

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO
E BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG GCBE_v

DETECÇÃO DE ZONÓSES EM CARNES DE CAÇA
COMERCIALIZADAS NA REGIÃO DO MÉDIO RIO SOLIMÕES – COARI
AM

KAROLINE SANTANA DE FREITAS

Manaus – AM
Junho – 2023

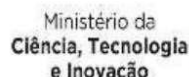
KAROLINE SANTANA DE FREITAS

DETECÇÃO DE ZOOSE EM CARNES DE CAÇA
COMERCIALIZADAS NA REGIÃO DO MÉDIO RIO SOLIMÕES – COARI
AM

ORIENTADORA: Dra. WALESKA GRAVENA
COORIENTADOR: Dr. CARLOS RAMON DO NASCIMENTO BRITO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG GCBEv) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus – AM
Junho – 2023



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA - PPG GCBEV

No dia 02 de junho de 2023, às 09h00 (Horário Manaus), reuniu-se de modo online, a banca examinadora da DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO, composta pelos seguintes doutores, membros titulares: Carlos Sacristán Yagüe; Jacqueline da Silva Batista e Andressa Noronha, tendo como membros suplentes: Elis Dionísio da Silva e Vítor Luz Carvalho, a fim de proceder a arguição da defesa pública de mestrado da estudante **KAROLINE SANTANA DE FREITAS**, intitulada: “DETECÇÃO DE ZOOSE EM CARNES DE CAÇA COMERCIALIZADAS NA REGIÃO DO MÉDIO RIO SOLIMÕES”. O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Waleska Gravena da UFAM e coorientação do Dr. Carlos Ramon do Nascimento Brito da UFRN.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da banca julgadora, tendo recebido o conceito final:

- Aprovada por maioria Reprovado
 Aprovada por unanimidade

Menção:

- Aprovada com “Distinção” Aprovada com “Distinção e Louvor”

A ata foi lavrada e assinada pelos Doutores, membros presentes da Banca Julgadora.

BANCA JULGADORA

TITULARES	ASSINATURAS
Carlos Sacristán Yagüe - CISA-INIA, CSIC	
Jacqueline da Silva Batista - INPA	
Andressa Noronha Barbosa da Silva - UFRN	
SUPLENTES	
Elis Dionísio da Silva - UFAM	
Vítor Luz Carvalho - AQUASIS	



ELIANA FELDBERG, Dra.

**Coord. Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e
Biologia Evolutiva - PPG GCBEV.
PO. Nº 162 - 23.08.2021 - INPA/MCTI**

Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEV Art. 62 “Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas às exigências das Agências de Fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEV. Para obtenção do título, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEV.

F866d Freitas, Karoline Santana de ▼

Detecção de zoonoses em carnes de caça comercializadas na Região do Médio Rio Solimões - Coari am / Karoline Santana de Freitas; orientadora Waleska Gravena; coorientador Carlos Ramon do Nascimento Brito. - Manaus: [s.l.], 2023.

823 KB

48p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. Zoonoses. 2. Subfamília Toxoplasmatinae 3. Marcadores moleculares, Coari. 4. *Mycobacterium leprae* I. Gravena, Waleska. II. Brito, Carlos Ramon do Nascimento. III. Título

CDD 571.98

Sinopse

Utilizando marcadores moleculares, foram detectadas a presença de DNA de *Mycobacterium leprae*, agente causador da hanseníase, e de DNA de *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, em carnes de caça comercializadas na região do médio Rio Solimões, Coari - Amazonas.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de realizar a conclusão do mestrado.

Agradecer também a minha orientadora Dra. Waleska pelos ensinamentos, orientação e conselhos; ao meu coorientador Dr. Ramon pela contribuição na orientação principalmente na área de parasitologia.

Agradecer também as duas pessoas que estiveram ao meu lado em todo o processo para a realização deste trabalho: Cristhiane e Israela. Vocês ao meu lado foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Agradecer também a minha família e amigos que sempre estiveram ao meu lado dando apoio e força quando eu mais precisei.

Agradecer também aos meus pais Ivan e América e aos meus padrinhos Manoel e Wanda pelo amor, apoio, carinho e paciência dedicado a mim.

Agradecer aos colegas de turma e parceiros de trabalho nos laboratórios onde passei para a realização desta pesquisa.

Agradecer ao Programa de Pós-Graduação PPG GCBEv – Genética, Conservação e Biologia Evolutiva; bem como a coordenação e grupo de professores que participaram ativamente para nossa formação.

A REALIZAÇÃO DESTA ESTUDO FOI POSSÍVEL DEVIDO:

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG GCBEv).

Aos Laboratórios LMA, LTBM e LEEM do INPA pela disponibilidade de local de estudo, materiais e equipamentos utilizados para alcançarmos os resultados esperados.

Aos financiamentos fornecidos pelo projeto “Carne de Caça e Saúde Humana” da agência financiadora: FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, que foi essencial para que conseguíssemos concluir os trabalhos realizados.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de Mestrado concedida pela instituição.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - Programa Institucional de Apoio à Pós-Graduação Stricto Sensu (FAPEAM-POSGRAD).

Resumo

Zoonoses são doenças infecciosas causadas por patógenos transmitidos entre animais e humanos. Uma das rotas de transmissão mais importantes desses agentes infecciosos ocorre pelo consumo de carne de animais silvestres (carne de caça), expondo os indivíduos a doenças como a hanseníase e a toxoplasmose. A hanseníase é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente a pele e o sistema nervoso periférico, levando a lesões cutâneas com diminuição das sensibilidades térmica e tátil e até mesmo incapacidade física. Essa bactéria é normalmente transmitida de uma pessoa para outra por meio de secreções das vias respiratórias. O *Toxoplasma gondii*, protozoário causador da toxoplasmose, representa um grande problema de saúde pública, pois infecta praticamente todos os animais de sangue quente. O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida complexo e é um importante patógeno de origem alimentar. Desta forma a infecção em humanos pode resultar da ingestão ou manuseio de carne crua ou malcozida contendo cistos no tecido de hospedeiro doméstico ou silvestre. Nesse sentido, esse estudo teve como objetivo, detectar a presença de DNA dos patógenos *M. leprae* e *T. gondii* em amostras de carnes de caça comercializadas no município de Coari - Amazonas, no médio rio Solimões. O DNA de *M. leprae* foi pesquisado por meio de uma *nested* PCR do gene do antígeno 18-KDa. Marcadores moleculares para identificar a presença de DNA de membros da subfamília Toxoplasmatinae, dentre eles o *T. gondii*, foram utilizados por meio de *nested* PCR utilizando alvos/iniciadores 18S e 5.8S. Após amplificação, as amostras positivas foram utilizadas para as reações de sequenciamento. Das 168 amostras analisadas, 77,98% (131/168) foram positivas para a presença de DNA de *M. leprae*. Com relação à subfamília Toxoplasmatinae 34,52% (58/168) das amostras foram positivas, e após sequenciamento de 21 amostras e confirmação via BLAST, 16 foram identificadas como *T. gondii* e cinco como *Sarcocystis* spp. Os resultados demonstram que a comercialização ilegal e o consumo de carne de animais silvestres podem representar uma importante fonte de infecção para humanos e conseqüentemente problemas para saúde pública.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*, *Toxoplasma gondii*, subfamília Toxoplasmatinae, zoonoses, carne de caça, marcadores moleculares, animais silvestres, Coari.

Abstract

Zoonoses are infectious diseases caused by pathogens transmitted between animals and humans. One of the most important routes of transmission of these infectious agents occurs through the consumption of meat from wild animals (bushmeat), exposing individuals to diseases such as leprosy and toxoplasmosis. Leprosy is an infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium leprae*, which mainly affects the skin and the peripheral nervous system, leading to skin lesions with decreased thermal and tactile sensitivity and can cause physical disability. This bacterium is normally transmitted from one person to another through respiratory tract secretions. *Toxoplasma gondii*, the protozoan that causes toxoplasmosis, represents a major public health problem, as it infects practically all warm-blooded animals, both terrestrial and aquatic. *Toxoplasma gondii* has a complex life cycle and is an important food-borne pathogen, and thus infection in humans can result from ingestion or handling of raw or undercooked meat containing cysts in the tissue of a domestic or wild host. In this sense, this study aimed to detect the presence of DNA from the pathogens *M. leprae* and *T. gondii* in samples of bushmeat sold in the municipality of Coari, Amazonas, on the middle Solimões River. *Mycobacterium leprae* DNA was investigated using a nested PCR of the 18-KDa antigen gene. Molecular markers to identify the presence of DNA from members of the Toxoplasmatinae subfamily, including *T. gondii*, were used by means of nested PCR using 18S and 5.8S targets/primers. After amplification, positive samples were used for sequencing reactions. Of the 168 samples analyzed, 77.98% (131/168) were positive for the presence of *M. leprae* DNA. Regarding the subfamily Toxoplasmatinae 34.52% (58/168) of the samples were positive, and after sequencing 21 samples and confirmation via BLAST, 16 were identified as *T. gondii* and five as *Sarcocystis* spp. the results show that the illegal trade and consumption of wild animal meat can represent an important source of infection for humans and consequently problems for public health.

Keywords: *Mycobacterium leprae*, *Toxoplasma gondii*, subfamily Toxoplasmatinae, zoonosis, bushmeat, molecular markers, wild animals, Coari.

Sumário

INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS	13
Objetivo geral.....	13
Objetivo específico.....	13
Capítulo 1 - Carne de caça e <i>Mycobacterium leprae</i> : a possibilidade de animais silvestres serem vetores de hanseníase.....	14
Resumo.....	14
Abstract	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO.....	20
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
Capítulo 2 - Detecção molecular de Toxoplasmatinae (<i>T. gondii</i>) em carnes de caça na região do Médio rio Solimões, Amazonas, Brasil.....	28
Resumo.....	28
Abstract	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSSÃO.....	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
CONCLUSÃO	49

INTRODUÇÃO

A Amazônia é um bioma único, considerada uma das maiores áreas de grande biodiversidade, e estima-se que haja pelo menos 40.000 espécies de plantas, 427 mamíferos, 1.294 aves, 378 répteis, 427 anfíbios e cerca de 3.000 peixes (Mittermeier et al. 1998; Rylands e Brandon 2005). Com cerca de 6,9 milhões de km², o bioma amazônico abrange nove países da América do Sul e compreende um conjunto de ecossistemas florestais e fluviais. Além disso, é fonte de alimento e compostos químicos para o desenvolvimento de medicamentos e matérias-primas para uma grande variedade de indústrias (Ellwanger et al. 2020).

Com uma vasta extensão e diversidade de espécies, as populações nativas das florestas tropicais ainda retiram mais de 50% da proteína animal da sua dieta alimentar por meio da caça de animais silvestres (Mendes 2014). No entanto, o desmatamento para extração de madeira, mineração, construção de estradas, fazendas (de gados) e urbanização tem colocado também a população urbana em contato com espécies de animais silvestres (Val 2020).

O consumo de carne de animais silvestres é um hábito presente em vários países do mundo todo, inclusive o Brasil (Perrota 2020). Silva (2007), em estudo realizado no médio rio Negro (AM), verificou que animais de caça e quelônios são extremamente apreciados pelos ribeirinhos, e as espécies de animais mais citadas como preferidas para consumo incluem a anta (*Tapirus terrestris*), a queixada (*Tayassu pecari*), o caititu (*Tayassu tajacu*) e a paca (*Agouti paca*).

