

Investigação soropidemiológica e molecular de toxoplasma gondii em galinhas caipiras (*Gallus Gallus*) comercializadas em feiras livres da região metropolitana de Goiânia, Goiás

Serum epidemiological and molecular investigation of toxoplasma gondii in free-range chickens (*Gallus Gallus*) commercialized in open-air market of metropolitan region of Goiania, Goiás

DOI:10.34117/bjdv8n2-346

Recebimento dos originais: 07/01/2022

Aceitação para publicação: 01/02/2022

Oswaldo José da Silveira Neto

Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás

Instituição: Universidade Estadual de Goiás, Campus São Luís de Montes Belos, Goiás

Endereço: Br 153 Quadra Área Km 99 Zona Rural, Anápolis

E-mail: osvaldo.neto@ueg.br

Aryádiny Gomes de Araújo

Médica Veterinária pela Universidade Federal de Goiás

Endereço: Br 153 Quadra Área Km 99 Zona Rural, Anápolis

E-mail: aryadiny@hotmail.com

Eliete Souza Santana

Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás

Instituição: Universidade Estadual de Goiás, Campus Palmeiras de Goiás, Goiás

Endereço: Br 153 Quadra Área Km 99 Zona Rural, Anápolis

E-mail: elietessouza@yahoo.com.br

Sabrina Castilho Duarte

Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás

Instituição: Embrapa

Endereço: Rodovia GO-462, km 12 – Zona Rural - Caixa Postal 179. Santo Antônio de Goiás, GO – CEP 75375-000

E-mail: sabrinacd@hotmail.com

Márcio Roberto Silva

Doutor em Saúde Pública pela Universidade Federal de Minas Gerais

Instituição: Embrapa

Endereço: Rodovia GO-462, km 12 – Zona Rural - Caixa Postal 179. Santo Antônio de Goiás, GO – CEP 75375-000

E-mail: marcio.roberto.silva@embrapa.br

Maria Auxiliadora Andrade

Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Endereço: Br 153 Quadra Área Km 99 Zona Rural, Anápolis

E-mail: maandrade@vet.ufg.br

Guido Fontgalland Coelho Linhares

Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituição: Universidade Federal de Goiás
Endereço: Br 153 Quadra Área Km 99 Zona Rural, Anápolis
E-mail: gfcclinhares@vet.ufg.br

RESUMO

O objetivo da realização deste trabalho foi estudar a ocorrência de *T. gondii* em galinhas caipiras comercializadas em feiras livres da região metropolitana de Goiânia, através de testes sorológicos e moleculares, e analisar a relação entre os dois testes na melhoria de detecção de aves positivas. Foram adquiridas aves de 20 feiras livres da região metropolitana de Goiás, sendo quatro aves por feira, totalizando 80 aves. De cada ave foram coletadas amostras de soro, cérebro e coração. Foram usados os testes de aglutinação modificada e a PCR para a análise das amostras. No presente trabalho, 31 (38,75%) aves foram soropositivas no teste de MAD (38,75 % - 31/80). Em relação à PCR, os resultados apresentaram diferenças de acordo com o número de fragmentos testados para cada víscera analisada, mostrando o aumento da positividade à medida do aumento do número de fragmentos analisados. Quando comparado em conjunto, a positividade das aves na PCR por titulação na sorologia, pôde-se perceber que houve relação direta entre o aumento do título do resultado da sorologia com o número de aves positivas na PCR. Houve diferença estatística entre a positividade na sorologia e na PCR, mostrando que aves negativas na sorologia pelo teste de MAD, tem chances significativas de possuírem cistos de *T. gondii* em suas vísceras. Conclui-se que o elevado número de aves positivas indica a possibilidade de as mesmas participarem do ciclo biológico do parasito, servindo de fonte de infecção seja para os felídeos ou para o ser humano.

