

CAPÍTULO 3

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- *Toxoplasma gondii* EM GALINHAS CAIPIRAS

Data de submissão: 22/01/2025

Data de aceite: 05/02/2025

Letícia Ferreira Torrente

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Curso de Biomedicina. Jataí – GO
<http://lattes.cnpq.br/0982522877030614>

Natália Domann

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Curso de Biomedicina. Jataí – GO
<http://lattes.cnpq.br/8556300196030202>

Stéfanne Rodrigues Rezende Ferreira

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Curso de Biomedicina. Jataí – GO
<http://lattes.cnpq.br/8396448559063761>

Edmar Gonçalves Pereira Filho

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Curso de Biomedicina. Jataí – GO
<http://lattes.cnpq.br/8851289557895457>

Hanstter Hallison Alves Rezende

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Curso de Biomedicina. Jataí – GO
<http://lattes.cnpq.br/4982752673858886>

RESUMO: A Toxoplasmose é uma importante zoonose, seu agente etiológico é o protozoário *Toxoplasma gondii*, que pode parasitar seres humanos e outros vertebrados. As aves e os mamíferos são os hospedeiros intermediários e as galinhas caipiras possuem importância na transmissão da doença por serem reservatório do parasita. Além disso, são consideradas sentinelas para estudos por serem aves que vivem expostas ao solo, que por sua vez, pode estar contaminado. No diagnóstico, os testes de sorológico de aglutinação contribuem na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. O objetivo foi avaliar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em galinhas caipiras da região sudoeste do estado de Goiás e comparar a eficácia dos testes de aglutinação modificada (MAT) e do teste de hemaglutinação indireta (HAI). As 25 amostras de soro de galinhas caipiras foram submetidas a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, através de dois métodos sorológicos. O teste MAT foi realizado conforme descrito por Dubey e Desmonts (1980), já para determinação de anticorpos pela técnica de HAI, utilizou-se o kit comercial ToxoTest HAI WienerLab® seguindo orientações do fabricante. Para ambos os métodos foram utilizados

controles positivos e negativos para validação da reação. Diante dos resultados dos testes foi elaborada uma tabela de contingência 2x2 para a avaliação dos seguintes parâmetros: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN). Através da técnica de HAI, obteve-se 19 amostras reagentes para anticorpos anti-*T. gondii*, ou seja, 76% (19/25) sendo que a titulação de anticorpos variou de 1:32 a 1:128, já o resultado obtido pela técnica de MAT, constatou 8 amostras reagentes, equivalente a 32% (8/25) e as titulações variaram de 1:20 a 1:160. Os resultados dos parâmetros calculados foram respectivamente 16,67% (S), 68% (E), 11,11% (VPP), 77,27% (VPN). Foi possível concluir que a técnica HAI teve melhor desempenho na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* quando comparada com a técnica MAT e que as infecções de galinha caipira por *T. gondii* são amplamente prevalentes na região sudoeste de Goiás.

PALAVRAS-CHAVE: Diagnóstico sorológico, galinhas caipiras, *Toxoplasma gondii*.