O contato durante o ato da caça, a limpeza e a higienização da carne caçada pode levar à transmissão de várias doenças (Uhart et al. 2012). Essas doenças têm um custo para a humanidade, incluindo um custo econômico e frequentes episódios de epidemia/pandemia aos quais a humanidade está sendo exposta (Val 2020). Tais doenças que são transmitidas de animais para seres humanos, desde o século XIX são chamadas zoonoses (Gomes et al. 2022).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem mais de 200 tipos de zoonoses. Cerca de 60% das doenças infecciosas humanas têm sua origem em animais; 75% das doenças infecciosas emergentes dos seres humanos, incluindo ebola, gripe, COVID-19, toxoplasmose, hanseníase, leptospirose, raiva entre outras são oriundas de zoonoses (BVS 2022).

A fim de entender como essas interações entre ambiente, animais silvestres e humanos acontecem, surgiu o conceito chamado de “*One Health*” (Saúde Única) ou “Saúde Planetária”, que propõe uma mudança de paradigma na abordagem de doenças entre humanos e animais, utilizando conhecimentos da medicina humana e veterinária, fazendo colaborações iguais e

inclusivas (Kaplan et al. 2009). Com isso, a saúde da vida silvestre e humana são diretamente influenciadas por decisões que tomamos sobre gestão ambiental e saúde pública (Stephen 2017).

No Brasil, as zoonoses são monitoradas pelo Ministério de Saúde e atualmente os Centros de Controle de Zoonoses são integrados ao Sistema Único de Saúde (SUS). No entanto, ainda que muitas destas doenças sejam bastante conhecidas, bem como a rota de transmissão animal-humano e sua infecção, pouco se sabe sobre a frequência em que são encontrados esses micro-organismos e o nível de contaminação da proteína de origem animal. Com isso, entre as doenças que podem ser transmitidas pelo contato com animais silvestres, delimitamos nesse estudo a detecção de dois patógenos: *Mycobacterium leprae*, causadora da hanseníase e o *Toxoplasma gondii* que causa a toxoplasmose.

A hanseníase é uma doença crônica caracterizada por lesões na pele e danos nos nervos periféricos (da Silva et al. 2018). A transmissão zoonótica da *M. leprae* ainda é discutida, mas há estudos, como o de Fine et al. (1997), que mostram que a fonte mais importante de infecção provavelmente são os doentes multibacilares não-tratados. Porém existe a possibilidade da existência de bacilos em animais silvestres e estes teriam sérias implicações para o programa de controle e erradicação da doença em humanos (Opromolla 2000), considerando a dificuldade em identificar carnes de caça contaminadas.

Na América do Sul a hanseníase existe em todos os países, e o Brasil apresenta o maior número de casos registrados: 105.744 mil. A doença ocorre em todos os estados, variando as taxas de prevalência entre regiões. As prevalências mais altas dividem-se entre as regiões Amazônica (8 por dez mil) e Centro Oeste (6,42 por dez mil). A hanseníase não é apenas uma doença de pele contagiosa; pois pode provocar patologias nos nervos periféricos que causam incapacidades e deformidades, além de ser responsável pelo preconceito e tabus que envolvem a doença. Infelizmente, cerca de 2/3 dos pacientes, no momento do diagnóstico, já apresentam algum grau de incapacidade (Opromolla 2000).

Outro patógeno estudado é o *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose. O *T. gondii* tem um ciclo de vida complexo e é um importante patógeno de origem alimentar. Desse modo a infecção humana pode resultar da ingestão ou manuseio de carne crua ou mal cozida contendo cistos no tecido do hospedeiro doméstico ou silvestre. Alternativamente, pode resultar do contato direto com felinos ou do consumo de água ou alimentos contaminados por oocistos excretados nas fezes de felinos infectados (Montoya e Liesenfeld 2004).

Em mulheres grávidas, pode ocorrer a toxoplasmose congênita (TC), quando os bebês são contaminados por transmissão transplacentária (Torgerson e Mastroiacovo 2013). Neste caso, pode resultar na morte fetal e aborto, ou em síndromes que incluem déficits neurológicos e neurocognitivos, além de coriorretinite (processo inflamatório na estrutura do olho - coróide) (Jones et al. 2001). As lesões oculares causadas por infecção congênita geralmente não são identificadas no nascimento, mas ocorrem em 20 a 80% das pessoas infectadas na idade adulta. A doença ocular pode se reativar meses ou anos depois, causando, cada vez, mais danos à retina e levando até à cegueira (WHO 2015).

Neste trabalho, foram utilizados marcadores moleculares com o objetivo de identificar a presença do DNA da *Mycobacterium leprae*, agente causador da hanseníase; e de DNA de membros da subfamília Toxoplasmatinae, que inclui o patógeno *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose, em carnes de caça comercializadas para o consumo humano em feiras do município de Coari, região do médio rio Solimões, Amazonas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Detectar a presença de DNA de patógenos causadores de zoonoses: *M. leprae* e *T. gondii* em amostras de carnes de caça comercializadas para consumo humano no município de Coari, Amazonas.

Objetivos específicos

- Estimar a quantidade de animais, de diferentes famílias de mamíferos que podem estar contaminados com esses patógenos.
- Analisar através da biologia molecular se em amostras de carne de caça houve presença de DNA da *Mycobacterium leprae*, causador da hanseníase.
- Analisar através da biologia molecular se em amostras de carne de caça houve presença de DNA de membros da subfamília Toxoplasmatinae, que inclui o patógeno *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose.

Capítulo 1 - Carne de caça e *Mycobacterium leprae*: a possibilidade de animais silvestres serem transmissores ou portadores da hanseníase

Chapter 1 - Bushmeat and *Mycobacterium leprae*: the odds of wild animals as zoonotic vectors of leprosy

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa que afeta principalmente a pele e o sistema nervoso periférico, levando a manifestação de lesões cutâneas com diminuição das sensibilidades térmica e tátil, e conforme o tempo de evolução pode provocar incapacidade física. O agente etiológico dessa doença é a *Mycobacterium leprae*, bactéria normalmente transmitida de uma pessoa para a outra por meio secreções das vias respiratórias. De acordo com Ministério da Saúde, no ano de 2021 foram detectados 424 casos de hanseníase no estado do Amazonas. O consumo da carne de animais silvestres (carne de caça) ocorre em várias partes do mundo e esse consumo é considerado uma das mais importantes rotas de transmissão de patógenos. Nesse estudo foi coletado 168 amostras de carne de caça nas feiras do município de Coari – AM no médio Rio Solimões. Através da amplificação do gene do antígeno 18-KDa por Nested PCR, o microrganismo foi detectado em 77,98% das amostras. No entanto, devido ao tamanho das sequencias, apenas cinco amostras confirmaram a presença de *M. leprae* por sequenciamento e comparação via BLASTn. Nossos dados representam um risco à saúde pública, sendo assim nossa pesquisa pode desempenhar um papel importante na epidemiologia da hanseníase, contribuindo com a saúde pública do Amazonas.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*, zoonose, carne de caça, marcadores moleculares, animais silvestres, Coari.

Abstract

Leprosy is an infectious disease that mainly affects the skin and the peripheral nervous system, leading to the manifestation of skin lesions with decreased thermal and tactile sensitivity and depending on the time of evolution, it can cause physical disability. The etiological agent is the microorganism *Mycobacterium leprae*, this bacterium is normally transmitted from one person to another through secretions of the respiratory tract. According to the Ministry of Health in 2021, 424 cases of leprosy were detected in the state of Amazonas. The consumption of wild animal meat (bushmeat) occurs in several parts of the world and this consumption is considered one of the most important routes of transmission of pathogens. In our study, we collected 168 samples of bushmeat at fairs in the municipality of Coari - AM on the mid Solimões River. Through amplification via nested PCR of the 18-KDa antigen gene of *M. leprae*, we obtained 77.98% positivity. However due to the small number of base pairs we were able to sequence only five samples confirming it to be *M. leprae* via BLASTn. As we have seen, zoonosis can pose a risk to public health, so our research can play an important role in the epidemiology of leprosy, contributing to public health in the country.

Keywords: *Mycobacterium leprae*, zoonosis, bushmeat, molecular markers, wild animals, Coari.

INTRODUÇÃO

A *Mycobacterium leprae* é o agente etiológico da hanseníase, uma doença infecciosa crônica presente em mais de 120 países. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 208.619 casos novos da doença foram diagnosticados em 2018, sendo a maioria no Brasil, o segundo lugar na relação de países com maior número de casos de hanseníase no mundo, estando atrás apenas da Índia (OMS 2019). Essa bactéria é normalmente transmitida de uma pessoa para outra através das secreções das vias respiratórias (Rodini 2010), ocasionando uma doença de desenvolvimento lento e crônico, causando lesões na pele e danos progressivos nos nervos que podem levar à fraqueza muscular, atrofia, amputações e cegueira (Scollard et al. 2006; Silva et al. 2018). De acordo com o Ministério da Saúde, a *M. leprae* se manifesta por meio de sinais e sintomas dermatoneurológicos, mostrando uma predileção da bactéria por nervos periféricos, que são responsáveis por distúrbios neurológicos que normalmente resultam em incapacidades físicas e deformidades (Brasil 2016).

Nas Américas, o Brasil mantém a situação mais desfavorável em relação à hanseníase, com um grande impacto negativo para a saúde pública (Magalhães e Rojas 2007), pelo seu poder de causar incapacidade física, social e econômica (Ribeiro et al. 2018). A OMS, em 2016, relatou que havia cerca de 27 mil casos de hanseníase nas Américas, dos quais 92,2% foram registrados no Brasil (WHO 2017). As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste apresentam prevalência acima da média nacional (Ribeiro et al. 2018), onde a Amazônia aparece como a região do país onde são registradas as maiores taxas de novos casos, apesar de apresentar uma baixa densidade populacional comparada a outros locais (Penna et al. 2009).

No estado do Amazonas, embora se observe uma redução nas taxas de novos casos de hanseníase, nos anos de 2017 a 2019 um total de 1.333 casos da doença foram registrados (SES-AM 2020). De acordo com Ministério da Saúde (2021), no ano de 2021 foram registrados 424 casos de hanseníase no estado, desses 156 (36,79%) residentes de Manaus e 268 (63,21%) residentes em outros 45 municípios (Brasil 2023).

Na Amazônia, o clima tropical e a floresta com dimensões continentais, atrelados à proximidade do homem com este ambiente, o desmatamento, constituem como alguns fatores que agravam problemas de saúde típicos dessa região, já que a população urbana tem maior contato com diferentes espécies de animais silvestres (Val 2020), usados como fonte alimentar ou fonte de renda.

O consumo da carne de animais silvestres (carne de caça) ocorre em várias partes do mundo, em especial na África Central e na Bacia Amazônica; esse consumo é considerado uma

das mais importantes rotas de transmissão de patógenos (Chomel et al. 2007). Além disso, há outras formas de contaminação, como a indireta os indivíduos que fazem a limpeza e processamento da carne do animal caçado estão em contato direto com o sangue e fluidos, ficando expostos aos agentes infecciosos ali presentes (Lebreton et al. 2006).

Um dos principais problemas para a saúde pública, são as zoonoses (Plowright et al. 2017). Que são doenças transmitidas de animais para seres humanos ou vice-versa, por meio de diferentes agentes etiológicos (Gomes et al. 2022). Existem mais de 150 doenças de caráter zoonótico, como por exemplo raiva, leptospirose, toxoplasmose, leishmaniose, doença de Chagas, febre maculosa, entre outras (Langoni 2004).

A transmissão zoonótica da *M. leprae* ainda é discutida, mas há estudos, como o de Fine et al. (1997), que mostraram que uma das fontes de infecção provavelmente são os doentes multibacilares não-tratados. Porém, existe a possibilidade da existência de bacilos em animais silvestres e este teria sérias implicações para o programa de controle e erradicação da doença em humanos (Opromolla 2000), considerando a dificuldade em identificar carnes de caça contaminadas.

Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo identificar a presença de *M. leprae* em amostras de carnes de caça de diferentes espécies de animais que são comercializados nas feiras no município de Coari – Amazonas.

MATERIAL E MÉTODOS

O município de Coari está localizado no médio Rio Solimões e possui área de 57.921 km², com população local estimada em 84.272 habitantes, distribuída nas zonas urbana e rural, com grande parte desses habitantes morando em comunidades ribeirinhas (próximo aos rios e florestas), longe da cidade (IBGE 2018).

As amostras coletadas representam pequenos pedaços, em torno de 2cm³ de tecido muscular de carnes de mamíferos coletados sob licença do SISBIO número 73881-1. As amostras foram armazenadas em tubos criogênicos contendo etanol 98% e armazenadas em freezer a -2°C até a realização da extração do DNA, e encontram-se depositadas na Coleção de Tecidos de Mamíferos do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.

O DNA total de cada amostra foi extraído via protocolo CTAB 2% (Doyle e Doyle 1987) e utilizado para a amplificação do gene do antígeno 18-KDa de *M. leprae*, por meio da

técnica de *nested* PCR, usando dois pares de *primers* (LP1 + LP2 e LP3 + LP4) (Donoghue et al. 2001). A primeira amplificação foi realizada utilizando o DNA total e um par de *primers* (LP1 + LP2), que amplificam 129pb, além dos outros componentes do mix (4,3 µL ddH₂O; 1,5 µL MgCl₂ (25mM); 1,5 µL Buffer diluído (1:10); 1,5 µL dNTP (2 mM); 1,2 µL de cada par de *primers* (2 mM) e 0,3 µL Taq (1U/µL), totalizando 11,5 µL de volume final). O ciclo de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial (98 °C por 4 minutos), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 20 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Em um novo tubo contendo 1,5 µL do produto final da primeira PCR, foi adicionado um novo mix com iguais proporções de reagentes, substituindo somente o par de *primers*, que são internos ao anterior (LP3 + LP4), e amplificam um fragmento de 81pb. Em todas as reações realizadas foi utilizada uma amostra de controle positivo (DNA do patógeno), cedida pela Fundação Hospitalar Alfredo da Matta - FUHAM (Manaus), para confirmar o padrão e tamanho da banda de DNA amplificado visualizado em gel de agarose; e uma amostra como controle negativo (mix de reagentes sem DNA).

Para a confirmação da amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras positivas foram purificadas utilizando a enzima EXOSAP (BioLabs^{inc.}- New England) e a reação de sequenciamento foi realizada usando o *Kit Big Dye Terminator* (Applied Biosystems) e injetadas no Sequenciador automático ABI 3130^{xl}, de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras positivas foi realizado no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

A edição e análise das amostras obtidas foram realizadas utilizando o programa Geneious 5.6.3 (Kearse et al. 2012). Posteriormente, foi utilizado o *software* BLAST, (Altschul et al. 1997) em busca de sequências nucleotídicas altamente similares (*Highly similar sequences*) para confirmação e comparação da região sequenciada com dados disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS

Entre 2019 e 2022, foram obtidas 168 amostras de carne de caça pertencentes a mamíferos de diferentes espécies. Destas amostras, o DNA de *M. leprae* foi detectado em 131 (77,98%). As espécies de animais testadas foram: anta (*Tapirus terrestris*), boto (*Inia geoffrensis*), caititu (*Pecari tajacu*), capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cutia (*Dasyprocta fuliginosa*), macaco, paca (*Cuniculus paca*), peixe-boi (*Trichechus inunguis*), queixada (*Tayassu pecari*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), tatu (*Dasypus* spp.) e veado (*Mazama* spp.); e as amostras mais encontradas nas feiras foram de paca (n = 74), seguido de anta (n = 37) e queixada (n = 16). As quantidades de amostras por espécies e os percentuais de positividade para cada espécie podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Positividade para *M. leprae* em amostras de carnes de caça de diferentes espécies de animais apreendidos no município de Coari – Amazonas, de 2019 a 2022.

Nome comum	Nome científico	Nº de amostras	Nº de amostras positivas	% de amostras positivas
Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	37	30	81,90
Boto	<i>Inia geoffrensis</i>	1	1	100,00
Caititu	<i>Pecari tajacu</i>	7	5	71,42
Capivara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	2	2	100,00
Cutia	<i>Dasyprocta leporina</i>	3	3	100,00
Macaco	Não identificado	1	1	100,00
Paca	<i>Cuniculus paca</i>	74	59	79,73
Peixe-boi	<i>Trichechus inunguis</i>	11	10	90,90
Queixada	<i>Tayassu pecari</i>	16	8	50,00
Tamanduá	<i>Tamandua tetradactyla</i>	1	0	0
Tatu	<i>Dasypus</i> spp.	5	5	100,00
Veado	<i>Mazama</i> spp.	10	8	80,00
TOTAL	---	168	131	77,98%

Após identificação de amplificação positiva de *M. leprae*, das 131 amostras selecionamos 17 amostras para serem sequenciadas, uma vez que o sequenciamento serviu para confirmar se o fragmento de DNA amplificado pertencia a *M. leprae*. Além disso, o fragmento

obtido na *nested* PCR era muito pequeno, entre 114 e 133 pares de bases, e as sequências obtidas não foram satisfatórias, pois mesmo sendo purificadas obtivemos problemas no sequenciamento. Por isso, apenas cinco das amostras selecionadas foram utilizadas para análise no BLAST. As cinco amostras apresentaram porcentagem de identidade com a sequência de referência do GenBank que variou de 100% a 94.05% (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificação das amostras selecionadas após sequenciamento, *query cover*, porcentagem de identidade com sequências do GenBank e tamanho do fragmento das amostras sequenciadas positivas para *M. leprae*.

<i>Identificação da amostra</i>	<i>Query Cover (%)</i>	<i>E value</i>	<i>Porcentagem de identidade</i>	<i>Tamanho (pb)</i>	<i>Referência GenBank</i>	<i>Nome Seq. de referência</i>
CTG_M_31 Paca	57%	8e-30	100%	133	MF975706.1	<i>Mycobacterium leprae</i> clone m787-17 RLEP repeat region
CTG_M_39 Anta	50%	4e-17	98.28%	114	MF975706.1	<i>Mycobacterium leprae</i> clone m787-17 RLEP repeat region
CTG_M_40 Paca	65%	3e-24	94.05%	123	MF818035.1	<i>Mycobacterium leprae</i> clone S473 Rlep repeat region
CTG_M_55 Paca	57%	8e-30	100%	133	MF975706.1	<i>Mycobacterium leprae</i> clone m787-17 RLEP repeat region
CTG_M_56 Paca	60%	2e-25	97.37%	123	MF975706.1	<i>Mycobacterium leprae</i> clone m787-17 RLEP repeat region

DISCUSSÃO

Esta pesquisa descreve a análise de 168 amostras de carne de caça de várias espécies de mamíferos do município de Coari – AM. Como vimos sobre as zoonoses, os animais silvestres naturalmente infectados com *M. leprae*, não pode ser descartada a possibilidade de transmissão para humanos (Maruyama et al. 2018).

Foi evidenciada a prevalência de *M. leprae* nas amostras de carne de caça que seriam utilizadas para consumo da população no interior do Amazonas. Das 11 espécies coletadas nas feiras, exceto uma espécie, a de tamanduá não foi detectado o DNA do patógeno. Talvez pelo fato de os tamanduás serem animais discretos e de hábitos noturnos, e por se alimentar sobretudo de cupins e formigas (Tavares e Koenemann 2008) ele esteja fora do alcance do bacilo da *M. leprae*.

Segundo Valois (2019), a *M. leprae* pode ser encontrada em animais reservatórios das ordens cingulata como os tatus que pelos nossos resultados apareceram em 100% das amostras (n=5/5), didelphimorphia como gambás e cuicas, e rodentia como as capivaras (n=2/2), as pacas (n=74/59) e as cutias (n=3/3). Também há informações de presença da bactéria em primatas, incluindo chimpanzés e macacos (no nosso caso n=1/1) (Fukunishi et al. 1984; Honap et al. 2018; Vera-Cabrera et al. 2015; Lima et al. 2016).

Outros autores já haviam documentado que animais silvestres podem ser fonte de contaminação por *M. leprae*, e que muitos deles apresentam elevado percentual de positividade (Cardona-Castro et al. 2015; da Silva et al. 2018; Sharma et al. 2013). Como por exemplo, Silva et al. (2018) que encontraram uma prevalência de 62% para essa bactéria em tatus no Estado do Pará. Esses animais possuem um importante papel epidemiológico na manutenção de diversos patógenos tanto no ciclo doméstico quanto no silvestre, especialmente em áreas rurais, onde a sua caça e consumo são frequentes, sem que haja qualquer tipo de inspeção sanitária (Capellão et al. 2015). A associação do tatu com a hanseníase, infelizmente foi observado entre os nossos resultados, onde foram coletadas cinco amostras de tatus e todas foram positivas.

Antes disso, Deps et al. (2008) já haviam feito a relação de pacientes com hanseníase e pessoas que mantinham algum tipo de contato com tatu. Foram coletados dados de 506 pacientes com hanseníase e 594 controles (pessoas que mantinham ou mantiveram algum contato com tatus) sobre exposição a tatus; e observaram a exposição direta ao tatu foi relatada por 68% dos casos de hanseníase e por 48% dos controles.

Borges et al. (2021) desenvolveram uma pesquisa onde aplicaram questionários a voluntários das regiões do Alto Paranaíba e Noroeste de Minas Gerais para saber dos voluntários o que sabiam sobre as antas. Nos relatos do estudo foi observado que existe, ainda na região, a cultura da caça para alimentação, sendo a anta muito apreciada para este fim sendo que dos entrevistados 58% disseram saber que a causa sobre os animais mortos foi devido aos atropelamentos, porém também foram citadas que nestas regiões as antas foram abatidas por caça esporádica com arma de fogo.

Outro aspecto importante deste estudo foi a grande quantidade de diferentes espécies de animais infectados por *M. leprae*. Com exceção do tamanduá-mirim, todas as outras espécies apresentaram prevalências do DNA, evidenciando que essa bactéria está bem distribuída nos animais silvestres terrestres e aquáticos, como boto e peixe-boi.

Falando em mamíferos aquáticos, o peixe-boi (n=11) também é preferência na mesa de quem come derivados da caça como a carne, a gordura e a pele. O peixe-boi de água doce é endêmico da bacia Amazônica, ocorrendo em sistemas fluviais e lacustres, desde as cabeceiras na Colômbia, Equador e Peru até a foz do rio Amazonas (Marmontel et al. 2016). Borges et al. (2007 e 2011) fizeram estudos onde encontraram parasitas do gênero *Cryptosporidium* spp., e pela primeira vez foi descrita a ocorrência de *Giardia* sp. em fezes de peixes-boi amazônicos. E em nossas amostras houve positividade de 90,9% para *M. leprae*.

É importante citar que devido à condição atual das populações em relação às inúmeras e constantes ameaças antrópicas, atualmente a anta brasileira encontra-se listada na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza da IUCN - *International Union for Conservation of Nature* como “Vulnerável à Extinção” (Rodden 2012; IUCN 2023). Outro estudo sobre carne de anta foi feito por Ferreira et al. (2007) que entrevistaram moradores a fim de entender sobre os aspectos da atividade de caça no Assentamento Rural Nova Canaã no estado do Amapá, onde observou-se que a carne de anta é a mais consumida em relação as outras opções de carne de caça como veado, capivara, queixada. Já em nossos estudos também vimos uma grande quantidade de amostras de carne de anta nas feiras (n=37) e 81,9% delas foram positivas para *M. leprae*.