Palavras-chave: diagnóstico, feiras livres, frangos caipiras, reservatórios, zoonoses.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the occurrence of *T. gondii* in free-range chickens sold in open markets in the metropolitan region of Goiânia, by means of serological and molecular tests, and to analyze the relationship between the two tests in the improvement of detection of positive birds. Poultry were acquired from 20 open markets in the metropolitan region of Goiás, with four birds from each market, totaling 80 individuals. Samples of serum, brain and heart were collected from each bird. Modified agglutination test and PCR were used for sample analysis. In the current work, 31 (38.75%) birds were sero-positive in the MAT test (38.75 % - 31/80). Two of the markets that were sampled showed all four birds positive. In relation to PCR, the results presented differences in accordance with the number of fragments tested for each item of viscera analyzed, showing an increase in positivity accompanying the increase in number of fragments analyzed. When the positivity of birds was PCR-analyzed as a set, by serological titer, it was noted that there was a direct relationship between increasing titers and the number of positive birds in the PCR. There was a statistical difference between positivity in the serology and in the PCR, showing that birds testing negative for serology using MAT showed a significant chance of having *T. gondii* cysts in their viscera. It was concluded that a high number of positive birds indicates the possibility that these participate in the biological cycle of the parasite, serving as a source of infection either for felids or for humans.

Keywords: diagnosis, open markets, free-range chickens, disease reservoir, zoonosis.

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular de importância médica e veterinária, sendo o agente etiológico da toxoplasmose, zoonose distribuída mundialmente (MILLAR et al., 2007; TENTER, 2009). A infecção no hospedeiro intermediário se dá pela ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos, ou pelo consumo de água ou alimentos contaminados por oocistos eliminados pelos felídeos infectados (DUBEY, 1996; MONTOYA & LIESENFELD, 2004). Os seres humanos são geralmente infectados por ingerirem alimentos contaminados com oocistos ou por comerem carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais (LUFT & CHUA, 2000), porém, não existe meio que possa distinguir infecções ocorridas através de oocistos ou cistos teciduais. Por isso, levantamentos epidemiológicos continuam sendo a forma mais empregada para se avaliar a importância das diferentes fontes de infecção por *T. gondii* em seres humanos (DUBEY, 2000).

Um aspecto importante a ser considerado é que os cistos de *T. gondii* não são macroscopicamente visíveis, portanto não são detectados na inspeção *post-mortem* realizada em frigoríficos, o que faz com que carnes parasitadas por *T. gondii* sejam liberadas para o consumo humano sem nenhuma restrição (DUBEY et al., 1998; TENTER, 2009).

Estima-se que um terço da população humana já tenha sido exposta ao agente causador da toxoplasmose, sendo que a porcentagem de indivíduos positivos varia de acordo com a região avaliada e com a técnica utilizada no estudo (TENTER, 2000; KIM & WEISS, 2008).

LINHARES et al. (1990) encontraram uma taxa de 43,1% de caprinos sororeagentes ao *T. gondii* pelo teste de hemaglutinação na região de Goiânia, Goiás. Ainda na região de Goiânia, MATOS et al. (1999), pesquisaram anticorpos para *T. gondii* em matrizes de granjas que abasteciam o mercado consumidor de Goiânia, encontrando 95% das 40 granjas estudadas com suínos soropositivos à hemaglutinação, sendo a prevalência variável de 8,3% a 60,0%.

Embora seja mais comum o envolvimento de carnes de algumas espécies animais na transmissão de *T. gondii*, como suínos e ovinos, outras espécies de animais de produção já foram descritos fazendo parte do ciclo desta doença, por meio do isolamento do parasito em camundongos inoculados com amostras destas espécies e descrição de surtos (TENTER, 2009).

Os frangos caipiras representam um importante papel no estudo da toxoplasmose, pois servem como indicadores da contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* devido a seu hábito de alimentação diretamente do solo (DUBEY et al. 2003). Nas criações extensivas, as galinhas apresentam maior possibilidade de adquirir infecção por *T. gondii* e de transmitir este protozoário ao ser humano (MILLAR et al., 2012). Altos índices de sorologia positiva em galinhas caipiras indicam altos índices de contaminação do solo com oocistos do parasito (ZHU et al., 2008).

Um fato extremamente importante que deve ser lembrado é a possibilidade de aves assintomáticas servirem como fonte de infecção da toxoplasmose ao ser humano, por meio de cistos presentes no coração e músculos destas aves (KANETO et al. 1997). De acordo com LITERAK & HEJLICEK (1993), a manipulação de carnes cruas de aves sem muita higiene ou o consumo de carnes cruas ou malcozidas, representa um risco de infecção ao ser humano.

