciamento de DNA.....	37
Determinação da Árvore de Distância Genética.....	38
Análise Estatística	38
Resultados	38
Discussão	41
Conclusão	44
REFERÊNCIAS	45

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A toxoplasmose é uma doença com ampla distribuição geográfica, sendo considerada uma das infecções parasitárias mais comuns no mundo. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo *T. gondii*, protozoário parasito do filo Apicomplexa e agente etiológico da doença que afeta aves e mamíferos (Dubey, 2010; Pappas et al., 2009).

Devido a este fator, tornou-se de grande relevância e preocupação para a saúde pública, pois, sua presença em animais destinados ao consumo humano é um tema relevante para a segurança alimentar, uma vez que a infecção pode evoluir sua gravidade, causando morte em humanos e nos animais (Dubey; Jones, 2008).

No Brasil, a toxoplasmose é considerada uma doença endêmica, com incidência variável entre as regiões do país. Segundo dados do Ministério da Saúde, foram registrados 3.767 casos de toxoplasmose em 2020, sendo a região Sudeste a que apresentou maior número de casos (1.819), seguida pela região Sul (1.143) e Nordeste (596) (Brasil, 2021).

No Amapá, entre 2019 a 2023 foram registrados 133 casos notificados de toxoplasmose em gestantes, sendo 112 na área metropolitana de Macapá (84,21%), entretanto, destes, 23 eram de toxoplasmose congênita, sendo 19 casos somente na área metropolitana de Macapá, o que equivale ao percentual de 82,61% do total de casos notificados (Svs, 2023).

Diante do cenário mundial, é importante destacar a necessidade de estratégias de prevenção e controle da doença, que incluem medidas de higiene alimentar, controle da população de gatos e educação da população em relação aos riscos associados à toxoplasmose (Pappas et al., 2009; Dubey, 2010)

É notável a ocorrência de *T. gondii* no Brasil devido a diversos problemas como saneamento básico, clima favorável e por esse parasito possuir diversos hospedeiros intermediários de vida livre. Destes últimos, os frangos criados em propriedades rurais de forma extensiva se destacam, uma vez que esses animais desempenham papel importante na epidemiologia dessa doença em função de apresentarem maior possibilidade de adquirir a infecção e conseqüentemente transmitirem este protozoário ao ser humano (Millar et al., 2012).

Estes animais são encontrados com frequência em visitaçao às feiras livres e seu consumo torna-se mais evidente pela população de baixa renda (Dias et al., 2015), que muitas vezes utiliza esses locais como principal fonte para a compra de alimentos por se tratar de um ambiente com grande circulação de pessoas e alimentos.

A detecção de *T. gondii* em galinhas comercializadas em feiras livres pode indicar falhas na inspeção sanitária dos animais, bem como pode fornecer informações sobre a disseminação do parasita em áreas urbanas. Assim, é fundamental a realização de estudos para avaliar a presença de agentes patogênicos em alimentos comercializados nestas feiras.

A análise dos resultados obtidos por meio das técnicas moleculares tem como objetivo avaliar a presença de *T. gondii* em aves comercializadas em feiras livres, assim como contribuir com as autoridades sanitárias para melhoria da vigilância epidemiológica e para promoção da segurança alimentar.

No Estado do Amapá há alguns estudos publicados sobre prevalência da toxoplasmose em gestantes com ocorrência no município de Oiapoque, fronteira com a Guiana Francesa (Miranda et al.,2019). Porém, quando se trata do diagnóstico molecular e detecção da toxoplasmose em aves e sua importância em relação à saúde pública, é perceptível a escassez de informações técnicas.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi de diagnosticar a presença do *T. gondii* em galinhas abatidas em feiras livres da região metropolitana do município de Macapá no Estado do Amapá através da técnica de biologia molecular, a PCR, a fim de identificar os problemas de segurança alimentar ao consumidor.

Portanto, acreditamos que os resultados aqui apresentados neste estudo trazem ganhos significativos, pois contém informações essenciais para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle da toxoplasmose em humanos, uma vez que ao consumirem a carne deste animal mal cozida ou contaminada com o parasita, este também podem ser infectados, além de fundamentar as organizações de saúde locais e agência de defesa animal do Estado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Diagnosticar a presença de *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras (*Gallus gallus*) comercializadas nas feiras livres da região metropolitana de Macapá-AP.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar aves positivas para *T. gondii*;
- Mapear a distribuição de casos positivos de *T. gondii* nas feiras livres da região metropolitana de Macapá-AP;
- Fornecer informações às autoridades sanitárias sobre a prevalência do *T. gondii* em aves abatidas para consumo no município de Macapá.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Toxoplasmose

3.1.1. Agente etiológico

O *Toxoplasma gondii* foi relatado inicialmente no Instituto Pasteur da Tunísia, onde estágios desse microrganismo foram encontrados no baço, fígado e sangue do roedor norte-africano gundi (*Ctenodactylus gundi*) (Nicole; Manceaux,1908). Nesse mesmo ano foi também descoberto no Instituto Biológico de São Paulo em coelhos (Splendore,1908). Dessa maneira, foi classificado como *Toxoplasma gondii* (Nicole; Manceaux,1909).

Este é um protozoário da classe Apicomplexa, caracterizado por ser um parasita intracelular obrigatório que pode infectar uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados (Dubey, 2010). Possui forma de taquizoítos (forma rápida) e bradizoítos (forma lenta), que podem ser encontrados em diferentes tecidos e órgãos do hospedeiro (Montoya; Liesenfield, 2004).

A patogenia da toxoplasmose é complexa e ainda não é completamente compreendida. O *T. gondii* é capaz de infectar qualquer célula nucleada, incluindo células epiteliais e imunes, neurônios e células musculares (Sibley; Ajioka, 2008).

3.1.2. Ciclo biológico

O ciclo de vida do *T.gondii* é complexo e envolve diferentes formas infectantes, bem como hospedeiros intermediários. Seu principal hospedeiro e definitivo são os felídeos, particularmente os gatos, nos quais o parasito pode realizar seu ciclo completo (fase sexuada e assexuada) (Dockhorn Seger, 2021).

Os gatos, quando infectados, eliminam oocistos não esporulados nas fezes que se tornam infectantes após um período de maturação no ambiente, quando estes se tornam esporulados. Os oocistos são ingeridos por hospedeiros intermediários como mamíferos, destacando-se os roedores, além de aves, que desenvolvem cistos tissulares do parasita em diferentes órgãos e tecidos (Rodrigues et al, 2022).

Quando um gato ingere oocistos, bradizoítos ou taquizoítos, os parasitas são liberados no estômago. Assim eles penetram no epitélio intestinal e aumentam seu tamanho. Através do processo de merogonia, que é um tipo de reprodução assexuada, os parasitas se multiplicam e produzem múltiplos merozoítos (Neves et al., 2016). O processo pelo qual o parasita entra na célula hospedeira envolve uma endocitose ativa, onde a membrana celular da célula invadida não se rompe, mas se dobra para dentro para receber o Toxoplasma. Como resultado desse processo, o parasita induz o crescimento na membrana, o que leva à formação de uma estrutura denominada vacúolo parasitóforo (Rey, 2014). Um grupo de merozoítos que são produzidos dentro do vacúolo parasitóforo de uma célula é chamado de esquizonte maduro ou meronte. A liberação desses merozoítos ocorre durante a ruptura da célula parasitada, permitindo que invadam novas células epiteliais e proliferem de forma sucessiva (Neves et al., 2016)

Alguns desses merozoitos se diferenciam em gamontes, após um processo de amadurecimento, formam os gametas masculinos móveis (microgametas), bem como os femininos móveis (macrogametas). O macrogameta se desloca de sua célula para realizar a fecundação do macrogameta que persiste na célula epitelial, após a fecundação forma o zigoto e completa a fase sexuada denominada de gametogônia, fechando assim seu ciclo (Mineo, Almeida Vitor, 2016). Esta fase sexuada do *T. gondii* ocorre exclusivamente nas células epiteliais intestinais dos felídeos (Dubey; Frenkel, 1972).

Em diversos estudos realizados por Dubey, a eliminação de oocistos por parte dos felídeos ocorre entre três e dez dias após a ingestão de bradizoítos, entre 18 e mais dias após a ingestão de oocistos esporulados, e entre 13 e mais dias após a ingestão de taquizoítos. Entre

essas opções, o ciclo desencadeado por bradizoítos é considerado o mais eficaz nos felídeos. Isso se deve ao fato de que praticamente todos os gatos que foram alimentados com cistos teciduais eliminaram oocistos. Por outro lado, menos de 30% dos gatos alimentados com taquizoítos ou oocistos conseguiram eliminar oocistos com sucesso. É importante notar que, em comparação com outros coccídios, os oocistos de *T. gondii* são menos infecciosos e menos patogênicos para seus hospedeiros definitivos em relação aos seus hospedeiros intermediários (Dubey et al., 2011, Dubey et al., 1996, Dubey, 1996a; Dubey, 1996b; Dubey, 1996c). Milhões de oocistos são gerados devido à proliferação abundante do *T. gondii* no trato intestinal dos felinos, frequentemente sem manifestação de sintomas clínicos (Dubey; Frenkel, 1972).

Portanto, nos felídeos, ocorre o desenvolvimento enteroepitelial do parasita, resultando na formação de oocistos (Dubey, 1996). No entanto, nesses animais, além da multiplicação intestinal de natureza sexuada, também é evidente uma multiplicação assexuada extra-intestinal, envolvendo taquizoítos e bradizoítos, que pode ocorrer de forma paralela ou independente do desenvolvimento intestinal (Miller; Frenkel; Dubey, 1972).