Infelizmente o contato entre seres humanos e animais silvestres e domésticos, facilitam a proliferação de agentes infecciosos, e esses animais tanto em vida livre como em cativeiro podem ser portadores ou reservatórios de doenças (Barbosa et al., 2011; Rodrigues et al., 2017) e a manipulação da carne desses animais pode ser um fator de risco para sua transmissão no interior do Amazonas.

Apesar do desenvolvimento econômico, da expansão da saúde pública, e todos os esforços do programa de controle da hanseníase nos últimos anos, essa doença ainda não foi erradicada e novos casos são detectados a cada ano. Reservatórios de doenças, como animais silvestres, podem desempenhar papel persistente na transmissão de *M. leprae* para humanos e tem sido cada vez mais citado como uma possibilidade real, o que exigiria uma abordagem diferente para o controle e prevenção da hanseníase, cujo programa de eliminação está entre as ações prioritárias do Ministério da Saúde (Magalhães e Rojas 2007; Truman 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bactéria *M. leprae* foi encontrada em diferentes espécies de animais silvestres utilizadas para consumo humano no interior do estado do Amazonas, no entanto estudos sobre a importância desses animais na transmissão da hanseníase são necessários para compreender o real papel de cada espécie na manutenção desse ciclo de transmissão.

Dessa forma, estratégias de promoção da saúde voltadas para a prevenção de doenças transmitidas por alimentos são extremamente importantes, corrigindo falhas nas condições de higiene e ou nas práticas de manipulação, e criando programas de informação para a população sobre o risco de transmissão da hanseníase associado à caça e consumo de animais silvestres.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- Barbosa, A.D.; Martins, N.R.S.; Magalhães, D.F.; et al. 2011. Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.14, n.1/2/3, p.1-9.
- Boletim Epidemiológico 2021. Manaus: Fundação Hospitalar Alfredo da Matta, 2000 –Anual. http://www.fuham.am.gov.br/wp-content/uploads/2014/05/Boletim_2021.pdf. Acessado em: 23/04/2023.
- Borges, J.C.G.; Alves, L.C.; Lima, D.S.; et al. 2007. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em manatí amazônico (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883). *Biotemas*, v. 20, n. 3, p. 63-66.
- Borges, J.C.G.; Alves, L.C.; Faustino, M.A.G.; et al. 2011. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 42, p. 593-596.
- Borges, D.C.S.; Pereira, S.G.; Machado, F.C.A.; et al. 2021. Anta Brasileira –*Tapirus terrestris*: características gerais, mitológicas e seu conhecimento popular nas regiões do Noroeste e do Alto Paranaíba em Minas Gerais. *Revista de Pesquisa Interdisciplinar*, [S.l.], v. 5, jun. ISSN 2526-3560. Disponível em: <https://cfp.revistas.ufcg.edu.br/cfp/index.php/pesquisainterdisciplinar/article/view/1476/603>. Acessado em: 24 abr. 2023.
- Brasil 2023. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Município de notificação Manaus e Coari. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/hanswam.def>. acessado em 23/04/2023.
- Brasil 2019. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Volume único. 4. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 725 p. Capítulo 5.
- Brasil 2016. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. Brasília, DF: Ministério da Saúde.
- Capellão, R.T.; Lazar, A.; & Bonvicino, C.R.; et. al. 2015. Infecção natural por agentes zoonóticos em tatus (Mammalia: Cingulata) na América do Sul. *Bol. Soc. Bras. Mastozool.* 73: 23-36.
- Cardona-Castro, N.; Beltrán, J.C.; Ortiz-Bernal, A.; et al. 2009. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the Andean region of Colombia. *Lepr Rev.* 80(4):424–31.

- Chomel, B.B.; Belotto, A.; Meslin, F.X.; et al. 2007. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, p.6-11.
- da Silva, M.B.; Portela, J.M.; Li, W.; et al. 2018. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. *PLoS Negl Trop Dis* 12(6): e0006532. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006532>.
- Deps, P.D.; Alves, B.L.; Gripp, C.G.; et al. 2008. Contact with armadillos increased the risk of leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 74:338-42.
- Deps, P.D.; Faria, L.V.; Gonçalves, V.C.; et al. 2003. Aspectos epidemiológicos da transmissão da hanseníase em relação a exposição ao tatu. *Hansenologia Internationalis* 28 (2): 138-144.
- Donoghue, H.D.; Holton, J.; Spigelman, M.; et al. 2001. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *Journal of Medical Microbiology*, v. 50, p. 177–182.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L.; 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11–15.
- Ellwanger, J.H.; Kulmann-Leal, B.; Kaminski, V.L.; et al. 2020. Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 92.
- Ferreira, D.S.S.; Campos, C.E.C.; Sá-Oliveira, J.C.; et al. 2007. Atividades de caça de animais silvestres no assentamento rural Nova Canaã, Amapá, Brasil. Universidade Federal do Amapá, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Zoologia. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 23 a 28 de setembro, Caxambu – MG.
- Fukunishi, Y.; Meyers, W.M.; Binford, C.H.; et al. 1984. Electron microscopic study of leprosy in a mangabey monkey (natural infection). *Int J Lepr Other Mycobact Dis*.
- Gauci, C.; Gauci, A.A.; 2005. What does the food handler in the home know about salmonellosis and food safety? *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*. Londres. v.125, n3, p.136-142. <https://doi.org/10.1177/146642400512500318>.
- Gomes, L.G.O.; Gomes, G.O.; Fodra, J.D.; et al. 2022. Zoonoses: as doenças transmitidas por animais. *Revista Brasileira Multidisciplinar – ReBraM*. Vol. 25, n.2.
- Honap, T.P.; Pfister, L.A.; Housman, G.; et al. 2018. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(1):1–17.
- IBGE 2018. IBGE divulga as Estimativas de População dos municípios para 2018. Editoria: Estatísticas Sociais. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22374-ibge-divulga-as-estimativas-de-populacao-dos-municipios-para-2018>.
- IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019.1. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: 23 abr. 2023.
- Kaplan, B.; Kahn, L.H.; Monath, T.P.; et al. 2009. One Health and parasitology. *Parasites & vectors* 2.1 (2009): 1-3.

- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; et al. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28 (12): 1647-9.
- Langoni, H.; 2004. Zoonoses and human beings. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2004; V.10 (2):111.
- Lebreton, M.; Prosser, A.; Tamoufe, U.; et al. 2006. Patterns of bushmeat hunting and perceptions of disease risk among central African communities. *Animal Conservation*, v. 9, n. 4, p. 357–363.
- Lima, M.F.; Lima, L.N.G.C.; Martins, L.C.; et al. 2016. A detecção do DNA do *Mycobacterium leprae* em roedores silvestres da região amazônica.
- Magalhães, M.C.C.; Rojas, L.I.; 2007. Spatial Differentiation of Leprosy in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 16(2): 75 – 84.
- Maruyama, F.H.; Morgado, T.O.; Pacheco, R.C.; et al. 2018. Molecular detection of *Mycobacterium leprae* by Polymerase Chain Reaction in captive and free-ranging wild animals. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22, 445-447.
- Marmontel, M.; de Souza, D.; Kendall, S.; et al. 2016. *Trichechus inunguis*. The IUCN Red List of Threatened Species: e. T22102A43793736. Acesso em: 20 abr. 2023.
- Mendes, F.L.S.; 2014. Comércio de animais silvestres na Amazônia: um problema histórico ainda sem solução. *Ver-a-Cienc* 5: 40-3.
- Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Acompanhamento dos dados de Hanseníase – Amazonas (Manaus e Coari). <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/hanswam.def>. acessado em: 22/04/2023.
- Mittermeier, R.A.; Myers, N.; Thomsen, J.B.; et al. 1998. Biodiversity Hotspots and Major Tropical Wilderness Areas: Approaches to Setting Conservation Priorities. *Conservation Biology*, vol. 12, no. 3, pp. 516–20. *JSTOR*. <http://www.jstor.org/stable/2387233>. Accessed 23 Apr. 2023.
- OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy free world. *Weekly Epidemiological Record*, Genebra, n. 94, p. 389-412, 30 ago. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326775/WER9435-36-en-fr.pdf?ua=1>. Acesso em: 15 abr. 2023.
- Opromolla, D.V.A.; 2000. Noções de Hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. 126 p. ilus, graf. Monografia em português - LILACS, AHM-Acervo, CAMPOLIMPO-Acervo | ID: lil-642153. Biblioteca responsável: BR2025.
- Plowright, R.K.; Parrish, C.R.; McCallum, H.; et al. 2017. Pathways to zoonotic spillover. *Nat Rev Microbiol* 15, 502–510.
- Penna, M.L.F.; de Oliveira, M.L.W.R.; Penna, G.; et al 2009. Spatial distribution of leprosy in the Amazon region of Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. V. 15, p. 650–652.

- Perrota, A.P.; 2020. Serpentes, morcegos, pangolins e ‘mercados úmidos’ chineses: Uma crítica da construção de vilões epidêmicos no combate à Covid-19. *Dilemas: Revista de Estudos de Conflito e Controle Social*, 1-6.
- Prata, L.F.; 1999. Manual de enfermidades transmitidas por alimentos. Jaboticabal: FUNEP.
- Ribeiro, M.D.A.; Silva, J.C.A.; Oliveira, S.B.; 2018. Estudo epidemiológico da hanseníase no Brasil: reflexão sobre as metas de eliminação. *Rev Panam Salud Publica*. 42: e 42. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.42>.
- Rodden, M.; Rodrigues, F.; Bestelmeyer, S.; et al. 2008. IUCN. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN de 2012 Versão 2.
- Rodini, F.C.B.; 2010. Proposta de avaliação e intervenção através de prevenção de incapacidade em pacientes com a Hanseníase. 90f. Dissertação (Mestrado em Medicina). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Rodrigues, C.F.M.; Rodrigues, V.S.; Neres, J.C.I.; et al. 2017. Desafios da saúde pública no Brasil: relação entre zoonoses e saneamento. *Scire Salutis*, v.7, n.1, p.27-37.
- [Rylands, A.B.; Brandon, K.; 2005. *Brazilian Protected Areas. Conservation Biology Volume 19, Issue 3. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00711.x.2005.*](#)
- Silva, A.; 2007. Comida de gente: preferências e tabus alimentares entre os ribeirinhos do Médio Rio Negro (Amazonas, Brasil). *Revista de Antropologia, São Paulo, USP, V. 50 Nº 1*.
- Scollard, D.M.; Adams, L.B.; Gillis, T.P.; et al. 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*, v.19, p.338–381.
- Sharma, R.; Lahiri, R.; Scollard, D.M.; et al. 2013. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech [Internet]*. 6(1):19–24.
- Stephen, C.; 2017. Wildlife health 2.0: Bridging the knowledge-to-action gap. *Journal of wildlife diseases*, 53(1), 1-4.
- SES-AM Secretaria De Estado De Saúde, 2020. <http://saude.am.gov.br/visualizar-noticia.php?id=4164>. Acessado em 19/02/2022.
- Silva, M.B.; Portela, J.M.; Li, W.; et al. 2018. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 6, p. 1–19.
- Soragni, L.; Barnabe, A.S.; Mello, T.R.C.; et al. 2019. Doenças transmitidas por alimentos e participação da manipulação inadequada para sua ocorrência: uma revisão. *Estação Científica (UNIFAP)*. Macapá, v. 9, n. 2, p. 19-31, abr./jun. DOI: 10.18468/estcien.2019v9n2. p.19-31.
- Tavares, S.V.; Koenemann, J.G.; 2008. Ocorrência de *Tamandua tetradactyla* (Linnaeus, 1758) (Xenarthra, Myrmecophagidae) no município de Itaquí, fronteira oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Biod. Pamp*. v.6, p.30-33.