COMPARISON OF SEROLOGICAL METHODS FOR DETECTING ANTI-*Toxoplasma gondii* ANTIBODIES IN FREE-RANGE CHICKENS

ABSTRACT: Toxoplasmosis is an important zoonosis. Its etiological agent is the protozoan *Toxoplasma gondii*, which can parasitise humans and other vertebrates. Birds and mammals are the intermediate hosts and free-range chickens are important in the transmission of the disease because they are reservoirs of the parasite. In addition, they are considered sentinels for studies because they are birds that live exposed to the soil, which in turn may be contaminated. In diagnosis, serological agglutination tests help detect IgG anti-*T. gondii* antibodies. The aim was to assess the presence of anti-*T. gondii* antibodies in free-range chickens from the south-western region of the state of Goiás and to compare the effectiveness of the modified agglutination test (MAT) and the indirect haemagglutination test (HAI). The 25 serum samples from free-range chickens were tested for anti-*T. gondii* antibodies using two serological methods. The MAT test was carried out as described by Dubey and Desmorts (1980). For the determination of antibodies using the HAI technique, the commercial ToxoTest HAI WienerLab® kit was used, following the manufacturer's guidelines. Positive and negative controls were used for both methods to validate the reaction. Based on the test results, a 2x2 contingency table was drawn up to assess the following parameters: sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). Using the HAI technique, 19 samples were found to be reactive for anti-*T. gondii* antibodies, i.e. 76% (19/25), with antibody titres ranging from 1:32 to 1:128, while the result obtained using the MAT technique showed 8 reactive samples, equivalent to 32% (8/25), with titres ranging from 1:20 to 1:160. The results of the calculated parameters were 16.67% (S), 68% (E), 11.11% (PPV) and 77.27% (NPV) respectively. It was possible to conclude that the HAI technique performed better in detecting anti-*T. gondii* antibodies when compared to the MAT technique and that *T. gondii* infections in free-range chickens are widely prevalent in the south-western region of Goiás.

KEYWORDS: Serological diagnosis, free-range chickens, *Toxoplasma gondii*.

INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose é uma importante zoonose, seu agente etiológico é o protozoário *Toxoplasma gondii*, um parasito intracelular obrigatório que pode parasitar seres humanos e outros vertebrados, sendo um protozoário de importância médica, veterinária e de saúde pública (BARBOSA, HOLANDA, ANDRADE-NETO, 2009; FERNANDES et al., 2019).

Os animais de sangue quente podem ser hospedeiros intermediários para esse parasito, no entanto, o ciclo só é completado em membros da família *Felidae*, como os gatos, que são considerados hospedeiros definitivos e são fundamentais para o ciclo desse coccídeo. Aves e mamíferos são os hospedeiros intermediários e as galinhas, principalmente aquelas criadas em vida livre, conhecidas como galinhas caipiras possuem maior importância epidemiológica nas infecções por *T. gondii* no ambiente rural quando comparadas aos roedores, devido a sua resistência clínica e por terem mais tempo de vida. Além disso, são consideradas sentinelas para estudos por serem aves que vivem expostas ao solo, que por sua vez, pode estar contaminado com oocistos esporulados (DUBEY, 2008).

A transmissão do parasito ocorre pela ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos, ingestão accidental de oocistos presentes na água, via placenta, entre outros meios (SIBLEY et al., 2009). A patogenia está relacionada com o modo de infecção, susceptibilidade imunológica do indivíduo infectado e a cepa do protozoário. Com relação aos sintomas, geralmente é assintomática e os sinais clínicos podem aparecer em pacientes imunocomprometidos sendo a forma ocular a mais frequente (SANTOS, 2012; MURAT et al., 2013).

O estágio da toxoplasmose irá variar de acordo com a forma evolutiva do *T. gondii*, sabe-se que na fase aguda da infecção, encontram-se os taquizoítos, já na fase crônica e em infecções assintomáticas encontram-se os bradizoítos, que são caracterizados por possuir uma multiplicação lenta. Existem também os oocistos, estes representam a forma evolutiva eliminada nas fezes dos hospedeiros definitivos (ACHA & SZYFRES, 1987; SILVA, 2016).

São escassos os estudos comparando resultados sorológicos por diferentes testes para a detecção de anticorpos contra *T. gondii* em galinhas caipiras, e a avaliação da precisão de diferentes métodos geralmente se dá, através da comparação de seus resultados com aqueles de bioensaios em gatos ou camundongos, ou outros testes sorológicos de alta sensibilidade e especificidade esperadas (FERNANDES et al., 2019).

Dentre os diversos métodos sorológicos disponíveis, estão incluídos a reação de SabinFeldman ou teste do corante, reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação em látex, ensaio imunoenzimático (ELISA), reação de aglutinação por imunoabsorção (ISAGA) e os testes utilizados no trabalho que são hemaglutinação indireta (HAI) e o teste de aglutinação modificada (MAT), ambos apresentam alta sensibilidade e

simplicidade de execução (DUBEY, 2010).