3.1.3. Epidemiologia

A toxoplasmose é uma doença comum em todo o mundo, afetando uma ampla variedade de animais e humanos (Monteiro et al., 2018). A prevalência da infecção pelo varia de acordo com a localização geográfica, sendo que em países desenvolvidos a ocorrência é geralmente menor do que em países em desenvolvimento (Dubey, 2010).

No Brasil é considerada uma doença endêmica variando de acordo com a região e o extrato da população estudada. Além disso, a grande quantidade de chuvas em muitos ecossistemas do país exerce uma influência direta na manutenção desse elevado índice de contaminação. Isso ocorre em conjunto com as condições socioeconômicas precárias que são uma realidade para uma parte significativa da população brasileira, o que se torna um fator determinante (Caetano et al, 2021). A falta de saneamento básico é um dos componentes desse problema (Montañó et al., 2010; Fialho et al., 2009; Ministério da Saúde, 2010).

Em aves, a infecção costuma ser assintomática ou latente, com a presença de sintomas sendo rara (Gonçalves et al., 2013). De acordo com Hill e Dubey (2020), galinhas domésticas criadas de forma extensiva desempenham um papel significativo na epidemiologia da

toxoplasmose. Isso se deve não apenas ao fato de serem uma fonte de infecção para outros animais, incluindo gatos e seres humanos que consomem sua carne, mas também porque são consideradas um indicador confiável da contaminação do solo por oocistos de *T. gondii*. Por essa razão, são frequentemente utilizadas como animais sentinelas, dado o seu hábito de ciscar e a sua suscetibilidade à infecção pelo protozoário.

Estudos soropidemiológico têm demonstrado que o número de casos de infecção por *T.gondii* em humanos alcançam índices de 80% (Rodrigues et al, 2022). Os sinais clínicos da infecção toxoplasmática se manifestam em poucos indivíduos. Além disso, a diversidade de cepas e a variabilidade genética do parasito são fatores que influenciam na gravidade da doença em imunocompetentes (Pena et al., 2011).

3.1.4. Formas de Transmissão

O mecanismo de transmissão do *T. gondii* permaneceu um enigma até que seu ciclo de vida foi desvendado em 1970. Após a primeira descoberta desse organismo, foi observado que os *C. gundi* não estavam naturalmente infectados e adquiriram a infecção por *T. gondii* apenas em ambientes de laboratório (Flores, 2020). Inicialmente, havia suspeitas de que a transmissão ocorria por meio de artrópodes, mas essa teoria nunca foi confirmada. Pesquisadores como Chatton e Blanc (1917) em Tunis e Woke et al. (1953) e outros nos Estados Unidos investigaram a possível transmissão por diversas espécies de artrópodes, mas seus esforços resultaram principalmente em fracasso (Frenkel 1970, 1973 apud Dubey, 2008).

Basicamente, o *T. gondii* é transmitido por três vias: por meio da ingestão de alimentos contaminados - como carne crua ou mal cozidos infectados - ou água contaminada, bem como pelas fezes de gatos infectados (Montoya e Liesenfield, 2004). Contudo, outras formas de transmissão têm sido relatadas, como é o caso dos transplantes de órgãos (medula óssea, coração, rins e fígado), bem como pela transfusão de sangue e derivados infectados e por acidentes laboratoriais (Remington et al., 2011). Em geral, menos de 1% dos seres humanos e animais adquirem infecção por via transplacentária (Flores, 2020).

3.1.5. Toxoplasmose em Galinhas

As galinhas têm um papel significativo na cadeia de transmissão da toxoplasmose para humanos e outros animais, sendo até mesmo consideradas por alguns pesquisadores como o principal hospedeiro intermediário na epidemiologia da infecção por *T. gondii* (Dubey, 2009, Cong et al., 2012).

As galinhas podem contrair o parasita ao ingerir oocistos presentes em áreas terrestres contaminadas, especialmente aquelas que são criadas em ambiente de vida livre, como as galinhas caipiras. De acordo com Meireles (2001) e Dubey et al. (2005), as galinhas se infectam principalmente ao consumir oocistos encontrados em alimentos e no solo, devido ao seu hábito de ciscar e se alimentar diretamente do solo.

O solo é, sem dúvida, uma fonte significativa de transmissão do *T. gondii* e tem sido amplamente estudado no que diz respeito à relação entre a sua contaminação solo e as posteriores infecções deste protozoário nas galinhas (Liu et al., 2017).

Ademais, as galinhas demonstram maior resistência clínica e uma maior expectativa de vida em comparação com os roedores, o que as torna epidemiologicamente mais relevantes na disseminação das infecções por *T. gondii* em ambientes rurais em comparação com os roedores. Apesar de serem assintomáticas, essas aves são consideradas hospedeiros intermediários eficazes (Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2003; Dubey et al., 2005; Dubey, 2010).

Portanto, as galinhas são consideradas indicadores sensíveis da contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* e têm sido utilizadas como sentinelas (Schaes et al., 2018; Hamilton et al., 2019). A relevância das galinhas na epidemiologia deste parasita decorre de sua capacidade de servirem como indicadores úteis da contaminação do solo e do ambiente com oocistos, uma vez que se alimentam do solo e possivelmente ingerem oocistos depositados nas fezes de gatos infectados (Feng et al., 2016).

As galinhas, particularmente aquelas criadas em ambientes livres, estão frequentemente expostas ao *T. gondii* e têm o potencial de servir como um reservatório significativo da doença. Dessa maneira, os produtos oriundos da avicultura podem, portanto, representar um risco para os seres humanos quando são consumidos sem a cocção necessária (Silva et al., 2003, Ibrahim et al., 2018). No entanto, a probabilidade de transmissão por meio do consumo de ovos de galinha crus ou sem casca é extremamente baixa e esses não são

propensos a ser uma fonte de infecção para os seres humanos, como indicado por Dubey (2013).

De acordo com Millar et al. (2008), a transmissão da toxoplasmose de galinhas em escala industrial para humanos é de pouca relevância, isto se deve ao tipo de manejo que impede o contato com felinos ou outras fontes de contaminação. Porém, conforme informado anteriormente, nas criações em espaços abertos, as galinhas têm uma probabilidade maior de contrair a infecção por *T. gondii* e, conseqüentemente, de transmitir esse protozoário aos seres humanos (Millar et al., 2012). Os elevados índices de soropositividade em galinhas criadas ao ar livre são indicativos de uma alta contaminação do solo por oocistos do parasito (Zhu et al., 2008).

3.1.6. Toxoplasmose em Humanos

A toxoplasmose não é uma doença cujo hospedeiro definitivo é o ser humano, mas sim os felinos. No entanto, mesmo não sendo o hospedeiro definitivo, o *Toxoplasma gondii* ainda pode desencadear condições preocupantes em indivíduos imunocomprometidos, gestantes ou crianças muito jovens (Caetano et al, 2021).

Em humanos, a infecção por *T. gondii* pode levar a uma ampla gama de sintomas, que variam desde infecções assintomáticas até doenças graves em pacientes com sistema imunológico comprometido (Bennett et al., 2011). Nestes pacientes, na grande maioria das vezes se apresentam como assintomáticos ou apresentam apenas sintomas leves, como febre, fadiga, dor de cabeça e linfadenopatia (Neto et al., 2019).

Durante a gestação, quando um feto é infectado, os resultados para este podem variar. O bebê ao nascer pode apresentar características leves ou graves que incluem retinocoroidite, calcificações cerebrais, hidrocefalia, microcefalia e outras malformações congênitas (Holliman e Huskisson, 2008), em outras situações pode até mesmo levar este feto ao óbito na gestação ou durante/pós nascimento. Em função disso, a realização da triagem sorológica na primeira consulta pré-natal é fundamental, pois, analisar-se-á a presença de Anticorpos IgM e IgG específicos, sendo esse exame recomendado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2018).

A Toxoplasmose é uma doença em que determinadas profissões possuem um fator de risco maior, uma vez que podem evidentemente, ter algum contato com o protozoário. Médicos, médicos veterinários, açougueiros são alguns destes profissionais que estão mais

suscetíveis e expostos ao parasita e conseqüentemente sujeitos a uma contaminação (Silva, 2018).

A toxoplasmose aguda não é uma doença de notificação compulsória, contudo a portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016, tornou obrigatória a notificação da toxoplasmose gestacional e congênita. Assim, a investigação e diagnóstico ágeis dos casos agudos em gestantes desempenham um papel crucial na detecção de surtos, na rápida identificação da fonte de transmissão, na implementação imediata de medidas preventivas e de controle, bem como na administração oportuna de intervenções terapêuticas adequadas. Isso, por sua vez, contribui para a redução de complicações, sequelas e óbitos relacionados à doença. Além disso, a investigação em recém-nascidos possibilita a intervenção precoce nos casos confirmados da doença (Brasil, 2018).

3.1.7. Diagnósticos

Tradicionalmente, o diagnóstico da toxoplasmose se baseia na detecção de anticorpos contra o parasito, realizada por meio de testes sorológicos que identificam diferentes classes de imunoglobulinas anti-Toxoplasma, incluindo IgG, IgM, IgA e IgE. Esses testes representam o principal método laboratorial para diagnosticar a infecção. Além disso, a presença de anticorpos específicos para o *T. gondii* durante o curso da infecção permite a identificação de perfis sorológicos distintos, indicando infecção recente (caracterizada pela presença de IgM) ou infecção antiga em estado latente ou crônico (caracterizada pela presença de IgG). A infecção também pode levar à produção de IgA, tanto em casos de transmissão oral quanto em casos de toxoplasmose congênita (Contreras et al., 2000; Montoya, 2002; Foudrinier et al., 2003; Montoya & Liesenfeld, 2004).