- Truman, R.; Fine, P.E.M.; 2010. “Environmental” sources of *Mycobacterium leprae*: issues and evidence. *Lepr Rev.* 81: 89–95. pmid: 20825112.
- Uhart, M.; Pérez, A.A.; Rostal, M.; et al. 2012. A “One Health” Approach to Predict Emerging Zoonoses in the Amazon. 1a Conferência Brasileira em Saúde Silvestre e Humana. Rio de Janeiro, Brazil.
- Val, A.I.; 2020. Biodiversity – the hidden risks. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(1), e20200699.
- Valois, E.M.S.; 2019. Detecção molecular da viabilidade de *Mycobacterium leprae* em animais silvestres e possível associação na manutenção da transmissão da doença em região hiperendêmica da Amazônia Meridional - Botucatu. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu.
- Vera-Cabrera, L.; Escalante-Fuentes, W.; Ocampo-Garza, S.S.; et al. 2015. *Mycobacterium lepromatosis* infections in Nuevo León, Mexico. *J Clin Microbiol.* 53(6):1945–6.
- WHO, 2017. Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden. *Wkly Epid Record*, v. 92, p. 501–520.
- WHO, 2020. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9536>.

Capítulo 2 - Detecção molecular de Toxoplasmatinae (*T. gondii*) em carnes de caça na região do Médio rio Solimões, Amazonas, Brasil

Chapter 2 - Molecular detection of Toxoplasmatinae (*T. gondii*) in bushmeat in the mid Solimões river region, Amazonas, Brazil

Resumo

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório reconhecido como o agente etiológico causador da toxoplasmose, zoonose endêmica em vários países do mundo. É um parasita generalizado de alta preocupação na saúde pública, pois infecta praticamente todos os animais de sangue quente, tanto espécies terrestres quanto aquáticas. Neste trabalho realizamos protocolo de *nested* PCR utilizando os alvos / iniciadores 18S e 5.8S para identificar a presença de patógenos da subfamília Toxoplasmatinae, que inclui o *T. gondii*, em amostras de carnes de caça obtidas em feiras no município de Coari – Amazonas. A análise molecular de 168 amostras de carne de caça revelou positividade 34,52% destas amostras. Os resultados obtidos a partir deste estudo demonstram que há uma grande quantidade de espécies de animais que carregam o DNA do parasita investigado e o consumo de carne de animais silvestres crua ou mal cozida podem representar uma importante fonte de infecção para humanos.

Palavras-chave: zoonose, Toxoplasmatinae, *Toxoplasma gondii*, carne de caça, marcadores moleculares, Coari.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite recognized as the etiological agent that causes toxoplasmosis, an endemic zoonosis in several countries around the world. It is a widespread parasite of high public health concern as it infects virtually all warm-blooded animals, both terrestrial and aquatic species. In this research, we performed a nested PCR protocol using 18S and 5.8S targets / primers to identify the presence of pathogens of the subfamily Toxoplasmatinae, which includes *T. gondii*, in samples of bushmeat obtained at fairs in the municipality of Coari - Amazonas. Molecular analysis of 168 samples of bushmeat revealed positivity in 34.52% of these samples. The results obtained from this study demonstrate that there are a large number of animal species that carry the DNA of the investigated parasite and the consumption of raw or undercooked wild animal meat can represent an important source of infection for humans.

Keywords: zoonosis, Toxoplasmatinae, *Toxoplasma gondii*, bushmeat, molecular markers, Coari.

INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório reconhecido como o agente etiológico causador da toxoplasmose, zoonose endêmica em vários países do mundo (Torres-Castro et al. 2016). Este protozoário infecta praticamente todos os animais de sangue quente, tanto espécies terrestres quanto aquáticas. É um parasito de alta preocupação para a saúde pública, já que causa doença grave e até morte, no caso de toxoplasmose adquirida em pacientes imunocomprometidos (Moratal et al. 2020).

De acordo com Gomes et al. (2022), doenças zoonóticas podem ser transmitidas de duas formas: direta e indireta. A forma direta ocorre através do contato direto com secreções como urina, fezes, sangue ou fluidos corporais, ou por meio de mordedura e/ou arranhadura de animais infectados, e também por água ou alimentos contaminados. Já a forma indireta ocorre por meio da exposição direta à vetores ou animais que carregam o agente etiológico (Langoni 2004).

A toxoplasmose tem três principais vias de transmissão: (1) transmissão vertical da mãe para o feto, (2) ingestão de cistos teciduais de animais infectados e, (3) ingestão de oocistos provenientes da água, solo ou alimentos contaminados (Tenter et al. 2000). A infecção por via oral é a principal forma de ocorrência e disseminação do agente para os humanos e animais (Dubey e Towle 1986).

Os felinos têm importância fundamental na transmissão da toxoplasmose, pois são os hospedeiros definitivos do parasito, onde ocorre a reprodução sexuada desses protozoários. Em animais jovens não imunes, a reprodução ocorre no intestino delgado e ocorre a eliminação de milhares de oocistos nas fezes. Tanto gatos domésticos como silvestres são os únicos animais nos quais o parasita pode realizar o ciclo sexuada ou o ciclo êntero-epitelial e eliminam oocistos no ambiente. O carnivorismo e a dispersão mecânica de oocistos, por insetos por exemplo, facilitam a ampla distribuição deste protozoário que pode então ser ingeridos por hospedeiros intermediários (homens e outros mamíferos) (Dubey et al. 1998; Dubey et al. 2004; Ettinger e Feldman 1997; Shwab et al. 2018).

O *T. gondii* pode ser encontrado em vários tecidos e células (exceto hemácias), além de líquidos orgânicos. Em hospedeiros intermediários (animais silvestres, roedores, aves) e

também nos gatos (hospedeiros definitivos) o ciclo é extraintestinal (macrófagos, células hepáticas, pulmonares, nervosas e musculares) (Urquhart et al. 1996).

De acordo com Neves (2005) o ciclo biológico do *T. gondii* se desenvolve em duas fases distintas: (1) fase assexuada, que ocorre nos linfonodos e nos tecidos dos hospedeiros intermediários (aves, mamíferos, inclusive gatos e outros felídeos); e (2) fase coccidiana ou sexuada, que ocorre nas células do epitélio intestinal somente de felinos jovens não-imunes.

Os oocistos excretados se tornam infecciosos após a esporulação (Shapiro et al. 2019). Este processo resulta na formação de dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos. As propriedades estruturais, moleculares e biofísicas das paredes do oocisto e do esporocisto desempenham um papel fundamental na transmissão ambiental do parasita. Ambas as paredes são principalmente bicamadas proteicas (Mai et al. 2009), o que resulta na sua maior resistência ao meio ambiente (agentes químicos e físicos), se mantendo viáveis durante meses ou anos (Frenkel 1990).

O parasito *T. gondii* tem distribuição geográfica mundial e estima-se que 30% da população seja soropositiva (Neves 2005; Marín-García, Planas e Llobat, 2022; Scallan et al. 2011). Na região do alto rio Negro, a prevalência de reatividade em uma comunidade indígena multiétnica foi de 73,5% (191 casos positivos em um total de 260 pessoas testadas) (Bóia et al. 2008).

Na Guiana Francesa, no período de 1998 a 2006, ocorreram 44 casos positivos para *T. gondii*. Todos os pacientes eram adultos imunocompetentes (não infectados por HIV) que haviam sido hospitalizados devido a uma síndrome infecciosa acentuada e inespecífica. O diagnóstico foi feito por testes sorológicos, que sugeriram infecção primária por amostras de sangue ou amostras broncoalveolar positivas. Além disso, todos os pacientes relataram ingestão de carne de caça e água não tratada (Carme et al. 2009).

Por isso, a detecção direta do parasito ou do seu DNA em tecidos de animais silvestres é de suma importância para analisarmos se há possibilidade de infecção pela ingestão ou manuseio de carnes de caça. Para avaliar se há presença do patógeno ou infecção, o diagnóstico em humanos pode ser realizado por métodos indiretos como os sorológicos e diretamente por reação em cadeia da polimerase (PCR) e isolamento (Kompalic-Cristo, Britto e Fernandes 2005). Também foi observado que em tecidos cerebrais e da medula espinhal de caprinos infectados experimentalmente, maior positividade para *T. gondii* (Rosa et al. 2001).

Neste trabalho utilizamos marcadores moleculares para identificar se há presença do DNA de organismos da subfamília Toxoplasmatinae, incluindo *Toxoplasma gondii*, causador

da toxoplasmose em humanos, em amostras de carnes de caça vendidas em feiras no município de Coari, no estado do Amazonas, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

O município de Coari, localizado no médio rio Solimões, a 366 quilômetros da capital Manaus, possui população estimada de 86.713 pessoas, pelo último censo do IBGE (IBGE 2021). A população urbana do município aumentou 20% entre os anos 2000 e 2010, enquanto a rural diminuiu 4,6% (IBGE 2010). Assim, 65,36% da população vive na área urbana e 34,64% dos habitantes vivem na zona rural, em comunidades dispersas ao longo das margens do rio Solimões, lagos e igarapés (IBGE 2021).

As amostras biológicas representam pequenos pedaços, em torno de 2cm³, de tecido muscular de carnes de mamíferos coletados sob licença do SISBIO número 73881-1. As amostras foram armazenadas em tubos criogênicos contendo etanol 98% e armazenadas em freezer a -2°C até a realização da extração do DNA e encontram-se depositadas na Coleção de Tecidos de Mamíferos do Instituto de Saúde e Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas.

O DNA total das amostras foi extraído de acordo com o protocolo CTAB 2% (Doyle e Doyle 1987). Após a quantificação do DNA foi realizada *nested* PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando dois pares de *primers* da região ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer 1*): ITS-1 JS4_F / ITS-1 CT2c_R e ITS-1 JS4b_F / ITS-1 CT2b_R, desenvolvidos por Soares et al. (2011). Os pares de *primers* amplificam um fragmento de cerca de 500pb dos genes codificadores 18S e 5.8S e foram utilizados para amplificar DNA membros da subfamília Toxoplasmatinae, inclusive a *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose.

A primeira reação de amplificação foi realizada utilizando o DNA total extraído juntamente com o primeiro par de *primers* (ITS1 JS4_F / ITS1 CT2c_R), além dos componentes do mix (5,3 µL de ddH₂O; 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM); 1,5 µL de Buffer diluído (1:10); 1,5 µL de dNTP (2 mM); 1,0 µL do *primer forward* (2 mM) e 1,0 µL do *primer reverse* (2 mM); e 0,2 µL de Taq DNA *Polymerases* (1 U/µL), totalizando 12,0 µL de volume final). O ciclo de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial (94 °C por 3 minutos), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Em um novo tubo contendo 1,5 µL do produto final da primeira PCR, foi adicionado um novo mix com iguais

proporções de reagentes, trocando somente o par de *primers*, que são internos ao anterior (ITS1 JS4b_F / ITS1 CT2b_R). Juntamente com as amostras coletadas, em todas as reações realizadas foram utilizadas amostras com 2 controle positivos (1 e 2) (DNA do patógeno), cedida pelo Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres da Universidade de São Paulo, para confirmar o padrão e tamanho da banda de DNA amplificado visualizado no gel de agarose; e uma amostra como controle negativo (mix de reagentes sem DNA), a fim de confirmar se não estamos lidando com falsos positivos a cada PCR.