Na região de Goiânia, Goiás, apesar de diversos estudos em relação à toxoplasmose congênita em humanos (AVELINO et al., 2003; AVELINO et al., 2004; SARTORI et al., 2011), não há muito estudo relacionado à ocorrência de *T. gondii* em animais de produção, os quais podem contribuir diretamente para a transmissão desta enfermidade ao ser humano.

O objetivo deste trabalho foi estudar a ocorrência de *T. gondii* em galinhas caipiras comercializadas em feiras livres da região metropolitana de Goiânia por meio de testes sorológicos e moleculares e analisar a relação entre os dois testes na detecção de aves positivas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nos Laboratórios de Diagnóstico de Doenças Parasitárias e de Diagnóstico Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e no Núcleo Experimental de Doenças de aves do mesmo Departamento.

As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas de galinhas caipiras comercializadas em feiras livres da região metropolitana de Goiânia, Goiás, sendo todas aves adultas vivas destinadas à venda direta ao consumidor. Foram adquiridas quatro aves em cada feira livre, sendo o total de 20 feiras incluídas no projeto, totalizando 80 aves.

Após a aquisição das aves, as mesmas foram levadas para a EVZ/UFG para coleta das amostras. Para a obtenção das amostras de soro, cérebro e coração as oitenta aves

foram sacrificadas por deslocamento cervical. As amostras das aves foram armazenadas em tubos estéreis e congeladas a -20°C até o processamento

As amostras de sangue foram coletadas da veia braquial das aves em tubos estéreis e posteriormente foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos para a obtenção dos soros, que foram armazenados a -20°C até o momento de realização do exame sorológico.

O teste de aglutinação modificado (MAD) foi feito usando antígeno fixado pela formalina de acordo com DESMONTS & REMINGTON, 1980. Como reações positivas consideraram-se aqueles soros em que houve aglutinação do antígeno, caracterizado pela formação de uma malha ou película, tomando pelo menos 50% da área da cavidade da microplaca. A formação de botão compacto ou ocupando menos de 50% da área da cavidade da microplaca foi considerada como reação negativa. Em todas as placas foram testados soros controle sabidamente positivo e negativo, os quais orientaram a interpretação de cada reação. Foram consideradas como amostras positivas aquelas que reagiram na diluição a partir de 1:16.

Para cada uma das 80 amostras de coração foram realizadas três extrações de DNA, sendo cada extração realizada de um fragmento diferente da víscera da ave, totalizando 240 produtos de extração. Para as 80 amostras de cérebro foi realizado o mesmo procedimento, sendo também três fragmentos diferentes submetidos a extração de DNA. Os fragmentos foram identificados em Fragmento 1, 2 e 3 respectivamente.

Antes da realização da extração, cada amostra individualmente foi macerada em tubo estéril para facilitar a realização do procedimento. A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando-se *Kit Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®)*, conforme instruções do fabricante.

A preparação do *mix* de reação de PCR foi estabelecida a partir de adaptações dos protocolos descritos por SILVEIRA (2009). Dessa forma foi estabelecido o volume de 50 μL para o *mix* de reação, composto por 35,75 μL de água ultra-pura (*Dnase/Rnase-Free Distilled water - Invitrogen*), 5 μL de Tampão para PCR 10X (*PCR buffer 10X Invitrogen*), 2,0 μL de Cloreto de Magnésio (MgCl_2) 50nM (*Invitrogen*); 1 μL de dNTP 10 mM (*Amersham Biosciences*); 0,5 μL (10pM) do iniciador *forward*, 0,5 μL (10 pM) do iniciador *reverse*, 0,25 μL de Taq 5 U/ μL (*Invitrogen*) e 5 μL do DNA genômico da amostra.

Para a detecção do DNA de *T. gondii* nas amostras de coração e cérebro foi usado um par de *primers* correspondente a um fragmento do gene B1 de *T. gondii* de 193 pares de bases (bp): 5'–GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG - 3' e

5'TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC – 3' , conforme descritos no trabalho de SILVEIRA (2009).