Estudos recentes descobriram uma correlação positiva entre os níveis de IgA no soro e no colostro em casos de toxoplasmose congênita, bem como entre a presença de IgE em infecções ativas (Oliveira et al., 2015; Dard et al., 2016).

3.1.7.1. Diagnóstico Sorológico

Na prática clínica, o sorodiagnóstico desempenha um papel fundamental por ser a mais completa e adequada ferramenta para diagnosticar a infecção por *T. gondii* tanto em humanos quanto nos animais, devido serem mais rápidos e práticos (Van Der Puije et al., 2000).

O primeiro teste reconhecido e disponível para detecção específica contra *T.gondii*, chamado de reação de Sabin-Feldman (dye test) (Sabin e Feldman, 1948), ainda é amplamente reconhecido como teste de referência devido à sua sensibilidade e especificidade, mesmo após cinquenta anos de sua criação (Gonçalves, 2017). No entanto seu uso tem sido limitado devido à necessidade de usar *Toxoplasma* vivo, que acarreta sérios problemas de biossegurança, bem como não ser possível diferenciar anticorpos IgM e IgG (Reiter-Owona et al., 1999; Remington et al., 2001).

Existem várias técnicas disponíveis que têm a capacidade de detectar anticorpos específicos no sangue dos pacientes. Entre essas técnicas, destacam-se imunofluorescência, hemaglutinação, o teste de imunossorvente (ISAGA), o ensaio imunoenzimático (ELISA) ou o ensaio imunoenzimático com micropartículas (MEIA). Esses testes desempenham um papel importante no cenário de diagnóstico da infecção pelo *T.gondii* (Cantos et al., 2000; Ashburn, et al., 1998; Montoya e Liensfeld, 2004; Skinner et al., 2004).

No organismo humano, essa infecção, pode se apresentar de diversas formas, entretanto, estudos sorológicos apontam que 80% das infecções primárias por *T.gondii* são assintomáticas (Remington, 1994). Nesses testes sorológicos, são relatadas limitações ao detectar IgG e IgM, durante a fase ativa da infecção, e tem demonstrado que os anticorpos podem não ser produzidos durante as primeiras semanas de presença de parasitas no sangue (Mei-Hui et al, 2000).

3.1.7.2. Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular tem sido amplamente utilizado, com destaque para a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que amplifica o material genético do agente de

interesse usando iniciadores (primers) específicos, dessa maneira, tornando sua visualização mais acessível.

A aplicação da PCR na identificação de *T. gondii* é de grande importância, especialmente pela capacidade de detectar o DNA do parasito em produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Isso a torna uma ferramenta fundamental em programas de vigilância para garantir a segurança alimentar (Aspinall et al., 2002). Segundo Yan et al (2010), a PCR é uma técnica rápida, sensível e economicamente viável para a detecção do DNA do *Toxoplasma gondii* em galinhas. O grande ganho trazido por essa técnica é a possibilidade de detectar o parasito, mesmo quando presente em pequenas quantidades (Hurtado et al., 2001).

A PCR quantitativa também pode demonstrar dados adicionais que auxiliam na escolha do tratamento específico. Podendo relacionar a carga parasitária com a sintomatologia e tratamento. Esse método é de aplicabilidade para o controle da eficácia do tratamento e pode contribuir no entendimento da patogenética da reativação da toxoplasmose (Costa, et al, 2000).

3.1.8. Tratamento em humanos e animais

O tratamento da toxoplasmose depende do estágio da infecção e da condição imunológica do paciente. Em pacientes imunocompetentes com toxoplasmose aguda leve, o tratamento pode não ser necessário, pois a infecção geralmente se resolve espontaneamente em algumas semanas (Montoya e Liesenfield, 2004).

Em casos graves ou em pacientes imunocomprometidos, o tratamento é indicado e consiste na administração de medicamentos antiparasitários, como a Sulfadiazina, a Pirimetamina e o Ácido Folínico (Montagnani et al., 2018). A terapia combinada de dois ou mais medicamentos é frequentemente recomendada para aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade (Montagnani et al., 2018).

Em pacientes grávidas infectadas pelo *T. gondii*, o tratamento é recomendado para prevenir a transmissão vertical para o feto. A Espiramicina é o medicamento de escolha durante a gestação, pois é considerado seguro para o feto e eficaz na redução da transmissão vertical (Gomes et al., 2014).

3.1.9. Controle e Prevenção

A prevenção da infecção por *T. gondii* inclui medidas como a lavagem adequada das mãos, a higienização adequada de alimentos, a cozimento adequado de carne e a limpeza adequada de caixas de areia de gatos (Dubey, 2010). Além disso, a presença do parasita em aves comercializadas em feiras livres tem sido documentada em diversos estudos, sugerindo a importância de medidas de controle e prevenção da contaminação alimentar (Menezes et al., 2019; Neves et al., 2018).

No Brasil, o Ministério da Saúde orienta a prescrição de teste de triagem sorológico na primeira consulta pré-natal, através da detecção de anticorpos IgG e IgM específicos. Segundo o protocolo brasileiro, os resultados não reagentes para IgG e IgM apontam que a gestante é susceptível à infecção aguda e recomenda-se medidas de prevenção primária contra esta parasitose e posterior acompanhamento de todas as informações da gestação, especialmente em locais com elevada incidência dessa enfermidade (Brasil, 2018).

3.2. Importância da toxoplasmose para saúde pública no Estado do Amapá

A toxoplasmose, zoonose de distribuição mundial, representa uma importante preocupação na área da Medicina Veterinária, bem como da saúde pública no Brasil e no mundo. No Estado do Amapá, assim como para qualquer outra região do país, esta doença está principalmente relacionada aos aspectos de saúde pública e bem-estar da população. Assim, destacam-se alguns pontos relevância da toxoplasmose para o estado do Amapá que merecem reflexão.

O primeiro deles está relacionado à própria saúde pública, pois a disseminação da infecção pode ocorrer por várias vias conforme já relatado, como consumo de alimentos contaminados, contato com fezes de gatos infectados e transmissão de mãe para filho durante a gravidez. Isso significa que a toxoplasmose pode representar um risco para a saúde da população do amapaense. Como mencionado anteriormente, a toxoplasmose é particularmente preocupante durante a gravidez, pois pode ser transmitida da mãe para o feto. Isso pode resultar em malformações congênitas e sérios problemas de saúde para os recém-nascidos. Os

quadro 1 e 2 abaixo, demonstram a preocupação dos serviços de saúde do Estado na orientação e prevenção desta doença.

Quadro 1. Notificação individual de toxoplasmose em gestantes, nos Municípios residentes do Amapá, entre 2019-2023.

Município/ano	2019	2020	2021	2022	2023	Total
Amapá						
Calçoene						
Cutias			01			01
Ferreira Gomes						
Itaubal		01	02			03
Laranjal do Jari			01	01		02
Macapá	02	09	40	36	05	92
Mazagão		01	01	01	01	04
Oiapoque				01		01
Pedra Branca do Amapari			02			02
Porto Grande			03	03	01	07
Pracuúba						
Santana			13	02	01	16
Serra do Navio						
Tartarugalzinho			02	01	01	04
Vitória do Jari			01			01
Total	02	11	66	45	09	113

Fonte:SVS/SINAN/acesso em 06/06/2023.

Quadro 2. Notificação individual de toxoplasmose Congênita, nos Municípios residentes do Amapá, entre 2019-2023.

Município/ano	2019	2020	2021	2022	2023	Total
Amapá						
Calçoene				01	01	02
Cutias						
Ferreira Gomes						
Itaubal						
Laranjal do Jari						
Macapá	01		04	08	03	16
Mazagão					01	01
Oiapoque				02		02
Pedra Branca do Amapari						

Porto Grande							
Pracuúba							
Santana				02			02
Serra do Navio							
Tartarugalzinho							
Vitória do Jari							
Total	01	00	04	13	05		23

Fonte:SVS/SINAN/acesso em 06/06/2023.

Observa-se pelos dados apresentados que no ano de 2021 houve um aumento significativo em relação aos anos anteriores. Isto se dá, de acordo com o Boletim da Vigilância de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Estado do Amapá, elaborado pela Secretaria de Vigilância Sanitária – SVS/AP no ano de 2022, em função das estratégias de monitoramento e notificação de casos, implementados por recomendação do Ministério da Saúde, através da divulgação de notas técnicas, protocolos e oficinas sobre toxoplasmose que deram início em 2018 (SVS, 2022).

É possível visualizar o quantitativo de casos notificados em relação à Toxoplasmose gestacional, onde os anos de 2020 e 2021 apresentam um quantitativo maior. Este aumento deve-se ao fato de que nos anos anteriores estava ocorrendo a subnotificação de casos, porém em 2020 a vigilância estadual de toxoplasmose reforçou que a notificação passou a ser obrigatória (SVS, 2022). Segundo o mesmo documento, em 2019 foi confirmado 01 óbito por toxoplasmose congênita, porém só foi notificado no SINAN, em 2020. Portanto, esta enfermidade é relevante no sentido de se garantir a saúde materno-infantil no estado.