Para a confirmação da amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras positivas, foram purificadas utilizando a enzima EXOSAP (BioLabs^{inc.}- New England), e a reação de sequenciamento foi realizada usando o *Kit Big Dye Terminator* (Applied Biosystems) e injetadas no Sequenciador automático ABI 3130xl, de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras positivas foi realizado no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Para edição e análise das sequências obtidas, foi utilizado o programa Geneious 5.6.3 (Kearse et al. 2012). A partir disso, foi possível utilizar o *software* BLAST (Altschul et al. 1997), em busca de sequências nucleotídicas altamente similares (*Highly similar sequences*) para confirmação e comparação da região sequenciada com dados disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS

No período de 2019 a 2022 foram coletadas 168 amostras de carne de caça. As espécies coletadas e identificadas pelos vendedores são: anta (*Tapirus terrestris*), boto (*Inia geoffrensis*), caititu (*Pecari tajacu*), capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cutia (*Dasyprocta fuliginosa*), macaco (espécie não identificada), paca (*Cuniculus paca*), peixe-boi (*Trichechus inunguis*), queixada (*Tayassu pecari*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), tatu (*Dasyopus spp.*) e veado (*Mazama spp.*). Dentre as amostras mais encontradas nas feiras foram de paca (n = 74), seguido de anta (n = 37) e queixada (n = 16).

Das amostras amplificadas, 58 testaram positivas, totalizando 34,52%, conforme tabela 1. O mamífero com maior número de amostras positivas encontradas foi a paca (n=24).

Tabela 1 - Identificação das amostras de carne de caça coletadas entre 2019 e 2022, número de amostras (N) coletadas para cada espécie e número de amostras positivas para DNA da subfamília Toxoplasmatinae.

Nome Comum	Nome Científico	N	Positivas	% de amostras positivas
Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	37	6	16,21
Boto	<i>Inia geoffrensis</i>	1	1	100,00
Caititu	<i>Pecari tajacu</i>	7	3	42,86
Capivara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	2	1	50,00
Cutia	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	3	2	66,66
Macaco	Não identificado	1	1	100,00
Paca	<i>Cuniculus paca</i>	74	24	32,43
Peixe-boi	<i>Trichechus inunguis</i>	11	6	54,54
Queixada	<i>Tayassu pecari</i>	16	4	25,00
Tamanduá	<i>Tamandua tetradactyla</i>	1	0	0
Tatu	<i>Dasybus spp.</i>	5	1	20,00
Veado	<i>Mazama spp.</i>	10	2	20,00
Total		168	58	36,21%

Na figura 1 é possível visualizar alguns dos resultados obtidos a partir dos fragmentos amplificados (PCR) do DNA total extraído das amostras de carne anta (n=37), queixada (n=16), peixe-boi (n=11), veado (n=10) e tatu (n=5) por eletroforese em gel de agarose. Além das amostras de carne de caça foram utilizados dois controles positivos e o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pares de bases.

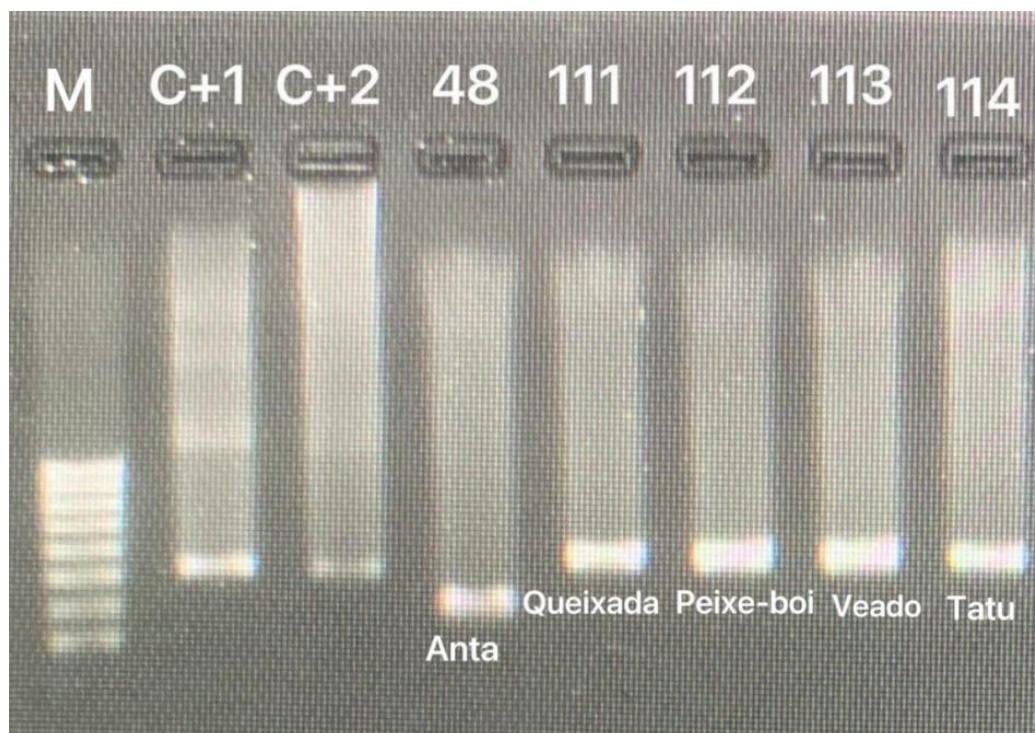


Figura 1 – Gel de agarose mostrando resultado da amplificação utilizando os 2 pares de primers ITS-1 JS4_F / ITS-1 CT2c_R e ITS-1 JS4b_F / ITS-1 CT2b_R para diferentes amostras de DNA. É possível observar o marcador de peso molecular (M), os controles positivos 1 e 2 (C+1 e C+2), além de quatro amostras de diferentes de carnes de caça identificadas abaixo das bandas amplificadas.

Das 58 amostras que foram amplificadas via PCR, mostrando-se positivas quando visualizadas em gel de agarose, 21 foram selecionadas para sequenciamento. Essas amostras foram sequenciadas para confirmar o fragmento amplificado, e destas, 16 apresentaram porcentagem de identidade entre 100% a 89.60% com alguma sequência de *Toxoplasma gondii* já depositada no GenBank, confirmando ser DNA do agente causador da toxoplasmose. As outras cinco amostras (marcadas com um asterisco na tabela 2) tiveram maior porcentagem de identidade com sequências de *Sarcocystis* spp. (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificação das amostras, espécie a qual pertencem, tamanho das amostras em pares de base, query cover, e-value, porcentagem de identidade com a sequência de referência, tamanho das sequencias e referência GenBank.

<i>Amostras</i>	<i>Espécie</i>	<i>Tamanho (pb)</i>	<i>Query Cover</i>	<i>E value</i>	<i>Identidade</i>	<i>GenBank Ref. ID</i>	<i>Nome Seq. de referência</i>
CTG_M_06 Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	440	97%	0.0	99.06%	MH793505.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate 373 PR internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_27 Paca	<i>Cuniculus paca</i>	451	95%	0.0	99.08%	KX459518.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Bb1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_29 Paca	<i>Cuniculus paca</i>	442	99%	0.0	99.09%	MH793505.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate 373 PR internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
*CTG_M_38 Paca	<i>Cuniculus paca</i>	264	10%	0.031	100.00%	MH590230.1	<i>Sarcocystis</i> sp. clone J1.11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_49 Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	446	98%	0.0	98.87%	KX459518.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Bb1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_62 Paca	<i>Cuniculus paca</i>	451	96%	0.0	97.95%	MH793505.3	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate 373 PR internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_65 Peixe-boi	<i>Trichechus inunguis</i>	205	14%	0.007	100.00%	JF810959.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate CHICKTGHEBA86 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
*CTG_M_66 Peixe-boi	<i>Trichechus inunguis</i>	220	12%	0.025	100.00%	MH590230.1	<i>Sarcocystis</i> sp. clone J1.11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_95 Paca	<i>Cuniculus paca</i>	437	94%	0.0	96.27%	MH793505.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate 373 PR internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
*CTG_M_97 Paca	<i>Cuniculus paca</i>	554	28%	1e-34	85.37%	GU200662.1	<i>Sarcocystis</i> sp. SN-2009b 18S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1

*CTG_M_104 Veado	<i>Mazama americana</i>	206	13%	0.024	100.00%	MH590230.3	<i>Sarcocystis</i> sp. strain MM600 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_111 Queixada	<i>Tayassu pecari</i>	450	94%	0.0	98.82%	KX459518.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Bb1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_112 Peixe-boi	<i>Trichechus inunguis</i>	444	97%	2e.171	92.24%	KX459518.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Bb1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_113 Veado	<i>Mazama americana</i>	447	91%	3e.144	89.60%	KX459518.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Bb1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_114 Tatu	<i>Dasypus novemcinctus</i>	444	98%	0.0	98.86%	MH793505.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate 373 PR internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_126 Paca	<i>Cuniculus paca</i>	449	95%	0.0	98.84%	KX459518.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Bb1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_133* Paca	<i>Cuniculus paca</i>	560	95%	3e-115	82.05%	MH918015.1	<i>Sarcocystis</i> sp. strain MM600 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_145 Queixada	<i>Tayassu pecari</i>	444	97%	0.0	99.54%	KX459518.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Bb1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_149 Paca	<i>Cuniculus paca</i>	444	97%	0.0	98.38%	KX459518.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Bb1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
CTG_M_153 Macaco		443	94%	0.0	98.82%	MH793505.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate 373 PR internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene

CTG_M_167 Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	452	93%	0.0	99.53%	MH793505.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate 373 PR internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene
Controle Positivo 1	<i>Toxoplasma gondii</i>	454	100%	0.0	100%	KP895868.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate TG-CtPSU174 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene
Controle Positivo 2	<i>Toxoplasma gondii</i>	419	90%	2e-90	83.25%	MH793505.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate 373 PR internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene

DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foi observada a presença de DNA de *T. gondii* através de amplificação do DNA da subfamília *Toxoplasmatinae* em carnes de caça na cidade de Coari – AM. A presença do DNA do patógeno mostram algumas possibilidades como: animais infectados pelo protozoário e/ou animais que poderiam ser reservatórios. Com isso, o hábito de consumir carnes possivelmente contaminadas pode ser um dos problemas principais para saúde pública atual (Gomes et al. 2022).

Como foram utilizados *primers* desenhados para identificar membros da subfamília *Toxoplasmatinae*, entre as amostras sequenciadas foram encontrados resultados positivos também para *Sarcocystis* spp. (tabela 2). O *T. gondii* é classificado como pertencente à família *Sarcocystidae*, este é um protozoário apicomplexo e em virtude de suas características do oocisto e do ciclo de vida, o mesmo é colocado no grupo de parasitas coccídios. O *T. gondii* é mais intimamente relacionado a outros coccídios teciduais formadores de cistos, incluindo *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. que também são patogênicos, e *Hammondia* spp., e *Frenkelia* spp., que não são patogênicos (Gajadhar 2015).

Entre as amostras sequenciadas, cinco delas foram identificadas como sendo de *Sarcocystis* spp., que como supracitado faz parte da subfamília *Toxoplasmatinae*. Dahm et al. (2020) relatam um caso de *Sarcocystis* spp. onde o quati-de-cauda-anelada (*Nasua nasua*), devido a sua proximidade com os gambás, podem se contaminar ingerindo os oocistos presentes nas fezes desses marsupiais, podendo atuar como hospedeiros intermediários da doença, assim como na toxoplasmose causada pelo *T. gondii*.

A presença de *Sarcocystis* spp. no ambiente aquático pode causar a morte de mamíferos, como em 2004 quando foi registrado um surto de mortalidade de lontras marinhas (*Enhydra lutris nereis*) no oeste dos Estados Unidos e apenas anos mais tarde Burgess et al. (2020) puderam identificar que a causa da mortalidade foi ocasionada pelas espécies *Sarcocystis neurona*.