Os testes de aglutinação contribuem consideravelmente na detecção de anticorpos IgG anti- *T. gondii* em humanos e também animais, o MAT tem demonstrado alta sensibilidade em várias espécies de hospedeiros, além de ser uma técnica que não necessita de equipamentos especiais ou reagentes espécie-específicos, o seu antígeno permanece estável por meses, no entanto o custo do kit é maior. O HAI, por sua vez, é adequado para levantamento epidemiológico, sua execução é mais simples, com velocidade de resultados mais rápida que o MAT e possui baixo custo. Porém, a detecção de anticorpos é considerada tardia, sendo assim, as infecções agudas podem não ser identificadas por este teste (DUBEY, 2010; BELTRAME et al., 2012).

Levando em consideração que um dos maiores fatores de contaminação humana se dá pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos, é de grande relevância determinar a presença de parasitos teciduais em galinhas, assim como o seu risco de infecção para os seres humanos. Portanto, o trabalho teve como objetivo avaliar a presença de anticorpos anti- *T. gondii* em galinhas caipiras da região sudoeste do estado de Goiás e comparar a eficácia dos testes de MAT e HAI.

METODOLOGIA

Amostras das Galinhas: O trabalho desenvolvido foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA-Jataí), 010/2019. Visto que foi co-orientado pela Natália Domann, mestrandra do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Federal de Jataí, as amostras utilizadas foram oriundas do seu projeto *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras da região sudoeste de Goiás: soroprevalência, caracterização biológica e detecção molecular. Foram utilizadas, um total de 25 amostras de soro de galinhas caipiras, essas por sua vez, foram submetidas a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, por meio das técnicas de MAT e HAI.

Teste de Aglutinação Modificada (MAT): Os soros das galinhas foram submetidos a pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii* segundo Desmonts e Remington (1980). Os soros foram testados puro e a diluição de 1:20, e as amostras positivas passaram por diluição seriada até 1:640. Para o procedimento foi utilizado microplacas com 96 poços de fundo chato (Corning®). Consideradas reagentes as diluições que formaram uma película ou malha em pelo menos 50% do fundo da cavidade da microplaca e não reagentes as diluições que formarem um botão compacto ou ocupando até 50% do fundo da cavidade. Em todas as microplacas foram testados soros controle positivo e negativo para auxílio à interpretação dos resultados.

Teste de Hemaglutinação Indireta (HAI): Foi realizado o teste HAI sem 2-mercaptopetanol (2-ME) com o ToxoTest HAI WienerLab®, seguindo as orientações do fabricante. Foram considerados reativos na presença de uma película ou manto cobrindo

50% ou mais do fundo das cavidades e não reativos na presença de um sedimento em forma de botão ou pequeno anel de bordas regulares. Os soros foram testados inicialmente a 1:32 e quando positivos, realizou-se diluições seriadas até 1:1024, para determinação da titulação de anticorpos.

Análise estatística: Diante dos resultados dos testes foi elaborada uma tabela de contingência 2x2 (Tabela 1) para a avaliação dos testes anteriormente mencionados e os seguintes parâmetros: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN).

Teste		HAI		Total
		Positivo	Negativo	
MAT	Positivo	7	1	8
	Negativo	12	5	17
Total		19	6	50

Tabela 1: Resultados obtidos nos testes HAI e MAT e seus respectivos diagnósticos

De acordo com PEREIRA (1995), sensibilidade é a capacidade que o teste diagnóstico apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, especificidade a capacidade que o teste diagnóstico tem de detectar os verdadeiros negativos, valor preditivo positivo (VPP) é a proporção de doentes entre os positivos pelo teste e por fim, valor preditivo negativo (VPN) é a proporção de sadios entre os negativos ao teste. Os determinados cálculos foram realizados e gráficos foram plotados no programa Excel 2016®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise das 25 amostras através da técnica de HAI, 19 amostras reagentes para anticorpos anti-*T. gondii*, ou seja, 76% (19/25) sendo que a titulação de anticorpos variou de 1:32 a 1:128 (Gráfico 1). Já o resultado obtido pela técnica de MAT, constatou 8 amostras reagentes, equivalente a 32% (8/25) e as titulações variaram de 1:20 a 1:160 (Gráfico 2).