Outra preocupação se dá em relação à população vulnerável, como indivíduos imunocomprometidos devido a doenças crônicas, incluindo o HIV/AIDS. Esses grupos têm maior probabilidade de desenvolver complicações graves se infectados pelo *T. gondii*. Segundo dados do Serviço de Assistência Especializada e Centro de Testagem e Aconselhamento (SAE/CTA), em 2021, o Amapá registrou 338 novos casos de HIV/Aids. Desse total, a prevalência é de 62% para homens, com faixa etária de 21 a 30 anos. De acordo com o mesmo instituto, houve um aumento de 26% no número de casos em relação ao ano anterior. Logo, torna-se fundamental dedicar atenção à esse extrato da população amapaense.

Não menos importante é a preocupação que os órgãos responsáveis devem ter relacionados à segurança alimentar, pois, a toxoplasmose pode ser transmitida por meio do consumo de alimentos contaminados, como carne crua ou mal cozida. Logo, em um Estado como o Amapá que possui diversas feiras livres que comercializam produtos para a

alimentação da população local, a detecção precoce e a prevenção da contaminação destes alimentos são importantes para a saúde pública.

Portanto, a conscientização sobre a Toxoplasmose e as medidas de prevenção adequadas, como lavar bem os alimentos, cozinhar a carne completamente e evitar contato com fezes dos animais, são fundamentais para reduzir o risco de infecção no estado do Amapá. A promoção da educação em saúde e a conscientização sobre os riscos associados à Toxoplasmose podem contribuir para a redução da prevalência e das complicações relacionadas a essa infecção.

3.3. Importância dos marcadores moleculares para a segurança alimentar

A Segurança alimentar e nutricional (SAN) refere-se à garantia de um acesso constante e duradouro a alimentos em quantidades e qualidade adequadas, assegurando o direito humano à alimentação apropriada, sem prejudicar o acesso a outros direitos fundamentais. A SAN desempenha um papel crítico na avaliação das condições de vida das populações em áreas ou regiões vulneráveis, visto que a erradicação da fome permanece um dos desafios mais prementes enfrentados pela humanidade (Tanabe, 2022).

Em relação a questão dos processos de melhoramento dos alimentos que garantam essa segurança alimentar, o uso dos marcadores moleculares se torna de grande valia, pois eles têm sido cada vez mais utilizados visando uma maior eficiência na transferência de fatores genéticos (Oliveira, 2015), conseqüentemente, permitindo melhorias na qualidade dos alimentos consumidos pela população.

Segundo a definição, os marcadores moleculares consistem em segmentos de DNA que estão associados a locos responsáveis por controlar características de interesse (Toppa et al., 2013). Os marcadores moleculares ganham destaque significativo na caracterização de genótipos devido à sua invariabilidade ao ambiente, bem como à sua maior capacidade de reprodução e estabilidade. Além disso, esses marcadores são capazes de determinar com precisão as relações genéticas entre diferentes genótipos, ao contrário de outros tipos de marcadores (Schuster et al., 2004; Soller et al., 1983).

Com o crescimento da indústria agropecuária e a expansão de novos mercados consumidores, há uma crescente demanda por produção em larga escala, com custos de produção cada vez mais baixos, enquanto se mantém a qualidade. De acordo com Garcia e

Porto-Neto (2006), o Brasil está alinhado com essa tendência global. Para garantir a competitividade na produção de produtos derivados de animais em um cenário de mercados interno e externo em constante desenvolvimento, a indústria agropecuária brasileira tem direcionado investimentos para programas de melhoramento genético. O objetivo é aprimorar a eficiência da produção e a uniformidade dos animais e de seus produtos (Garcia & Porto-Neto, 2006).

Na avicultura, progressos notáveis têm sido conquistados ao longo das últimas décadas, com destaque especial para melhorias em características cruciais, tais como a eficiência na conversão alimentar, o tempo necessário até o abate e a taxa de crescimento (Neis et al, 2012). As principais vantagens de sua utilização estão relacionadas à capacidade de avaliar precocemente os animais para características específicas. Isso ocorre porque essa tecnologia se baseia na análise de amostras de DNA, permitindo a realização diagnóstica desde os estágios imediatamente após o nascimento, ou até mesmo durante a fase embrionária pré-implantação (Goes et al, 2012). Além disso, essa abordagem pode ser facilmente incorporada a programas de produção in vitro e transferência de embriões.

Os estudos de marcadores moleculares na produção de aves empenham-se atualmente na seleção de animais com o objetivo de aprimorar características que conduzam ao aumento da produção e à obtenção de produtos de alta qualidade, garantindo segurança alimentar aliado ao aumento dos lucros para o produtor. Esse aprimoramento é alcançado por meio da seleção criteriosa de características fenotípicas e genotípicas que não apenas aumentem a quantidade e a qualidade dos produtos, mas também confirmam resistência a fatores que possam prejudicar o desempenho produtivo (Goes et al, 2012).

Assim, os marcadores moleculares desempenham um papel crucial para segurança alimentar, pois fornecem ferramentas precisas e eficientes para a identificação, autenticação e rastreamento de alimentos.

REFERÊNCIAS

BASTIEN, P. **Diagnosis Molecular diagnosis of toxoplasmosis.** Trans R Soc Trop Med Hyg, v.96, suol.I, p.205-15,2002.

BENNETT, J. et al. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.** Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo de notificação e investigação. Toxoplasma gestacional e congênita.** Brasília. Ministério da Saúde; 2018. Vol.1.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Toxoplasmose: sintomas, tratamento e como prevenir.** [Brasília, DF]: Ministério da saúde, 2020. Disponíveis em: <https://w.w.w.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/toxoplasmose-1/toxoplasmose>.

BURG, L. et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain. **Journal of clinical microbiology**, v.27, n.8, p.1792-1792, 1989.

COSTA, J.M. et al. **Real-time PCR for diagnosis and follow-up of toxoplasma reactivation after allogeneic Stern cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes.** J Clin Microbiol, v.38, n.8, p.2929-32, 2000.

DUBEY, JP, & Beattie, C. (1988). **Toxoplasmosis in animals and man** (2nd ed.) CRC Press Boca Raton.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis.** Veterinary Parasitology, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans.** 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

DUBEY, J. P. et al. **Genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations.** Infection, Genetics and Evolution, v. 22, p. 238-244, 2014.

DEMARS, J. et al. **Validation of a commercially available, modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in human sera.** Clinical and Vaccine Immunology, v. 19, n. 1, p. 33-37, 2012.

FARES, W. et al. ***Toxoplasma gondii* infection and food consumption: a systematic review and meta-analysis of case-controlled studies.** Pathogenetics and Global Health, v.111, n.8, p.373-382, 2017.

FENG, Y. et al. **Comparative transcriptions reveals key gene expression differences between the human and bovine stages of the parasite *Toxoplasma gondii*.** BMC genomics, v.21, n.1, p.1-21, 2020.

HOLLIMAN, R; HUSKISSON, J. **Toxoplasmosis in pregnancy.** BMJ Clinical Evidence, v. 2008, p. 1-18, 2008. Jones et al, 2020.

HILL, D; DUBEY, J.P. ***Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis and prevention.** Clinical microbiology and infection, v.8, n.10, p.634-640, 2020.

LIAO, M. et al. **Seroprevalence and molecular detection of *Toxoplasma gondii* infection in backyard chickens (*Gallus gallus domesticus*) in Central China.** Parasitoses & Vectors, v.13, n.1, p.1-8, 2020.

MEI-HUI, L. et al. **Real time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii***. J Clin Microbiol, v.38, p.4121-5,2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Toxoplasmose. 2021. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-az/toxoplasmose>**. Acesso em: 12 de abril de 2023.

MIRANDA, K. C. I. et al. **Prevalência da toxoplasmose em gestantes no Oiapoque-Amapá, Fronteira com a Guiana Francesa/Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women in Oiapoque-Amapá, Frontier with French Guiana** (Brazilian Journal of Health Review, v. 2, n.4, p.2825-2834,2019).

MONTEIRO, M. et al. **Toxoplasmosis: A global infection**. Journal of Environmental and Public Health, v. 2018, p. 1-16, 2018.

MONTOYA, J.G. e Liesenfield, O. **Toxoplasmosis**. Lancet, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

NETO, V.A.F. et al. **Acute toxoplasmosis in immunocompetent patients: a systematic review of the literature**. International Journal of Infectious Diseases, v. 86, p. 25-32, 2019.

NICOLE, C.; Manceaux, L. **Sur une infection corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondii: on an infection by Leishman bodies in the gondii**. Compt rend acad de sc, v. 147, p. 763-766, 1908.

NICOLE, C.; MANCEAUX, L., 1909. **Sur un protozoaire nouveau du gondii**. In: Acad Sci. 1909. p. 763-766.

OLIVEIRA, L.N. et al. ***Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the northeast region of Brasil**. Veterinary parasitology, v.95, P.235-237, 2009.

PAPPAS, G; ROUSSOS, N; FALAGAS, M. E. (2009). **Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis**. International Journal for Parasitology 39, 1385–1394.

PENA, H.F.J. et al. **Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarondi (*Puma yagouaroundi*), and a Black-eared (*Didelphis aurita*) from Brasil**. Veterinary Parasitology, 2011.

REITER-OWONA, I. et al. **The past and present role of the Sabin-Feldman dye test serodiagnosis of toxoplasmosis**. **Bulletim of the World Health Organization**, v.77, n.11, p.929, 1999.

SIBLEY, L.D. e AJIOKA, J.W. **Population structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps**. Annual Review of Microbiology, v. 62, p. 329-351, 2008.

SILVEIRA, L. H. **Caracterização biológica e genotípica de *t. Gondii* obtidos de galinhas de criação livre do pantanal do mato grosso do sul**. 2009. 132 f. Doutorado (doutorado em epidemiologia experimental e aplicada as zoonoses) universidade estadual de São Paulo, São Paulo.