Um estudo mais recente e também preocupante é o de Miller et al. (2023) que relatam o caso grave e incomum de toxoplasmose e esteatite em lontras marinhas infectadas com uma cepa rara de *T. gondii* não relatada anteriormente em nenhum animal aquático. Entre fevereiro de 2020 a março de 2022, quatro lontras marinhas do Sul (*Enhydra lutris nereis*) encalharam na Califórnia com esteatite grave causada por protozoário e toxoplasmose sistêmica. Todos os quatro casos analisados foram positivos para *T. gondii* via sorologia, imuno-histoquímica e

PCR. Esta informação sugere mais uma via desses agentes patogênicos, ocorrendo através de oocistos que chegam até o oceano migrando pelo escoamento de água doce e sendo concentrados em locais específicos por organismos marinhos.

Estes dados são preocupantes uma vez que em nossas amostras positivas uma delas foi de um mamífero aquático que já vem sofrendo com a caça ilegal para consumo da sua carne, o peixe-boi (*Trichechus inunguis*), que desde 2016 está listado como vulnerável na Lista Vermelha de Animais Ameaçados de Extinção (International Union for Conservation of Nature - IUCN).

Neste trabalho, as amostras positivas para *T. gondii* pertenciam a veados, pacas, antas, peixes-boi, tatu, queixada e macaco; enquanto que as amostras positivas pra *Sarcocystis* spp., pertenciam a paca, peixe-boi e veado. Entre as espécies já descritas como positivas para *T. gondii*, há animais envolvidos no ciclo assexuado do agente, como por exemplo espécies de mamíferos domésticos e silvestres, roedores, suínos (Gomes et al. 2022).

Carnes de catetos ou caititus (*Pecari tajacu*) e queixadas (*Tayassu pecari*) que estavam sendo vendidas no mercado de Iquitos (Peru), foram testadas através de metodologia sorológica para a presença de contaminação de *T. gondii*. Diferentemente do observado no nosso trabalho, apenas 8,3% das amostras estavam contaminadas com o protozoário (Iacobucci et al. 2017). No nosso estudo também foi observada presença de DNA de *T. gondii* nas carnes de queixada, o que significa prevalência de 50%. A soroprevalência de *T. gondii* em suínos de produção (*Sus scrofa domesticus*) no Brasil é de até 90%, e essa prevalência varia entre os suínos de sistemas de confinamento e os porcos silvestres. Além disso, nos últimos 50 anos já foram relatados 25 surtos, sendo que 56% ocorreram entre 2010 e 2018 (Dubey et al. 2012; Dubey 2010).

Ferreira et al. (2018) usaram como método a PCR para determinar fatores associados à contaminação de hortaliças e outras fontes por protozoários zoonóticos como: de água, solo e vegetais que foram coletadas em 21 propriedades da região de Londrina, Paraná, Brasil, onde 12,9% das amostras foram positivas para *T. gondii*. Aves silvestres e animais domésticos, como cães, gatos, cavalos e bovinos, estiveram presentes em todas as propriedades estudadas, sendo que em 23,8% delas os animais tinham acesso às roças. Animais silvestres, como cervídeos, lebres, tatus, capivaras, raposas e onça-parda estiveram presentes em 61,9% das propriedades estudadas.

A presença de *T. gondii* também foi detectada em outras localidades e diferentes tipos de amostras biológicas. Amostras de diafragma e língua de suínos de produção de pequenos e

grandes abatedouros de Erechim (RS – Brasil) foram coletadas. A positividade foi de 34% entre as amostras de diafragma e 66% entre as amostras de língua (Belfort-Neto et al. 2007).

Não só no estado do RS foram detectadas presença de contaminação de suínos de produção, no estado de São Paulo foi descrita prevalência de 17% nestes animais, o que pode indicar uma infecção aguda, recente ou reativada por *Toxoplasma gondii* (Dos santos et al. 2005).

Já no estado de Rondônia, em testes realizados em animais de produção e companhia, foram descritas prevalência de 52,4% em ovinos, 5,3% em bovinos, 37,5 % em suínos, 76,4% em cães e 87,3 % em gatos (Maia et al 2021; De Souza et al. 2016; Cavalcante et al. 2006; Canon-Franco et al. 2004). Uma teoria para toda essa contaminação seria que gatos domésticos poderiam estar contaminando áreas ao redor das residências e das áreas rurais com oocistos de *T. gondii*, levando ao aumento das taxas de infecção em animais que vivem ao redor, tanto nos animais de sistemas de produção quanto nos animais silvestres que visitam a região (Gotteland et al. 2014).

Além de animais de produção, o *T. gondii* também já foi encontrado em roedores domésticos (*Mus musculus* e *Rattus rattus*) no México. Cerca de 5% carregavam este parasita intracelular no rim (Torres et al. 2017a). Portanto, é possível que o surgimento da agricultura estabeleceu o ciclo de vida doméstico do *T. gondii*, já que reuniu camundongos e gatos em assentamentos humanos (Shwab et al. 2018). O mesmo pode estar ocorrendo na região estudada já que os animais silvestres vivem ao redor das comunidades ribeirinhas na Amazônia.

Castiglioni et al. (2021) fizeram a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* a partir de amostras sorológicas de animais silvestres de vida livre da região noroeste do estado de São Paulo, onde foram analisadas 32 amostras (oito de aves e 24 de mamíferos). Foi observada, entre os mamíferos, a soropositividade de 29,2% incluindo amostras de uma raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), dois lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), um bugio-preto (*Alouatta caraya*), dois cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) e um veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*).

Outro estudo usando o teste de aglutinação modificado (MAT Toxo), foi usado para detectar anticorpos séricos para *Leptospira* spp. e *Toxoplasma gondii* em animais silvestres em cativeiro no Parque Zoobotânico, localizado na cidade de Petrolina, Estado de Pernambuco, Brasil. As amostras foram coletadas de 12 mamíferos, 26 aves e 33 répteis. A ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* foi de 56,4%, com animais positivos das espécies: mão-pelada

(*Procyon cancrivorus*), caititu (*Tayassu tajacu*), quati (*Nasua nasua*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (Santos et al. 2021).

Uma boa forma de analisarmos a presença deste parasita nas populações silvestres, seria avaliar principalmente animais topo da cadeia alimentar, da mesma maneira como fez Nicholas et al. (2018). Neste caso os autores utilizaram raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) como espécie sentinela, já que a mesma pode fornecer informações que permitem analisar riscos ou perigos relacionados aos requisitos ecológicos das espécies que possuem o mesmo padrão de alimentação. As raposas são animais topo da cadeia trófica e são considerados carnívoros necrófagos, que se alimentam de animais mortos, assim como os tatus. No caso das raposas a técnica utilizada foi o PCR em tempo real para isolar e detectar o DNA do *T. gondii* em tecidos como coração e cérebro, onde foi observada positividade de 44% das amostras, e no nosso caso, também tivemos uma amostra de tatu que apresentou o patógeno quando sequenciado.

Segundo Silva (2007), que realizou um estudo no rio Negro, animais de caça e quelônios ainda são a preferência dos ribeirinhos, pois constituem uma quebra na monotonia alimentar em relação ao cardápio normalmente constituído por peixe. Assim como foi verificado através de entrevistas nas feiras do município de Coari, 56,8% confirmaram que ainda consomem carne de caça (Pires, 2021).

Talvez por esse motivo as populações indígenas da bacia do rio Amazonas apresentam a maior taxa de infecção conhecida em todo o mundo. Ao longo do alto rio Negro, a soroprevalência de *T. gondii* é superior a 90%, o que sugere um alto risco de transmissão congênita do *T. gondii* (Bóia et al. 2008).

Não só na Amazônia ocorre contaminação de carnes com *T. gondii*. Aspinall et al. (2002) coletaram 71 amostras de carnes que estavam sendo vendidas em lojas de varejo do Reino Unido, e detectaram a presença do DNA do patógeno em 27 das amostras. Neste caso, assim como o obtido em nosso estudo, os autores demonstraram apenas a presença de DNA de *T. gondii* em suas amostras, e não a presença de parasitas viáveis capazes de iniciar uma infecção humana.

Embora tenhamos tido 30,95% de resultados positivos para a presença do DNA de *T. gondii* nas amostras analisadas, temos que levar em consideração a atual falta de métodos padronizados de detecção e quantificação de oocistos do parasita neste tipo de amostras; e também a comparação precisa da contaminação por *T. gondii* em estudos que usualmente abrangem diferentes abordagens para purificação de oocistos, extração e amplificação de ácidos nucleicos, análise e confirmação de sequências.

O vínculo da alimentação e das doenças transmitidas por animais (zoonoses), mostra a importância da prevenção de ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (Rossi et al. 2014). As DTAs originadas nas residências, provavelmente, ocorrem como consequência de falhas nas condições de higiene e na segurança ao lidar com o alimento (Gauci; Gauci, 2005). Essas falhas nas condições de higiene nas residências podem ser evitadas através de medidas como higienização das mãos e utensílios diariamente, cuidados com temperatura de cozimento (cocção), cuidados com armazenamento dos alimentos e com a contaminação cruzada. Além de ensinamentos simples quanto às boas práticas de manipulação de alimentos, evitariam grande parte desses casos (Soragni et al. 2019).

Na região norte a grande quantidade de zoonoses, os hábitos culinários, a falta de higiene no preparo dos alimentos, representam um importante fator de risco para toxoplasmose em humanos, e nossos resultados confirmam o risco potencial da carne de caça à saúde pública.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fatores socioeconômicos podem ter um impacto significativo na exposição humana ao *T. gondii*. Os fatores que influenciam a soroprevalência em humanos incluem proximidade de hospedeiros, de reservatórios domesticados ou selvagens infectados, acesso a água potável, estilo de vida urbano x rural, tipos de alimentos consumidos, preparação e higienização correta dos alimentos.

Embora nosso estudo forneça uma visão geral em relação a presença de *T. gondii* nas carnes de caça, mais estudos serão necessários para entender melhor o papel de diferentes animais hospedeiros na transmissão desse parasito. Elucidar as pressões seletivas que moldam a trajetória evolutiva do *T. gondii* também poderão contribuir na compreensão dos principais aspectos de transmissão de patógenos zoonóticos como um todo, estabelecendo assim as bases para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de parasitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- Aspinall, T.V.; Marlee, D.; Hyde, J.E.; et al. 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought?. *International Journal for Parasitology.* 32: 1193–1199.
- Belfort-Neto, R.V.; Nussenblatt, V.; Rizzo, L.; et al. 2007. A alta prevalência de genótipos incomuns de infecção pelo *Toxoplasma* em amostras de carne de porco de Erechim, RS, Brasil. *Academia Brasileira de Ciência,* 79:111-114.
- Bóia, M.N.; Carvalho-Costa, F.A.; Sodré, F.C.; et al. 2008. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* São Paulo. 50(1):17–20.
- BVS, 2022. Biblioteca Virtual em Saúde - Ministério da saúde. Saúde Única: dia mundial das zoonoses. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/06-7-saude-unica-dia-mundial-das-zoonoses/>.
- Burgess, T.L.; Tinker, M.T.; Miller, M.A.; et al. 2020. Spatial epidemiological patterns suggest mechanisms of land-sea transmission for *Sarcocystis neurona* in a coastal marine mammal. *Sci. Rep.* 10, 1–9. doi: 10.1038/s41598-020-60254-5.
- Canon-Franco, W.A.; Bergamaschi, D.P.; Labruna, M.B.; et al. 2004. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondonia, Brazil. *Vet. Res. Commun.,* 28, pp. 113-118,
- Carme, B.; Demar, M.; Ajzenberg, D.; et al. 2009. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases.* v. 15, n. 4, p. 656–658.
- Castiglioni, L.; Aires, L.P.N.; Ferrari, V.M.; et al. 2021. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in wild free-living birds and mammals from the northwest region of São Paulo state, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 58: e176683. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras>.
- Cavalcante, G.T.; Aguiar, D.M.; Chiebao, D.; et al. 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural Western Amazon, Brazil. *J. Parasitol.* 92, pp. 863-864, 10.1645/GE-830R.1.
- Dahm, V.; Cheng, A. C.; Montagnini, K. C. P.; et al. 2020. Detecção Histopatológica de cistos de *Sarcocystis* spp. em musculatura de um quati (*Nasua nasua*) – Relato de caso. *Archives of Veterinary Science.* [S.l.], v. 25, n. 5, dec. ISSN 2317-6822. Available at: <<https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/76751/42448>>.
- De Souza, J.B.; Soares, V.E.; Maia, M.O.; et al. 2016. Spatial distribution and risk factors for *Toxoplasma gondii* seropositivity in cattle slaughtered for human consumption in Rondônia, north region, Brazil. *Vet. Parasitol.* 226, pp. 145-149, 10.1016/j.vetpar.2016.07.015.