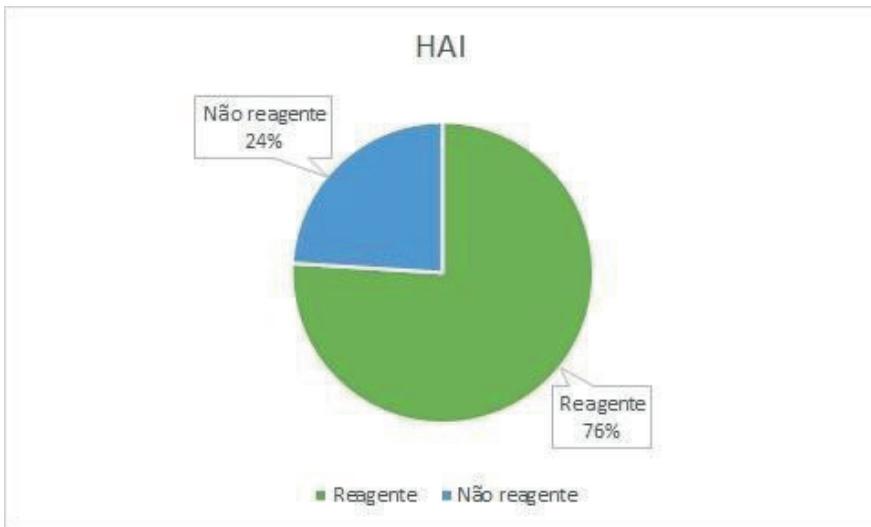


Gráfico 1: Resultado sorológico em porcentagem do teste HAI

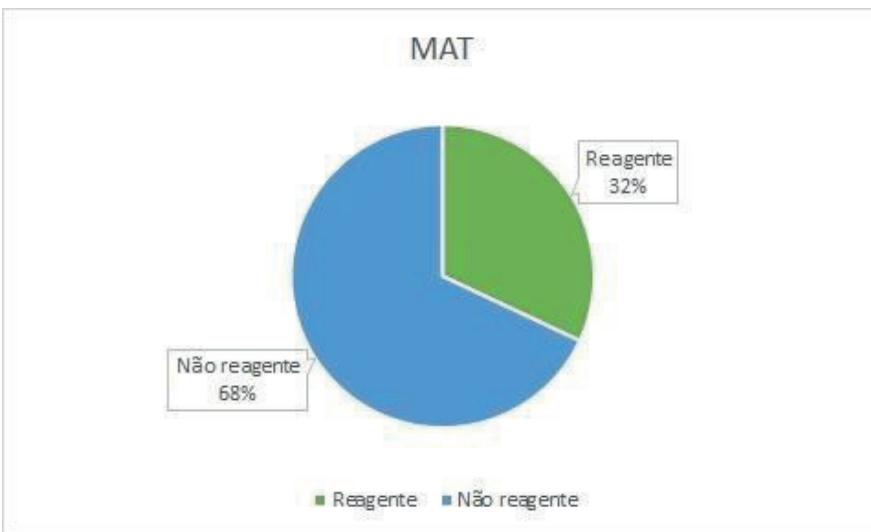


Gráfico 2: Resultado sorológico em porcentagem do teste MAT

Conforme demonstrado no gráfico abaixo os resultados dos parâmetros foram sensibilidade (S) 16,67%, especificidade (E) 68%, valor preditivo positivo (VPP) 11,11%, valor preditivo negativo (VPN) 77,27%.

Autores como Barcelos et al. (1997) em seu estudo avaliando o teste de hemaglutinação para toxoplasmose em aves domésticas do município de Santa Maria/RS e Araújo et al. (1989) no estudo de prevalência de anticorpos toxoplasmicos em frangos abatidos para consumo humano em Porto Alegre/RS, também utilizaram a técnica de HAI como padrão ouro em seus respectivos estudos.