SPLENDORE, A. **Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo.** Nota preliminare pel. Rev Soc Sci Sao Paulo, v. 3, p. 109-112, 1908.

SROKA, S. et al. **Detection of Toxoplasma gondii DNA in horse meat and beef from supermarkets in Germany using a nested PCR.** Parasitology Research, v. 98, n. 1, p. 44-48, 2006.

STELZER, S. et al. **Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis in farm animals: risk factors and economic impact.** Food waterborne Parasitol.2019;15:e00037,doi:10.1016/j.faupar.2019 e 00037.

SU, J. et al. **Molecular characterization of Toxoplasma gondii isolates from pigs in central China.** Parasite, v. 26, p. 1-5, 2019.

SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAPÁ. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação.** Notificação individual. Toxoplasmose em gestantes. Toxoplasmose Congênita: Amapá,2019-2023.Acesso em 06/06/2023.

TENTER, A.M. et al. **Toxoplasma gondii: from animals to humans.** International Journal for Parasitology, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

WONG, S.Y; REMINGTON, J. S. **Biology of Toxoplasma gondii,** AIDS.v.7, n.3, p.299-316, 1993.

WONG, S.Y; REMINGTON, J.S. **Toxoplasmosis in pregnancy.** Elisa Infect Dis, v.18, n.6, p.853-61, 1994.

CAPÍTULO I

Diagnóstico Molecular de *Toxoplasma Gondii* em Galinhas Caipiras (*Gallus Gallus*)

comercializadas em feiras da região metropolitana de Macapá – AP

(de acordo com as normas da revista Pakistan Veterinary Journal)

Paulo de Tarso Tavares SANTANA¹, Washington Luiz Assunção PEREIRA², Rafaelle Casseb GUIMARÃES³, Cintia Luana Pinheiro SANTOS³, Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO³, Higo Gregório Silva FAVACHO⁴, Elizabeth Machado BARBOSA^{5*}, Ednaldo da SILVA FILHO³

¹ Superintendência de Vigilância em Saúde, SVS, Rua 13 de setembro, 1889, CEP: 68902-865, Macapá, AP, BR

² Laboratório de Patologia Animal, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2501 Av. Tancredo Neves, CEP 66077-830 Belém, PA, BR

³ Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2501 Av. Tancredo Neves, CEP 66077-830 Belém, PA, BR

⁴ Departamento do Colegiado de Licenciatura em Educação do campo: ciências agrárias e biologia, Universidade Federal do Amapá, S/N Av. Intendente Alfredo Pinto, CEP 68940-000, Mazagão, AP, BR

⁵ Setor de Campo, Instituto Federal do Amapá, S/N Rod. Perimetral Norte, CEP 68997-000, Porto Grande, AP, BR

*Corresponding author: elizabeth.barbosa@unifap.br; <https://orcid.org/0000-0001-5413-2138>

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi diagnosticar a presença do *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) em galinhas caipiras abatidas em feiras livres da região metropolitana de Macapá no Estado do Amapá. Foram coletadas em 36 animais, amostras tecidos do encéfalo e coração em 12 feiras da região metropolitana, sendo uma alíquota direcionada para a realização da Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) convencional e outra para exame histopatológico. Desde animais 72,2% (n=26) estavam positivos, sendo 58,3% (n= 21) positivos no tecido encefálico e cardíaco e 13,9% (n=5) somente no tecido encefálico e um total de 27,8% (n=10) de animais negativos. No exame histopatológico foi realizada leitura na busca do agente

(bradizoítas), porém sem maiores alterações observadas. Foi elaborada a árvore de distância genética após a realização do sequenciamento e foram observadas três sequências de grupos distintos e um grupo formado com a distância mínima entre 98 sequências com alto grau de identidade, incluindo a sequência determinada no presente estudo. Com os resultados obtidos neste trabalho e realizando uma análise espacial possibilitou-se verificar que as amostras de tecido cardíaco e encefálico positivas para *T. gondii* são de aves vendidas em 91,6% das feiras localizadas na região metropolitana do Estado do Amapá, podendo ser uma importante fonte de infecção de *T. gondii* ao ser humano. Diante disso, políticas públicas devem ser pensadas no Estado do Amapá para mitigar os efeitos da contaminação desta proteína animal vendidas nas feiras da região metropolitana do Estado diante da possibilidade de se tornar uma emergência em saúde pública.

Palavras-chave: Toxoplasmose, PCR, *T. gondii*, *Gallus gallus*

ABSTRACT: The objective of this study is to diagnose the presence of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) in free-range chickens slaughtered at open markets in the metropolitan region of Macapá in the State of Amapá. Samples of brain and heart tissues were collected from 36 animals at 12 markets in the metropolitan region, with one aliquot directed for conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) and another for histopathological examination. Of these animals, 72.2% (n=26) were positive, with 58.3% (n=21) positive in both brain and heart tissues, 13.9% (n=5) positive only in brain tissue, and a total of 27.8% (n=10) negative animals. In the histopathological examination, a search for the agent (bradyzoites) was conducted, but no significant alterations were observed. A genetic distance tree was constructed after sequencing, revealing three distinct group sequences and one group formed with a minimum distance among 98 sequences with a high degree of identity, including the sequence determined in this study. With the results obtained in this work and conducting a spatial analysis, it was possible to verify that the positive heart and brain tissue samples for *T. gondii* are from birds sold at 91.6% of the markets located in the metropolitan region of the State of Amapá, potentially being an important source of *T. gondii* infection to humans. Therefore, public policies should be considered in the State of Amapá to mitigate the effects of contamination of this animal protein sold at markets in the metropolitan region of the State, given the possibility of becoming a public health emergency.

Keywords: Toxoplasmosis, PCR, Diagnosis, *Gallus gallus*.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita, estima-se que um terço da população mundial já tenha sido infectada. É causada pelo *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), um protozoário coccídeo intracelular obrigatório que acomete o homem e os animais homeotérmicos (hospedeiros intermediários), sendo os felídeos selvagens e domésticos os hospedeiros definitivos do parasito (Aspinall et al., 2002, Pappas et al., 2009; Dubey, 2010).

No Brasil, a toxoplasmose é considerada uma doença endêmica, com incidência variável entre as regiões do país. Segundo dados do Ministério da Saúde, foram registrados 3.767 casos de toxoplasmose em 2020 (Brasil, 2021). No Amapá, entre 2019 a 2023 foram registrados 133 casos notificados de toxoplasmose em gestantes, sendo 112 na área metropolitana de Macapá (84,21%) (SVS, 2023).

Diante dos dados, esta enfermidade ganhou um destaque e tornou-se uma preocupação para a saúde pública, pois, sua presença em animais destinados ao consumo humano é um tema relevante para a segurança alimentar, uma vez que a infecção pode evoluir em gravidade, causando morte em humanos e nos animais (Dubey; Jones, 2008).

Segundo Filho et al. (2021), a carne de frango foi a fonte de proteína animal que mais cresceu nos últimos 40 anos. No cenário atual o Brasil lidera o ranking de maior exportador mundial de carne de frango, aportando mais de 35,98% das exportações globais (13,826 milhões de toneladas), seguido pelos Estados Unidos (23,24%) e pela União Europeia (12,01%) como os três maiores exportadores (USDA, 2024).

No Brasil, criação extensiva galinhas caipiras (vida livre) foi estimulada pela preferência dos consumidores por produtos naturais e com menor quantidade de resíduos químicos, além de ser uma ótima alternativa para a agricultura familiar e para o meio ambiente (Barros, 2020).

Para a família se constituiu mais uma alternativa de renda, alimentos e seus excrementos podem ser utilizados para adubação de fruteiras. Com a implantação de criatórios de galinhas de capoeira as famílias vão poder ter uma melhor alimentação e até gerar lucros. Além disso, é uma atividade totalmente sustentável, e, com o manejo adequado, não há degradação do meio ambiente (Barros, 2020). Estes animais são encontrados com frequência em visitações às feiras livres e seu consumo torna-se mais evidente pela população de baixa renda (Dias et al., 2015), que utiliza esses locais como principal fonte para a compra de alimentos.

Em 2019 devido à pandemia do SARS-CoV-2 especialistas chamam a atenção de produtores para questões sanitárias importantes na criação de animais que podem ser fontes de doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e parasitos, que podem ter potencial zoonótico (Embrapa, 2020).

Segundo Fernandes e Silva (2001) a falta de um controle sanitário e treinamento técnico de manejo tem tornado a criação de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) um risco à sua comercialização demonstrando a necessidade de uma vigilância sanitária mais ostensiva, gerando a necessidade de estratégias de prevenção e controle de doenças, que incluem medidas de higiene alimentar, controle da população de animais domésticos e educação da população em relação aos riscos associados a zoonoses (Pappas et al., 2009; Dubey, 2010).

Em galinhas, a toxoplasmose apresenta predominantemente a forma subclínica, apresentando pouca importância clínica para essa espécie (Dubey et al., 2007, 2010 2020). As galinhas de criações domésticas são consideradas importantes na epidemiologia desta doença, pois são fontes de transmissão tanto para o homem quanto para o gato, favorecendo, por meio deste último, a disseminação da doença pela eliminação de oocistos no meio ambiente (Dubey et al., 2020).

As galinhas de vida livre têm sido amplamente utilizadas para rastrear indiretamente a contaminação ambiental com oocistos de *T. gondii* devido ao seu hábito de se alimentarem diretamente no solo (Shwab et al., 2014). A detecção de *T. gondii* em galinhas comercializadas em feiras livres pode indicar falhas na inspeção sanitária dos animais, bem como pode fornecer informações sobre a disseminação do parasita em áreas urbanas.