A mistura para a reação de PCR foi submetida ao processo de amplificação por PCR, em termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*), previamente programado a um número de ciclos e temperaturas, conforme adaptado de SILVEIRA (2009): um ciclo inicial de desnaturação de 94 °C por trinta segundos, seguido de 40 ciclos repetidos com as temperaturas de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 25 segundos e 72 °C por 25 segundos, finalizando a reação com uma fase de extensão adicional a 72 °C por cinco minutos.

Em todas as reações realizadas durante o presente trabalho foram incluídos controles positivo e negativo. Como controle positivo nas reações foi utilizado DNA genômico de *T. gondii* (cepa RH) proveniente do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG. Como controle negativo foi utilizada água ultra pura esterilizada, livre de Dnases e Rnases (*Dnase/Rnase-Free Distilled water - Invitrogen*).

Os produtos de DNA amplificado (*amplicons*) foram posteriormente aplicados em gel de agarose 2% (Agarose NA – *Amersham Biosciences*) em tampão TBE1x. Um volume de 10 µL dos produtos de PCR, homogeneizados em 2,5 µL de corante de corrida (25% Ficoll 400, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol em nove partes de glicerol) foram aplicados em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular foi empregado o *DNA Ladder 100pb (Invitrogen)*. As eletroforeses foram conduzidas em cuba (*Horizon 11.14, Life Technologies*), a 90 V, durante 60 minutos.

Após as corridas os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 µg/mL). A visualização foi feita no aparelho transiluminador de UV (*Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum*), em ambiente escuro.

A frequência de galinhas soropositivas e de resultados positivos na PCR foi calculada determinando-se o intervalo de confiança 95% (IC95%). Adicionalmente foram determinados quatro modelos logísticos, conforme descrito abaixo:

Modelo 1 – regressão logística condicional para avaliar a relação entre título e o resultado da PCR. Modelo 2 - regressão logística condicional para avaliar a proporção de resultados positivos no coração levando-se em conta os três testes de PCR isolados ou combinações duplas ou triplas dos mesmos. Modelo 3 - regressão logística condicional para avaliar a proporção de resultados positivos no cérebro levando-se em conta três testes de PCR isolados ou combinações duplas ou triplas dos mesmos. Modelo 4 - regressão logística condicional (amostras pareadas) comparando os resultados da PCR do cérebro

com a PCR do coração, levando-se em conta o resultado combinado dos três resultados de PCR realizado em cada órgão de uma mesma galinha.

Em todos os modelos foi usado o teste de *McNemar* para comparar proporções pareadas (KRAEMER, 1992) e *odds ratio* para avaliar a magnitude da associação determinadas por regressão logística condicional por se tratarem de amostras pareadas. O nível de significância considerado foi de 0,05. Finalmente, foi avaliada a concordância entre os testes de MAD e de PCR por meio do teste de Kappa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, 31 aves (38,75%) foram soropositivas no teste de MAD, representando 38,75% das amostras testadas. Entre 20 feiras, foram soropositivas aves provenientes de 16 feiras (80 %), o que mostra a disseminação do parasito por diversas regiões da cidade. Todas as aves analisadas neste estudo estavam visualmente saudáveis, não apresentando nenhuma alteração ao exame clínico.

Os resultados obtidos nesta pesquisa se comparam com a maioria dos trabalhos que investigaram a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em galinhas caipiras. Estudos realizados no México analisando 208 aves detectaram 6% de galinhas sororeagentes para anticorpos anti *T. gondii* (DUBEY et al., 2004). Em uma pesquisa realizada na Áustria 36% de 830 aves analisadas foram sororeagentes (DUBEY et al., 2005), enquanto em Portugal a positividade encontrada por DUBEY et al. (2006) foi de 44%. Estes trabalhos comprovam que a soropositividade das galinhas caipiras para *T. gondii* apresenta uma certa variação. Estas diferenças nas frequências sorológicas são diretamente relacionadas ao tipo de teste utilizado, ao tipo de criação e à idade das aves (DUBEY, 2010), sendo que aves com idade superior têm maiores chances de já terem tido contatos prévios com o parasito.