Com relação a importância de estudos que avaliam prevalência, são de importância especialmente para saúde pública. Afinal, existem consequências graves dessa infecção, como lesões neurológicas e oftálmicas naqueles que são expostos durante a vida intrauterina e o crescente acometimento de pacientes imunocomprometidos. De acordo com Luiz e Zanna (2017), nestes hospedeiros imunocompetentes, a infecção é reativada em estados mais severos da doença, como a Toxoplasmose cerebral.

Levando em consideração que a prevalência da infecção em galinhas caipiras é um bom indicador da presença deste parasito no ambiente e no grupo estudado, foi identificada uma elevada taxa de contaminação, esse estudo demonstra que existe um risco para saúde humana pela transmissão através dessa espécie de reservatório.

CONCLUSÃO

Visto que foram utilizadas as mesmas amostras para a realização dos dois testes, diante dos resultados é possível concluir que a técnica HAI teve melhor desempenho na detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, quando comparada com a técnica MAT. Por fim, o presente estudo revelou que as infecções de galinha caipira por *T. gondii* são amplamente prevalentes na região sudeste de Goiás. Diante disto e da grande relevância na saúde pública, é fundamental o diagnóstico para a comprovação da presença do parasito em galinhas caipiras, pois o consumo de carnes de frango que não possuem vistoria técnica pela vigilância é preocupante e afeta os consumidores finais.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N., SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**, Scientific Publication, n. 503. Pan American Health Organization/ World Health Organization, Washington-EUA, 1987, 963 p.
- ARAÚJO, F. A. P., ET AL., **Prevalência de anticorpos toxoplasmicos em frangos abatidos para consumo humano em Porto Alegre/RS**. Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, v. 17, p. 23-28, 1989.
- BARBOSA, I. R.; HOLANDA, C. M. C. X.; ANDRADE-NETO, V. F. **Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern, Brazil**. Transations of Royal Society of Medicine and Hygiene, v. 103, n.4, p. 377-382, 2009.
- BARCELOS, A. S. et al. **Hemaglutinação para toxoplasmose em aves domésticas do município de Santa Maria/RS**. IN: IV Jornada Integrada de Pesquisa, Extensão e Ensino da Universidade Federal de Santa Maria-RS. Anais, Santa Maria-RS, 1997, p 564.
- BELTRAME, M.A.V. et al. **Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil**. Veterinary Parasitology, v.188, p.225– 230, 2012.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J. **Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity.** Journal of Clinical Microbiology, USA, v. 11, n. 6, p. 562-568, 1980.

DUBEY, J. P. **The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years.** The Journal of eukaryotic microbiology, v. 55, n°. 6, p. 467–75, 2008.

DUBEY, J.P. et al. **New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings.** Journal of Parasitology, v.96, p.709-712, 2010.

FERNANDES S, BRILHANTE-SIMÓES P, COUTINHO T, CARDOSO L, DUBEY JP, LOPES AP. **Comparison of indirect and modified agglutination tests for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic cats.** J Vet Diagn Invest. 2019 Sep;31(5):774-777.

LUIZ, R.; ZANNA, D. **Estudo da resposta imune celular e humoral desencadeada por *Toxoplasma gondii* em camundongos A / Sn imunossuprimidos.** 2017.

MURAT, J.-B.; HIDALGO, H. F.; BRENIER-PINCHART, M.-P.; PELLOUX, H. **Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations?** Expert review of anti-infective therapy, v. 11, n°. 09, p. 943–56, set, 2013.

PEREIRA, MG. **Epidemiologia: Teoria e Prática.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1995.

SANTOS, L. S. S., **Avaliação soroepidemiológica de *Toxoplasma gondii* em Humanos e sua relação com o convívio com Gatos (*Felis catus*) Como Animal de Estimação,** 59f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of

SILVA, Patricia Vieira da. **Caracterização soroepidemiológica da infecção por *Toxoplasma gondii* em catadores de materiais recicláveis, Campo Grande, MS.** 2016. Dissertação de Mestrado.

SILVA, Samara dos Santos et al. **Estudo epidemiológico das infecções por *Toxoplasma gondii* em ovinos abatidos na Paraíba.** 2020. Dissertação pós-graduação Universidade Federal de Campina Grande.