Os estudos relacionados à ocorrência de *T. gondii* em animais de produção ainda são insipientes, e na busca de identificar e obter resultados mais efetivos, as técnicas moleculares visam avaliar a presença de *T. gondii* em aves comercializadas, bem como contribuir com as autoridades sanitárias para melhoria da vigilância epidemiológica e para promoção da segurança alimentar.

Diante disso, o objetivo deste trabalho é diagnosticar a presença do *T. gondii* em galinhas abatidas em feiras livres da região metropolitana do município de Macapá no Estado do Amapá através da técnica de biologia molecular, a PCR, a fim de identificar possíveis problemas de segurança alimentar a este consumidor.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS, COLETAS DE AMOSTRAS E ASPECTOS ÉTICOS

Todos os aspectos dessa pesquisa foram conduzidos de acordo com todos os padrões do bem-estar animal determinados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) do Brasil e aprovados em 30 de novembro de 2023 pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) protocolo UFRA 6216180923 (ID 000645) (Anexo 1).

Foram adquiridas três (3) galinhas e/ou frangos caipiras (*G.gallus*) junto a doze (12) feirantes de localidades distintas escolhidos aleatoriamente (figura 1), em nove (9) feiras, totalizando trinta e seis (36) animais. Para cada animal já abatido foram retiradas duas amostras: uma (1) de coração e uma (1) de encéfalo embalado individualmente e devidamente identificado com: número da amostra, local da feira e data (resfriados e posteriormente congelados), para a realização de setenta e duas (72) reações para o diagnóstico molecular no Laboratório de Microbiologia/Imunologia (BIOMOL) do Departamento de Medicina no Campus da Universidade Federal do Amapá.

Além disso, foram coletados para todas as galinhas e/ou frangos caipiras uma (1) amostra de coração e uma (1) amostra de encéfalo para exames histopatológico. Estas foram acondicionadas em solução de formol 10%, sendo posteriormente coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio ótico.

FIGURA 1. Mapa da Região metropolitana de Macapá com as respectivas feiras.



Fonte: google maps, acesso em:01/06/2023.

ANÁLISES LABORATORIAIS

Extração de DNA

A extração do DNA de 36 amostras de coração e de 36 amostras de encéfalo dos animais coletados foram realizadas através do protocolo de extração de tecidos estipulado por Pearson e Stirling (2003, 33-34 p.). Posteriormente, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro BioDrop (Thermo Scientific, Wilmington, UK) com absorvância a 260 nm sendo a pureza determinada pelas razões A260/230 e A260/280. Por último, o material foi congelado e armazenado a 4°C.

Verificação da qualidade do DNA a ser obtido

Após as extrações, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão de aplicação TAE 1X (Tris base 40 mM; Ácido acético glacial 20 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), utilizando 2µL do DNA extraído com 2µL do mix de Blue/Gelred (1:1) a 90V, por aproximadamente 30 minutos

Primers, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Eletroforese

Foram utilizados os primers de *T. gondii* descritos por Silveira (2009), dispostos na tabela 1.

Tabela 1. Sequências do par de primers de *T. Gondii*

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho (PB)
Forward	GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG	193
Reverse	TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC	

Para a amplificação do par de *primers* foi realizada a PCR (Reação em cadeia de Polimerase), com o volume final de 20 μL , sendo 1,0 μL de DNA e 10 μL Taq DNA Polymerase 2x Master Mix (Ampliqon, Odense, Denmark) com a seguinte composição (concentração final de MgCl_2 de 1,5 mM, Tris-HCl pH 8,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 mM MgCl_2 , 0,2% Tween® 20, 0,4 mM de cada dNTP, DNA polimerase Ampliqon Taq e Estabilizador), 0,8 μL de cada *primer - forward e reverse* - (8 pmol/ μL), 1,0 μL (5%) de Solução-Q (Quiagen, Brasil) diluídos em 6,4 μL de água ultra pura.

As reações foram realizadas em um Termociclador (2720 *termal cycler Applied Biosystem*) sob as condições de temperatura e tempo que estão detalhadas na tabela 2.

Tabela 2. Programação do termociclador utilizado nas reações da PCR de *T. Gondii*

Fases	Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo	Ciclos	
Desnaturação inicial	95,0	5 min		
Desnaturação	95,0	30 seg		
Ciclo	Anelamento	62,0	40 seg	35
	Extensão	72,0	50 seg	
Extensão final	72,0	7 min		

Os produtos finais dos PCR's foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0 % com corrente de 100 V/ 90mA por 60 minutos. A visualização dos tamanhos dos fragmentos (pb), ocorreram por meio do Transiluminador de luz ultravioleta M-20 (UVP) com o uso de um padrão de massa molecular *Ladder* de 1000 pb como referência.

Purificação e Sequenciamento de DNA

Os produtos das PCRs foram purificados utilizando o kit de Purificação de produtos de PCR em coluna (*Ludwig Biotec LTDA*, Alvorada, RS, BR), seguindo as recomendações do fabricante e foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% com corrente de 100 V/ 90mA por 45 minutos e a visualização ocorrerá através do Transiluminador de luz ultravioleta M-20 (UVP).

Os produtos purificados foram sequenciados por meio do método de Sanger utilizando o reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen Califórnia/EUA)* em um

volume final de 10 µL em um sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa *Finch TV* versão 1.4.0 (Geospiza Research Team, USA), e a ferramenta BLAST para contrastar com as correspondentes sequências de referência de búfalos inseridas no NCBI *GenBank*, e por fim foram alinhadas no programa BioEdit 7.2 usando alinhamento múltiplo ClustalW.

Determinação da Árvore de Distância Genética

A sequência descrita pelas amostras positivas foi alinhada através do método BLAST do GenBank com as sequências encontradas com identidade para o gene B1 de *Toxoplasma gondii*. Em seguida, foi solicitada a elaboração de uma árvore de distância genética pelo método de Neighbor Joining.

Análise Estatística

Os dados foram tabuladas em planilhas e determinadas as frequências absolutas e relativas das amostras positivas e negativas para *Toxoplasma gondii*. Uma análise de discordância foi estabelecida pelo teste de McNemad para as amostras individualmente avaliadas para os tecidos de coração e encéfalo juntamente. Todas as análise foram realizadas pelo programa computacional SAS OnDemand com nível de significância de 5%.

Resultados

De um total de 36 animais foram coletados tecidos do encéfalo e coração, destes uma alíquota foi direcionada para a realização da PCR convencional e outra para realização do exame histopatológico.

Através da análise molecular pela técnica de PCR convencional foram observados tecidos positivos e negativos para a presença de DNA de *Toxoplasma gondii*. Foram

observados 72,2% (n=26) de animais positivos, sendo 58,3% (n= 21) animais positivos diagnosticados no tecido encefálico e cardíaco e 13,9% (n=5) no tecido encefálico. Observou-se um total de 27,8% (n=10) de animais negativos nos dos tecidos coletados (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de associação de discordância dos resultados entre os tecidos de acordo com os indivíduos pelo teste de McNemar.

Coração	Encéfalo	N (%)	Coração	Encéfalo	N (%)
Positivo	Positivo	21 (58,3)	Positivo	Negativo	0 (0,0)
Negativo	Negativo	10 (27,8)	Negativo	Positivo	5 (13,9)
	Total	31 (86,1)	Total	Total	5 (13,9)
	P-Valor*	0,073	P-Valor*	P-Valor*	0,074

*P-Valor= Probabilidade pelo Teste de McNemar.

Vale destacar que as feiras com as identificações de A a F, todos os seus animais analisados foram positivos para *T. gondii*, enquanto que apenas as feiras G (origem Comunidade Padre Josino) e a I possuíram todos os seus animais negativos como observados na tabela 4.

Tabela 4. Identificação dos animais positivos e negativos de acordo com a feira de compra, origem e municípios.

Identificação	Feira	Origem dos animais	Município	Resultados dos animais	
				Positivo	Negativo
A	Mercado Central	Comunidade Tracajatuba	Ferreira Gomes – AP	3	0
B	Perpetuo Socorro	Comunidade Curralinho	Macapá – AP	3	0
C	Buritizal	Monte Alegre	Monte Alegre - PA	3	0
D	Mazagão	Comunidade do Ajudante	Mazagão – AP	3	0
E	Monte Castelo	Monte Castelo	Casa Grande - AP	3	0
F	Marabaixo	Goiabal	Macapá – AP	3	0
G	Novo Horizonte	Curiaú	Macapá – AP	3	0
		Maruanum		2	1
		Comunidade Padre Josino		0	3
		Novo Horizonte		1	2
H	Santana	Comunidade do Cupixi	Porto Grande - AP	2	1
I	Pacoval	Ilha Redonda	Macapá – AP	0	3
Total				26	10 (27,8%)
				(72,2%)	

As amostras positivas para *Toxoplasma gondii* detectados pelo PCR convencional de acordo com a sequência do gene B1 foram sequenciados para tomar como prova a consistência das reações. Os amplicos de 193 pb foram sequenciados em ambos os sentidos forward e reverso e geradas sequências consensos e confrontadas com as sequências depositadas no GenBank. Todas as sequências foram confirmadas para *Toxoplasma gondii* de acordo com a sequência com identidade ID: LN714499.1 (Figura 2).