De acordo com CASARTELLI-ALVES et al. (2012), a prevalência de galinhas positivas para anticorpos anti *T. gondii* pela RIFI na região de Rio Bonito, RJ foi de 27,6%. Dezoito (77,2%) propriedades nos cinco bairros estudados apresentaram aves com sorologia positiva para *T. gondii*. Já em um estudo realizado em Campos dos Goytacazes (RJ), BAHIA-OLIVEIRA et al. (2003) encontraram uma prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* de 65,15% entre as 198 amostras de soro de galinhas examinadas pelo MAD. No estado do Paraná em 40 aves estudadas a soroprevalência foi de 40% (DUBEY et al. 2003), enquanto no Rio Grande do Sul a soroprevalência foi de 38% numa amostragem de 50 galinhas (DUBEY et al. 2007). BELTRAME et al., (2012) estudando *T. gondii* em

510 galinhas caipiras em oito municípios do estado do Espírito Santo encontraram 198 soropositivos (38,8%) para a presença de anticorpos pelo MAD. Esses estudos citados anteriormente mostram que embora as soroprevalências do *T. gondii* em aves criadas de forma extensiva sejam diferentes nas regiões estudadas, quase sempre apresentam valores elevados, mostrando que essas aves podem ser sentinelas da contaminação ambiental e sinalizar o risco de infecção que o próprio ser humano está exposto ao compartilhar o mesmo ambiente das aves.

Em relação à PCR, os resultados apresentaram diferenças de acordo com o número de fragmentos testados para cada víscera analisada, mostrando o aumento da positividade quanto maior o número de fragmentos analisados ($p < 0,05$).

De 80 aves analisadas, a positividade da PCR dos fragmentos 1, 2 e 3 retirados do coração foi de 10 (12,5%), 19 (23,75%) e 20 (25%), respectivamente (TABELA 1).

Tabela 1 – Regressão Logística Condicional Para Avaliar A Proporção De Resultados Positivos No Coração Levando-Se Em Consideração Os Três Testes De Pcr Isolados Ou Combinações Duplas Ou Triplas Dos Mesmos

Teste	Positivos	Total	Porcentagem (%)	OR (IC 95 %)	Valor de p para o teste de McNemar
PCRC 1	10	0	12,50	1,00 A	-
PCRC 2	19	0	23,75	2,12 (0,92-5,21) AB**	0,07
PCRC 3	20	0	25,00	2,66 (1,04-6,81) BC	0,03
PCRC 1 + 3	26	0	32,50	33 (1,98-550,00)* CD	<0.001
PCRC 2 + 3	26	0	32,50	33 (1,98-550,00)* DE	<0.001
PCRC 1 + 2	27	0	33,75	35 (2,10-581,90)* DE	<0.001
PCRC 1 + 2 + 3	36	0	45,00	53 (3,23-869,50)*F	<0.00001

PCRC – PCR do coração *Com transformação de Haldane **Letras iguais significam que os testes não diferiram entre si ($p > 0,05$ pelo teste de McNemar)

A detecção de DNA das amostras de cérebro também apresentou variações quanto a positividade, sendo detectadas 25 (31,25%), 15 (18,75%) e sete (8,75%) resultados positivos na análise dos fragmentos 1, 2 e 3, respectivamente.

A realização de PCR em mais de um fragmento da mesma víscera é importante, 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 (TABELA 2).

Tabela 2 – Regressão Logística Condicional Para Avaliar A Proporção De Resultados Positivos No Cérebro Levando-Se Em Conta Três Testes Isolados, Combinações Duplas Ou Triplas Dos Mesmos

Teste	Positivos	Total	Porcentagem (%)	OR (IC95%)	Valor de p para o teste de McNemar
PCRCer 3	7	80	8,75	1,00 A	-
PCRCer 2	15	80	18,75	2,6 (0,95-8,12) AB**	0,06
PCRCer 2 + 3	20	80	25,00	27 (1,60-454,10)* BC	<0.01
PCRCer 1	25	80	31,25	5,5 (1,89-15,96) CD	<0,001
PCRCer 1 + 3	29	80	36,25	45 (2,73-741,70)* DE	<0,0001*
PCRCer 1 + 2	33	80	41,25	9,66 (2,94-31,73) EF	<0,00001
PCRCer 1 + 2 + 3	36	80	45,00	59 (3,6-965,4)* F	<0,000001*

PCRCer – PCR do Cérebro *Com transformação de Haldane **Letras iguais significam que os testes não diferiram entre si (p>0,05 pelo teste de McNemar)

A comparação da performance da combinação dos três testes de PCR realizados no cérebro com a dos três testes de PCR realizados no coração não apresentou diferenças (p = 0,99) (TABELA 3).