- Dos Santos, C.B.D.A.; De Carvalho, A.C.F.B.; Ragozo, A.M.A.; et al. 2005. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo state, Brazil. *Vet Parasitol*; 131(3-4):207-11.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L.; 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11–15.
- Dubey, J.P.; Towle, A.; 1986. *Toxoplasmosis in sheep*. St. Albans: Commonwealth Institute of Parasitology.
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A.; et al. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cyst. *Clinical Microbiological Review*, v.11, n. 2, p.267-299.
- Dubey, J.P.; Graham, D.H.; De Young, R.W. et al.; 2004. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *Journal of Parasitology*, v. 90, n. 1, p. 67–71.
- Dubey, J.P.; 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2. Ed. Boca Raton: CRC Press, 313.
- Dubey, J.P.; Lago, E.G.; Gennari, S.M.; et al. 2012. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*.10:1-50.
- Ettinger, S.J.; Feeldman, E.C.; 1997. *Tratado De Medicina Interna Veterinária*. 4^a ed. São Paulo: Manole.
- Ferreira, F.P.; Caldart, E.T.; Freire, R.L.; et al., 2018. The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 27, 327–337.
- Fine, P.E.M.; Stern, J.A.; Ponnighaus, J.M.; et al. 1997. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in the Northern Malawi. *American Journal of Epidemiology*. 146:91-102.
- Frenkel, J.K.; 1990. Toxoplasmosis in human beings. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 196, n.2, p. 240-248.
- Gauci, C.; Gauci, A.A.; 2005. What does the food handler in the home know about salmonellosis and food safety? *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*. Londres, v. 125, n 3, p. 136-142, jan. <https://doi.org/10.1177/146642400512500318>.
- Gajadhar, A.; 2015. *Foodborne Parasites in the Food Supply Web - Occurrence and Control*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Pages 101-147.
- Gomes, L.G.O.; Gomes, G.O.; Fodra, J.D.; et al. 2022. Zoonoses: as doenças transmitidas por animais. *Revista Brasileira Multidisciplinar – ReBraM*. Vol. 25, n.2.
- Gotteland, C.; Gilot-Fromont, E.; Aubert, D.; et al. 2014. Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil in a rural area: Influence of cats and land use. *Vet Parasitol* 205:629–637.
- Iacobucci, E.; Fritz, H.; Pinedo-cancino, V.; et al. 2017. Genotypic identification of *Toxoplasma gondii* within bushmeat as a method to discover routes of parasite transmission into human populations and novel, potentially virulent protozoal strains.

66th WDA Annual International Conference. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México.

- IBGE 2010. Amazonas (AM) - População residente urbana. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/default.php>>.
- IBGE 2021. Amazonas (AM) – População Estimada da Cidade de Coari. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/am/coari.html>.
- IBGE 2021. IBGE Cidades – Brasil, Amazonas, Coari - Panorama. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/coari/panorama>.
- Jones, J.L.; Lopez, A.; Wilson, M et al. 2001. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 56: 296–305.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; et al. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 28 (12): 1647-9.
- Kompalic-Cristo, A.; Britto, C.; Fernandes, O.; et al. 2005. Diagnostico molecular da toxoplasmose: revisão. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v41, n.4, p.229-235.
- Langoni, H.; 2004. Zoonosis and human beings. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* V.10 (2):111.
- Mai, K.; Sharman, P.A.; Walker, R.A.; et al. 2009. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem I Oswaldo Cruz* 104, 281–289.
- Maia, M.O.; Maia, M.O.; da Silva, A.R.S.; et al. 2021. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sheep intended for human consumption in the Rondônia state, Western Brazilian Amazon. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 74, Article 101599, 10.1016/j.cimid.2020.101599
- Marín-García, P.J.; Planas, N.; Llobat, L.; et al. 2022. *Toxoplasma gondii* in Foods: Prevalence, Control, and Safety. *Foods*, 11, 2542. <https://doi.org/10.3390/foods11162542>.
- Marmontel, M.; de Souza, D.; Kendall, S.; et al. 2016. *Trichechus inunguis*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T22102A43793736. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T22102A43793736.en>. Accessed on 21 April 2023.
- Miller, M.A.; Newberry, C.A.; Sinnott, D.M.; et al. 2023. Newly detected, virulent *Toxoplasma gondii* COUG strain causing fatal steatitis and toxoplasmosis in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Frontiers. Mar. Sci.* 10:1116899. doi: 10.3389/fmars.2023.1116899
- Montoya, J.G.; Liesenfeld, O.; 2004. Toxoplasmosis. *Lancet.* 363: 1965–76.
- Moratal, S.; Dea-Ayuela, M.A.; Cardells, J.; et al. 2020. Potential Risk of Three Zoonotic Protozoa (*Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Toxoplasma gondii*) Transmission from Fish Consumption. *Foods*, 9, 1913. <https://doi.org/10.3390/foods9121913>.
- Neves, D.P.; 2005. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo, Brazil: Atheneu. 498pp.

- Nicholas, B.; Ravel, A.; Leighton, P.; et al. 2018. Foxes (*Vulpes vulpes*) as sentinels for parasitic zoonoses, *Toxoplasma gondii* and *Trichinella nativa*, in the northeastern Canadian Arctic. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. Volume 7, Issue 3, Pages 391-397, ISSN 2213-2244, <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.003>.
- Pires, F.S.; 2021. CARNE DE CAÇA: lenda ou realidade para a população amazônica? Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) - Universidade Federal do Amazonas – UFAM.
- Rosa, C.; Kasai, N.; Souza, S.L.P.; et al 2001. Comparação das técnicas de imunohistoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 68: (1) 13-17.
- Rossi, G.A.M.; Grisólio, A.P.R.; Prata, L.F.; et al. 2014. Situação da cisticercose bovina no Brasil. Semina: Ciências Agrárias, v.35, n.2, p.927-938.
- Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; et al. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. Emerg. Infect. Dis. 17, 7–15.
- Shapiro, K.; Bahia-Oliveira, L.; Dixon, B.; et al. 2019. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. Food and Waterborne Parasitology. 12 e 00049.
- Shwab, E.K.; Saraf, P.; Zhu, X.Q.; et al. 2018. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 17; 115 (29): E6956-E6963.
- Silva, A.; 2007. Comida de gente: preferências e tabus alimentares entre os ribeirinhos do Médio Rio Negro (Amazonas, Brasil). Revista de Antropologia, São Paulo, USP, V. 50 Nº 1.
- Santos, J.R.; Coelho, R.D.F.; Albino, S.G.C. et al. 2021. Occurrence of antibodies to *Leptospira* spp and *Toxoplasma gondii* in captive wild animals in the Zoobotanical Park of Petrolina, PE, Brazil. Brazilian Journal of Global Health v. 1 n. 4 (1): v. 1 n. 4 - ISSN 2763-5368.
- Soares, R.M.; Lopes, E.G.; Keid, L.B.; et al. 2011. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. Veterinary Parasitology, 175 168–172.
- Soragni, L.; Barnabe, A.S.; Mello, T.R.C.; et al. 2019. Doenças transmitidas por alimentos e participação da manipulação inadequada para sua ocorrência: uma revisão. Estação Científica (UNIFAP). Macapá, v. 9, n. 2, p. 19-31, abr./jun. DOI: 10.18468/estcien.2019v9n2.p19-31.
- Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. et al. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 30, 1217–1258.
- Torgerson, P.R.; Mastroiacovo, P.; 2013. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. Bull World Health Organ. Jul 1; 91(7): 501–508. Published online May 3.
- Torres, M.; Medina-Pinto, R.; Panti-May, A.; et al. 2017. Molecular evidence of *Toxoplasma gondii* in synanthropic rodents (*Mus musculus* and *Rattus rattus*) captured in Yucatán,

México. 66th WDA Annual International Conference. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México.

Torres-Castro, M.A.; Medina-Espinosa, D.N.; Panti-May, J.A.; Hernández-Betancourt, S.F.; et al. 2016. First molecular evidence of *Toxoplasma gondii* in synanthropic rodents (*Mus musculus* and *Rattus rattus*) captured in Yucatan, Mexico. *Revue Méd. Vét.* 167, 9-10, 250-255.

Urquhart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L.; et al. 1996. *Parasitologia Veterinária*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

WHO, 2015. Toxoplasmosis. Fact sheet. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization. ISBN 978 92 4 156516 5.

CONCLUSÃO

Através da extração de DNA das 168 amostras, conseguimos estimar a quantidade de animais e as diferentes famílias de mamíferos em que foram encontrados DNA de *M. leprae* e da subfamília Toxoplasmatinae (*T. gondii*). Essas espécies foram: anta (*Tapirus terrestris*), boto (*Inia geoffrensis*), caititu (*Pecari tacaju*), capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cutia (*Dasyprocta fuliginosa*), macaco, paca (*Cuniculus paca*), peixe-boi (*Trichechus inunguis*), queixada (*Tayassu pecari*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), tatu (*Dasypus novemcintus*) e veado (*Mazama spp.*).

Por meio da biologia molecular foram analisadas e comprovadas amostras de carne de caça com a presença de DNA do *Mycobacterium leprae*, causador da hanseníase. E tivemos resultados significativos das 168 amostras, 131 (77,98%) contataram a presença de DNA. Destas selecionamos 17 amostras para serem sequenciadas, uma vez que o sequenciamento serviu para confirmar se o fragmento de DNA amplificado pertencia a espécie de *M. leprae*. Mas apenas cinco das amostras selecionadas foram utilizadas para análise no BLAST e estas cinco amostras confirmaram com a sequência de referência do GeneBank MF975706.1 (*Mycobacterium leprae* clone m787-17 RLEP repeat region).

Para o *Toxoplasma gondii* causador da toxoplasmose foi feito o mesmo processo acima citado. Porém para achar a presença de DNA de *T. gondii* usamos *primers* da subfamília Toxoplasmatinae. Das 168 amostras que foram amplificadas via *nested* PCR 58 (36,21%) das amostras mostraram a presença de DNA. Destas 21 foram selecionadas para sequenciamento, essas amostras foram sequenciadas para confirmar o fragmento amplificado, e 16 apresentaram demonstraram sequência de referência do GenBank para *Toxoplasma gondii*, confirmando ser DNA do agente causador da toxoplasmose, e 5 amostras tiveram maior porcentagem de identidade com a sequência de referência do GenBank para *Sarcocistys* spp.