Figura 2. Sequência com identidade ID: LN714499.1

TPA_asm: Toxoplasma gondii VEG, chromosome chrIX, complete genome
GenBank: LN714499.1

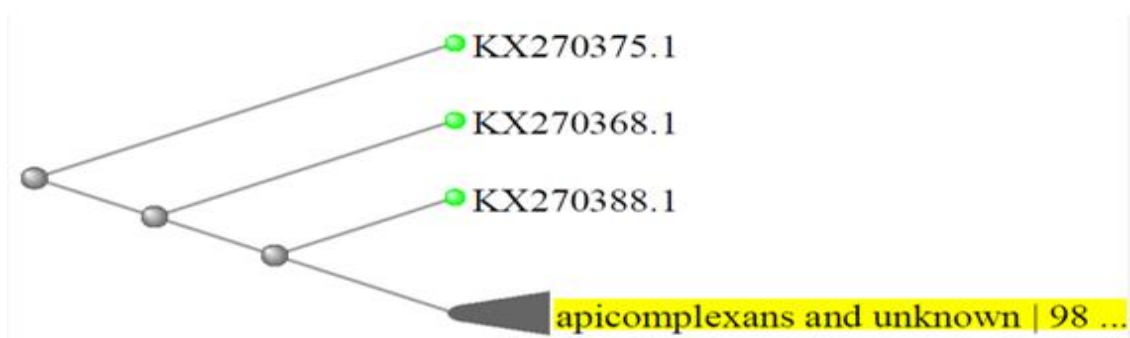
```

1   ggaactgcat ccgttcatga gtataagaaa aaaatgtggg aatgaaagag
51  acgctaattgt atttgcataag gttgcagtcg ctgacgagct cccctctgct
101 ggcgaaaagt gaaattcatg agtatctgtg caactttggt gtattcgcag
151 attggtcgcc tgcaatcgat agttgaccac gaacgcttta aaga

```

Uma árvore de distância genética foi elaborada a partir de 100 sequências disponibilizadas no GenBank. Podemos observar três sequências que formam grupos distintos e um grupo formado com a distância mínima entre 98 sequências com alto grau de identidade, incluindo a sequência determinada neste trabalho (Figura 3).

Figura 3. Árvores de distancia genéticas dos animais testados.



Quando ao resultado do exame histopatológico os tecidos encefálicos e cardíacos das aves coletadas, o diagnóstico é realizado na busca do agente (bradizoítas), no coração foram encontrados pequenos focos de miocardite crônica com presença de alguns plasmócitos e linfócitos discretamente infiltrados, o que não causa sintomatologia e é inespecífica apenas em quatro casos. E no tecido encefálico sem alterações dignas de nota.

Discussão

A utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um grande avanço para o diagnóstico da infecção por *T. gondii*. Vários estudos a utilizaram a técnica demonstraram maior acurácia, sensibilidade e especificidade da técnica de PCR quando comparados a outras metodologias tradicionais (Dehkordi et al., 2013), além disso, o diagnóstico pode ser confirmado em um dia, com maior possibilidade de detecção de pequenas quantidades de DNA alvo e, potencialmente, fornecem uma ferramenta de diagnóstico sensível alternativa (Sah et al., 2019).

A PCR para a detecção de *T. gondii* foi usada pela primeira vez por Burg et al. (1989), tornando-se referência para Dubey (2010), Holsback et al. (2012) e Pena et al. (2012), que utilizaram este teste para a detecção de DNA deste parasito em vários materiais biológicos, incluindo coração e cérebro. A detecção do *T. gondii* pela biologia molecular indica a existência de contaminação ambiental na região e demonstra a circulação do parasita (Santos Silva et al., 2020).

Neste estudo foi utilizada a para a detecção do DNA de *T. gondii* nas amostras de coração e cérebro um par de *primers* correspondente a um fragmento do gene B1 de *T. gondii* de 193 pares, região utilizada na maioria dos estudos para a detecção molecular de *T. gondii* com alvos regiões dos genes B1, P30 e 18S rDNA do parasito (Buchbinder et al., 2003; Tenter, 2009; Holsback et al., 2012).

O alvo mais utilizado para a detecção de *T. gondii* por PCR são as regiões do gene B1, por se tratar de um local bem conservado em muitas cepas do parasito (Kompalic-Cristo et al., 2005). Além disso, a especificidade deste alvo já foi comprovada em estudos usando amostras clínicas (Wong e Remington, 1994; Holsback et al., 2012). Como na realização deste estudo foram utilizadas amostras de cérebro e coração para a detecção do parasito, o gene B1 foi usado como região alvo, a fim de se obter um melhor resultado nas ampliações.

Foram analisadas 9 feiras da região metropolitana do Estado do Amapá apresentando 91,6% de positividade entre as amostras de tecidos encefálicos e cardíacos das galinhas caipiras comercializadas, resultado superior ao encontrado por Silva Neto et al (2022) que ao analisar 20 feiras, detectaram DNA de *T. gondii* em 16 feiras (80%), o que mostra a disseminação do parasito por diversas regiões da cidade.

Destaca-se ainda que das 36 galinhas caipiras foram observados 72,2% (n=26) de animais positivos, sendo 58,3% (n= 21) animais positivos diagnosticados no tecido encefálico e cardíaco e 13,9% (n=5). Dubey et al. (2004), estudando a infecção do *T. gondii*, mostraram

que o parasito é mais frequente nos tecidos musculares (musculatura esquelética e coração) do que no cérebro, o que não foi constatado no presente estudo, posto que dos 26 (72,2%) animais positivos todos foram na análise de tecidos encefálico. Para Silveira Neto et al (2022) houve correspondência entre a positividade encontrada do pool de amostras coração e do pool de amostras cérebro, diferente do encontrado no presente estudo utilizando um ou dois tecidos individualmente.

Quando comparada a técnica de PCR com a sorologia, Silveira Neto et al (2022) ao analisar a frequência de aves soropositivas e de resultados PCRs positivos na população estudada em Goiânia- GO, das 80 aves 70 % do resultado positivo foi superior na PCR enquanto que a sorologia por MAD foi de 38,75% título da sorologia. Tal resultado também já foi comprovado por Silveira (2009).

A justificativa foi apresentada por Aigner (2008) que ao observar que aves negativas na sorologia podem ter resultados positivos na detecção de DNA por PCR assim como aves positivas na sorologia, mesmo com altos títulos, podem ter resultados negativos na PCR. Este fato pode ser explicado pela ausência de cistos do parasito no fragmento analisado, mostrando a importância de se aumentar o número de amostras pesquisadas.

No Egito, Rong et al. (2014) analisou 304 amostras relatando a prevalência média de 8,5% de *T. gondii* em sangue e cérebro de galinhas através dos exames de ELISA, histopatologia e IHC. Cong et al. (2012) examinando 800 amostras, e encontraram uma soroprevalência de anticorpos contra *T. gondii* (MAT) de 7,26% em galinhas na China.

Hamilton et al. (2019) avaliando galinhas de Antígua e Barbuda, Dominica e Trinidad detectaram 20,5, 38,2 e 17,1%, respectivamente, de prevalência para anticorpos contra *T. gondii*. Yang et al. (2012) estudaram a soroprevalência de *T. gondii* em 502 galinhas adultas (MAT) obtiveram 11% para galinhas criadas ao ar livre e 5% para galinhas em cativeiro. Liu et al. (2017) verificaram influência das formas de criação na prevalência, evidenciando prevalência de 67,14% em animais de vida livre e 41% e granja.

Dubey et al. (2005) estudando a prevalência de *T. gondii* em galinhas caipiras na Áustria observaram que 36,3% das galinhas apresentaram anticorpos contra *T. gondii* (MAT). Dubey et al (2007) relatou uma ocorrência de 46,4% em um estudo com 84 galinhas caipiras criadas livres nos estados do Pará e Rio Grande do Sul. De acordo com esses autores a soropositividade para toxoplasmose está diretamente ligada ao tipo de manejo, sendo que galinhas criadas em criação livre ou extensiva são mais susceptíveis.

Millar et al. (2012) comprovou que o sistema de produção está diretamente envolvido na infecção pelo *T. gondii* quando comparada a ocorrência do parasita em frangos de corte (12%) com galinhas poedeiras (33%).

A técnica de PCR se mostrou viável para detectar DNA de *T. gondii* em amostras primárias de aves caipiras, porém Silva Neto et al (2022) afirma que pool de amostras da víscera a ser analisada pode ser mais eficiente, pois como o número de cistos pode ser pequeno e nem sempre há DNA suficiente para detecção ou pode não haver DNA naquele fragmento analisado, sendo esta uma opção

Esta variação foi evidenciada pelos autores supracitados quanto a positividade, ao se analisar diferentes fragmentos do mesmo tecido, sendo detectadas 25 (31,25%), 15 (18,75%) e sete (8,75%) na análise dos fragmentos 1, 2 e 3, respectivamente de parte do tecido encefálico, demonstrando a importância de se extrair mais de um fragmento da mesma víscera, pois aumenta a chance de detecção do DNA do parasito na amostra, conforme relatado anteriormente por SILVEIRA (2009), que obteve 25% a mais de amostras positivas na PCR de tecidos de galinhas caipiras quando usou a extração em triplicata. Rezende et al (2021), utilizou tecidos homogeneizados, e as amostras resultantes foram analisadas por reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilitou a detecção do DNA do parasito em 64%.

Vale destacar ainda, que localização geográfica pode influenciar na soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em animais em sistema de criação extensiva, fazendo com que essas aves possam ser consideradas sentinelas de contaminação ambiental, sinalizando o risco para saúde pública (Neto et al 2008), o que foi evidenciado neste estudo, pois, os animais analisados nesta pesquisa são oriundos de pequenas criações extensivas de comunidades localizadas no Estado do Amapá e do Pará.