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. Já outros trabalhos, como os de DUBEY & THULLIEZ (1993) e KANETO et al. (1997) demonstraram que pela inoculação experimental em camundongos detecta-se mais cistos do parasito no cérebro seguido do coração. No entanto, no presente trabalho não houve diferença de positividade ao se analisar amostras de tecido cardíaco ou de tecido neural.

Embora nem sempre a mesma ave tenha tido DNA detectado no cérebro e no coração, quando foram avaliados os resultados das 80 aves estudadas, a positividade encontrada no coração e no cérebro foi correspondente (TABELA 3), o que indica que a pesquisa de DNA do parasito pode ser feita em qualquer dos dois tipos de material.

Tabela 3 – Modelo Logístico Condicional Comparando Os Resultados Da Pcr Do Cérebro (PcrCer) Com A Pcr Do Coração (PcrC), Resultado Combinado Dos Três Resultados De Pcr

Teste	Positivos	Total	Porcentagem (%)	OR (IC95%)	Valor de p para o teste de McNemar
PCRC 1 + 2 + 3	36	80	45	1,00 A	--
PCRcer 1 + 2 + 3	36	80	45	1,00 (0,53 – 1,87) A	0,99

A técnica de PCR se mostrou viável para detectar DNA de *T. gondii* em amostras primárias de aves caipiras, pois como o número de cistos pode ser pequeno, nem sempre há DNA suficiente para detecção ou pode não haver DNA naquele fragmento analisado. A PCR para a detecção de *T. gondii* foi usada pela primeira vez por BURG et al. (1989). A partir daí, autores como DUBEY, 2010; HOLSBACK et al., 2012 e PENA et al., 2012 utilizaram este teste para a detecção de DNA deste parasito em vários materiais biológicos, incluindo coração e cérebro.

A maioria dos estudos para a detecção molecular de *T. gondii* utilizou como 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 & 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.

O número de aves positivas na sorologia e na PCR foi analisada em conjunto para ver a correspondência entre os dois testes. O número de aves positivas na PCR foi analisado considerando como positiva a ave que teve pelo menos uma reação de PCR com detecção de banda compatível com o fragmento esperado para o gene B1 de *T. gondii*. O número de galinhas positivas na sorologia e na PCR encontra-se demonstrado na TABELA 4, assim como as respectivas variações.

Tabela 4 – Frequência De Aves Soropositivas E De Resultados Pcr Positivos Na População Estudada Em Goiânia, Goiás

Característica	Número de positivos	Tamanho da amostra	Prevalência % (IC95%)
Sorologia	31	80	38,75% (28,26 – 50,33)
PCR	56	80	70,00% (59,31 – 79,27)

Quando analisados em conjunto a positividade das aves na PCR e o título das aves positivas na sorologia, pôde-se perceber que houve uma relação direta entre o aumento do título da sorologia (concentração de anticorpos) e a taxa de positividade na PCR ($p < 0,05$) (TABELA 5).

Tabela 5 – Regressão Logística Condicional Da Positividade Da Pcr Por Estrato De Resultados Da Mad Em Amostragem De Galinhas Caipira (N = 80), Goiânia, Goiás

Título MAD	PCR positivo em qualquer teste no cérebro ou no coração (%)	Total	OR (IC95%)	Valor de p pelo teste de Mc
Não reagente (-)	32 (65,30)	49	1,0	
1:16 (+)	15 (75,00)	20	6,4 (2,4-16,42)	< 0,0001
1:64 (+)	9 (81,81)	11	16,0 (3,83-66,76)	< 0,000001

Houve uma maior taxa de positivos à PCR (81.81%) no grupo com maior título e uma menor taxa (65,30%) de PCR positivos no grupo de não reagentes. Ou seja, com o aumento da taxa de anticorpos aumentou-se a chance de se encontrar resultados positivos pela PCR.

Um aspecto importante a ser destacado é a presença de aves negativas na sorologia e positivas na PCR, mostrando que mesmo galinhas caipiras soronegativas podem ter cistos em suas vísceras e musculatura, servindo de fonte de infecção para animais ou pessoas que consumirem as mesmas. Este fato se torna relevante quando considera-se que a principal forma usada para detectar animais positivos para *T. gondii* é pelo uso de exames sorológicos (TENTER, 2009; DUBEY, 2010; CASARTELLI-ALVES et al., 2012).