Com relação aos achados histopatológicos inespecíficos no coração de quatro animais com a presença de miocardite crônica, pois os animais não apresentavam sintomatologia aparente bem como Dubey et al (2007, 2010 2020), enfatizam em seus estudos destacando a presença da forma subclínica da toxoplasmose em galinhas, apresentando pouca importância clínica para essa espécie, logo não podemos afirmar que tais alterações são desta doença. Muito embora, Bonapaz et al. (2010) e Shiraishi et al. (2009) analisando duodenos e íleo, respectivamente, encontraram alterações histomorfométricas e marcações histoquímicas da parede intestinal de aves infectadas. Literák e Hejlíček (1993) registraram através fotomicrografia cisto tecidual presente na tela submucosa do duodeno e do íleo de um frango infectado com uma cepa do genótipo II de *Toxoplasma gondii*.

Conclusão

O *T. gondii* encontra-se amplamente distribuído pelo mundo sendo influenciado por fatores climáticos, ambientais e socioeconômicos podendo sofrer variações conforme a região em que se encontra.

A toxoplasmose se manifesta em varias espécies, podendo causar abortos e doença congênita em homens e animais. Possui elevado impacto econômico em decorrência da gravidade dos sinais clínicos em diversos tipos de hospedeiros, complicações associadas, tratamento e os custos sociais.

Neste estudo foram observados 72,2% (n=26) de animais positivos, sendo 58,3% (n=21) animais positivos diagnosticados no tecido encefálico e cardíaco e 13,9% (n=5) no tecido encefálico. Diante disso e realizando uma análise espacial possibilitou-se verificar que as amostras de tecido cardíaco e encefálico positivas para *T. gondii* são de aves vendidas em 91,6% das feiras localizadas na região metropolitana do Estado do Amapá, podendo ser uma importante fonte de infecção de *T. gondii* ao ser humano.

Além disso, o elevado número de aves positivas indica a possibilidade de as mesmas participarem do ciclo biológico do parasito, diante da contaminação do solo com oocistos esporulados, servindo de fonte de infecção seja para os felídeos ou para o ser humano.

Por fim, é indispensável conscientizar a população sobre segurança alimentar, guarda responsável de gatos e manejo sanitário correto de animais de produção, a fim de evitar os riscos de infecção pelo *T. gondii*.

Por trata-se de um trabalho de grande relevância e inédito no Amapá, consideramos que os dados apontados podem subsidiar políticas públicas pensadas no Estado para mitigar os efeitos da contaminação desta proteína animal vendidas nas feiras da região metropolitana de Macapá diante da possibilidade de se tornar uma emergência em saúde pública.

Ademais, a criação da cartilha subsidiada pelos dados obtidos através deste estudo será sugerida aos órgãos para que a utilizem em ações de conscientização tanto com os feirantes como com a população em geral.

REFERÊNCIAS

- AIGNER, C. P. **Análise molecular de *Toxoplasma gondii* em tecidos de *Gallus gallus* utilizando a pcr em tempo real**. 52 f. Dissertação (mestrado em biotecnologia aplicada à agricultura da universidade paranaense) - universidade paranaense, umuarama, paraná. 2008.
- ASPINALL, TANYA V.; MARLEE, DAMIAN; HYDE, JOHN E.; Sims, P.F.G. In: **International Journal for Parasitology**, Vol. 32, nº 9, p. 1193-1199, 2002.
- BARROS et al. **A importância da galinha capoeira na agricultura familiar**. 2020. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0704-1.pdf>. Acesso: em 07/01/2020
- BONAPAZ, R.S.; HERMES-ULIANA, C.; SANTOS, F.N. et al. Efeitos da infecção por oocistos de *Toxoplasma gondii* sobre a parede intestinal e o plexo mientérico de *Gallus gallus*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.30, p.787-792, 201
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Toxoplasmose. 2021. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-az/toxoplasmose>**. Acesso em: 12 de abril de 2023.
- BUCHBINDER, S.; Blatz, R.; RODLOFF, A. C. Comparison of real-time pcr detection methods for b1 and p30 genes of *Toxoplasma gondii*. **Diagnostic microbiology and infectious diseases**, v. 45, p. 269-71, 2003.
- BURG, J. L. Et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal clinical microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1787-1792, 1989
- DEHKORDI, F. S.; RAHIMI, E.; ABDIZADEH, R. Detection of *Toxoplasma gondii* in Raw Caprine, Ovine, Buffalo, Bovine, and Camel Milk Using Cell Cultivation, Cat Bioassay, Capture ELISA, and PCR Methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**. Volume 10, Number 2. 2013. Doi: 10.1089/fpd.2012.
- DIAS, A. O. et al. Consumo de carne de frango e de ovos de aves de granja pela população da região de Petrolina. **Extramuros – Revista de Extensão da Univasf**, v.3, nº 1, jun. 2015.
- DUBEY J; JONES, J. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **Int J Parasitol**. 2008; 38(11): 1257–78.
- DUBEY, J. P. et al. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary parasitology**, v. 143, n. 2, p. 182–8, 2007
- DUBEY, J. P. et al. Epidemiologic significance of *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): The past decade. **Parasitology**, v. 147, n. 12, p. 1263–1289, 2020.
- DUBEY, J. P. et al. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. **Lehmannc** Volume 133, Issue 4,2005, Pages 299-306.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health*, v. 57, n. 1, p.60–73, 2010.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

EMBRAPA. (2020). Arvore do Conhecimento: frango de corte. https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000fy1j9mko02wx5ok0pvo4k3z9kscuy.html.

FERNANDES, C. M.; SILVA, M. (2001). Implantação do sistema alternativo de engorda de aves caipiras através de técnicas de agricultura familiar e associativismo. In: **Encontro técnico científico de ciências exatas e da terra**, Campo Grande: UFMS

FILHO, J. I. S. et al. (2021). Mercado. <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/frangodecorte/preproducao/socioeconomia/mercado#:~:text=Em%20volume%20de%20produ%C3%A7%C3%A3o%2C%20os,dados%20de%202011%20para%20estes>.

HAMILTON, C. M., R. et al. Prevalence and Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* in Free-Ranging Chickens from the Caribbean. **Acta Parasitológica**. 2019; 64(4): 738–744

HOLSBACK, L. et al. Serologic and molecular diagnostic and bioassay in mice for detection of toxoplasma gondii in free ranges chickens from pantanal of mato grosso do sul. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 32, p. 721-726, 2012.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 41, n.4, p. 229-35, 2005

LITERÁK, I.; HEJLICEK, K. Incidence of *Toxoplasma gondii* in populations of domestic birds in the Czech Republic. **Avian Pathol.**, v.22, p.275:281, 1993.

LIU et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in chicken and soil of chicken farms in Nanjing region, China. **Infectious diseases of poverty**. 2017.

MILLAR, P. R. et al. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. **Semin. Cienc. Agrar.**, v. 29, n. 3, p. 693–706, 2008.

NETO J. O. et al. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. **Vet. Parasitol.** 156:329-332, 2008.

NETO, O. J. da S. et al. Investigação soropidemiológica e molecular de toxoplasma gondii em galinhas caipiras (*Gallus Gallus*) comercializadas em feiras livres da região metropolitana de Goiânia, Goiás. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.8, n.2, p. 13705-13719, feb., 2022.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, 39, 1385–1394, 2009.

PENA, H. F. J. et al. Pcr-rflp genotyping of *toxoplasma gondii* from chickens from espírito santo state, southeast region, brazil: new genotypes and a new sag3 marker allele. **Veterinary parasitology**, v. 192, p. 111– 117, 2012.

REZENDE, H. H. A, et al. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens reveals new genotypes in Goiânia, Goiás, Brazil. **Braz J Vet Parasitol** 2021; 30(2).

RONG et al. Seroprevalence, risk factors and genotyping of *Toxoplasma gondii* in domestic geese (*Anser domestica*) in tropical China. **Parasites & vectors**, 7, 459. 2014.

SAH, R. P. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in ruminants in selected districts in Bangladesh. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 11: 1–5. 2019.

SANTOS SILVA, A. C. et al. Occurrence of Atypical and New Genotypes of *Toxoplasma Gondii* in Free-Range Chickens Intended for Human Consumption in Brazil. **ACTA PARASITOLOGICA**, v. 65, p. 774-778, 2020.

SHIRAIISHI, C. S, et al. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. **Rev. Ciênc. Rural**, 39: 2146-2153, 2009.

SHWAB, E. K. et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453–61, abr. 2014.
SILVA, A. C. dos S. et al. Occurrence of Atypical and New Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Free-Range Chickens Intended for Human Consumption in Brazil. **Acta Parasitologica**. 65:774–778. 2020.

SILVEIRA, L. H. **Caracterização biológica e genotípica de t. Gondii obtidos de galinhas de criação livre do pantanal do mato grosso do sul**. 132 f. Doutorado (doutorado em epidemiologia experimental e aplicada as zoonoses) Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2009.

SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAPÁ, SVS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Notificação individual. Toxoplasmose em gestantes. Toxoplasmose Congênita: Amapá, 2019-2023. Acesso em 06/06/2023.

TENTER, A. M. **Toxoplasma gondii in animals used for human consumption**. Memórias do instituto oswaldo cruz. V. 104, p. 364-369. 2009.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and Products Semi-Annual**. Brasil. Março, 2024, Foreign Agricultural Service.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical infectious diseases**, v. 18, n. 6, p. 853-61, 1994.

YANG, N. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered chickens, ducks, and geese in Shenyang, northeastern China. **Parasites Vectors** 5, 237. 2012.