Segundo SILVEIRA (2009), já foi comprovado 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 (AIGNER, 2008). 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.

Ao se avaliar a concordância entre a sorologia e o teste de PCR pelo Kappa, foi obtida uma associação considerável ($\kappa:0.25$) entre os dois testes. A condição da concordância não ter sido tão satisfatória pode ser explicada por ter se considerado como positiva qualquer ave que tenha tido amplificação em alguma das seis amostras testadas (três diferentes amostras de coração e três diferentes amostras de cérebro), enquanto a sorologia foi feita em apenas um momento com uma única amostra.

4 CONCLUSÕES

A ocorrência de galinhas caipiras positivas para *T. gondii* nas feiras livres da região metropolitana de Goiânia-Goiás é elevada. Adicionalmente, com o aumento do número de amostras testadas por animal, houve um aumento significativo da taxa de positividade.

O número de fragmentos de vísceras positivas para *T. gondii* por PCR não varia significativamente quando se testam amostras de coração ou cérebro. Em relação à associação de aves positivas no teste de aglutinação modificada e na PCR, constata-se que quanto mais elevado o título da ave na sorologia maior a chance de positividade na PCR.

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.
- Avelino, m. M., campos, d., parada, j. C. B., castro, a. M. (2003). Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology. 108, 19-24. 2003.
- Avelino, m. M., campos, d., parada, j. B., castro, a. M. Risk factors for *toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age. Brazilian journal of infectious diseases. 8, 164-174. 2004.
- Bahia-oliveira, l. M. G., jones, j. L., azevedo-silva, j., alves, c. C. F., oréface, f., addiss, d. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north rio de janeiro state, brazil. Emerging infectious diseases. V.9, 55-62. 2003.
- Beltrame, m.a.v.; pena, h.f.j.; ton, n.c.; lino, a.j.b.; gennari, s.m.; dubey, j.p.; pereira, f.e.l. Seroprevalence and isolation of *toxoplasma gondii* from free-range chickens from espírito santo state, southeastern brazil. Veterinary parasitology, n.188, p. 225– 230, 2012.
- 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.
- Casartelli-alves, l; ferreira, l.c.; vicente, r.t.; millari, p.r.; oliveira, r.v.c.; amendoeira, m.r.r; schubachi, t.m.p.; menezes, r.c. Prevalência da infecção por *toxoplasma gondii* em galinhas criadas extensivamente em rio bonito, rio de janeiro. *Arquivos brasileiros de medicina veterinária e zootecnia*, v.64 n.5, 2012.
- Desmonts, g.; j.s. Remington, 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of clinical microbiology*, v.11, p. 562-568, 1980.
- dubey, j. P. Strategies to reduce transmission of *toxoplasma gondii* to animals and humans. *Veterinary parasitology*, v.64, p.65-70, 1996.
- dubey, j. P. Sources of *toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *British medical journal*, v. 32, p. 127-128, 2000.
- dubey, j.p. *Toxoplasmosis of animals and man*. 2. Ed. Maryland, usa. Crc press. 2010. 338 p.

dubey, j. P.; thulliez, p. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *toxoplasma gondii* oocysts. American journal veterinary research, v. 54, n. 2, p. 270- 273, 1993.

dubey, j.p.; lindsay, d.s.; speer, c.a. Structure of *toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. Clinical microbiology review, v. 11, p. 267–299. 1998.

dubey, j.p.; navarro, i.t.; graham, d.h.; dahl, e.; freire, r.l.; prudencio, l.b.; sreekumar, c.; vianna, m.c.; lehmann, t. Characterization of *toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from paraná, brazil. Veterinary parasitology, v.117, n.3, p.229-234, 2003.

dubey, j.p.; e. S. Morales, t. Lehmann. Isolation and genotyping of *toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from mexico. Journal of parasitology, v. 90, p.411–413, 2004.

dubey, j. P.; edelhofer, r.; marcet, p.; vianna, m.c.b.; kwok, o.c.h.; lehmann, t. Genetic and biologic characteristics of *t. Gondii* isolates in free-range chickens from austria. Veterinary parasitology, v.133, n.4, p.299-306, 2005.

dubey, j. P.; gennari, s.m.; labruna, m.b.; camargo, l.m.a.; vianna, m.c.b.; marcet, p.l.; lehmann, t. Characterization of *toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from amazon, brazil. Journal of parasitology, v.92, n.1, p.36-40, 2006.

dubey, j.p.; sundar, n.; gennari, s.m.; minervino, a.h.; farias, n.a.; ruas, j.l.; santos, t.r.; cavalcante, g.t.; kwok, o.c., su, c. Biologic and genetic comparison of *toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern para state and the southern state rio grande do sul, brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. Veterinary parasitology, v. 143, n.2, p.182-188. 2007.

holsback, l.; pena, h.f.j.; ragozo, a.m.a; lopes, e.g.; gennari, s. M. ; soares, r. M. 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.

Kaneto c.n.; costa a.j.; paulillo a.c. Experimental toxoplasmosis in broiler chickens. Veterinary parasitology, v. 69, p. 203-210. 1997.

Kim, k; weiss, l, m. Toxoplasma: the next 100 years. Microbes and infection, v. 10, p. 978-984. 2008.

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

Kraemer, h.c. Evaluating medical tests. Newbury park, ca sage, 1992.

Linhares, g.f.c.; dias, m.j.; souza, a.m.; das filho, f. C. Anticorpos anti-toxoplasma gondii em caprinos no municpio de goiânia: levantamento sorolgico. Arquivos escola agronomia e veterinária, v. 20, p. 31-37, 1990.

Literák i., hejlícek k. Incidence of *toxoplasma gondii* in population of domestic birds in the czech republic. *Avian pathology*, v. 22, p. 275-281, 1993.

Luft, b.j.; chua, a. Central nervous system toxoplasmosis in hiv pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Current infectious disease reports*, v.2, n. 4, p.358-362, 2000.

Matos, m.p.c.; sobestiansky, j.; gambarini, m.l. Anticorpos para *toxoplasma gondii* em soros de matrizes suínas de granjas que abastecem o mercado consumidor de goiânia. *A hora veterinária*. V. 19, p. 9-11. 1999.

Millar p.r., daguer h., trigueiro r.v., costa t., carli a.l., sobreiro l.g. & amendoeira m.r.r. Soroprevalência de anticorpos anti-*toxoplasma gondii* em trabalhadores de um matadouro de suínos e em indivíduos com outras atividades na cidade de palmas, paraná, brasil. *Ciência rural, santa maria*, v, 37, n. 1, p. 292-295, 2007.

Millar, p.r.; alves, f.m.x.; teixeira, v.q.; vicente, r.t.; menezes, e.m.; sobreiro, l.g.; pereira, v.l.a.p.; amendoeira, m.r.r. Occurrence of infection with *toxoplasma gondii* and factors associated with transmission in broiler chickens and laying hens in different raising systems. *Pesquisa veterinária brasileira*, v. 32, n.3, p. 231-236, 2012.

Montoya j. G.; liesenfeld, o. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363 : 1965-76, 2004.

Pena, h. F. J., vitaliano, s. N., beltrame, m. A. V. Pereira, f. E. L., gennari, s. M.; soares, r. M. 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.

Sartori, a.l.; minamisava, r.; avelino, m.m. Martins, c.a. Triagem pré-natal para toxoplasmose e fatores associados à soropositividade de gestantes em goiânia, goiás. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia*, v .33, n.2, rio de janeiro, 2011.

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.

Tenter, a.m. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Memórias do instituto oswaldo cruz*. V. 104, p. 364-369. 2009.

Tenter, a.m., heckeroth, a.r.; weiss, l.m. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal of parasitology*, v. 30, p. 1217–1258, 2000.

Wong, s.y.; remington, j. S. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clinical infectious diseases*, v. 18, n. 6, p. 853-61, 1994.

Zhu, j., yin, j., xiao, y., jiang, n., ankarlev, j., lindh, j., chen, q., 2008. A sero-epidemiological survey of *toxoplasma gondii* infection in freerange and caged chickens in northeast china, *veterinary parasitology*, v. 158, p. 360-363, 2008.