

# ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Toxoplasma gondii* EM GATOS NA CIDADE DE BELÉM DO PARÁ, BRASIL<sup>1</sup>

André Marcelo Conceição MENESES<sup>2</sup>

Karla Albuquerque NEGRÃO<sup>3</sup>

Camila Franco MIRANDA<sup>3</sup>

Renata Kelly Gonzaga BASTOS<sup>4</sup>

Nazaré Fonseca de SOUZA<sup>5</sup>

Rosely Bianca dos Santos KURODA<sup>6</sup>

Carla Cristina Guimarães de MORAES<sup>7</sup>

Raimundo Nonato Moraes BENIGNO<sup>8</sup>

**RESUMO:** A toxoplasmose é uma protozoose com alto potencial zoonótico que possuem os felídeos, principalmente os gatos, como hospedeiros definitivos capazes de eliminar, em suas fezes, milhões de oocistos do *Toxoplasma gondii*. Estes oocistos sobrevivem em torno de um ano no meio externo em ambiente favorável. O objetivo deste estudo é avaliar a presença de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii* em 32 amostras de soro obtidas de gatos domésticos procedentes da região Metropolitana de Belém do Pará. Os proprietários participantes responderam a um questionário epizootiológico referente à toxoplasmose felina. Todas as amostras foram testadas por um ensaio imunoenzimático indireto em fase sólida, através do kit *ImmunoComb® II Toxo IgG*. Após a sorologia, os resultados foram analisados e associados ao levantamento epizootiológico. Na pesquisa sorológica, obteve-se 100% de negatividade nas amostras. No levantamento epizootiológico, observou-se que dos 32 animais, 11 (34,37%) eram domiciliados, nove (28,12%) de vida livre e 12 semidomiciliados, sendo quatro (12,5%) de hábito diurno e oito (25%) de hábito noturno. Quanto à alimentação, 11 (34,37%) consumiam somente ração, oito (25%) ração e carne crua, seis (18,75%) ração associada à comida caseira e sete (21,87%) comida caseira e carne crua. Os resultados obtidos permitem concluir que, a população felina analisada, provavelmente devido ao sistema de criação e hábito alimentar, não foi exposta ao protozoário *T. gondii*.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Anticorpos IgG, Gato doméstico, Toxoplasmose, Diagnóstico, Belém do Pará.

<sup>1</sup> Aprovado em 28.08.09 para publicação.

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Dr., Professor Adjunto da UFRA/ISPA. E-mail: andre.meneses@ufpa.edu.br.

<sup>3</sup> Médica Veterinária, Residente, HOVET/UFRA.

<sup>4</sup> Médica Veterinária, Autônoma, Belém (PA).

<sup>5</sup> Médica Veterinária, Dra., Professora Associada da UFRA/ISPA.

<sup>6</sup> Médica Veterinária, M.Sc., FMVZ/USP.

<sup>7</sup> Médica Veterinária, Dra., Professora Adjunta da Faculdade de Medicina Veterinária, UFPA, Campus Castanhal.

<sup>8</sup> Médico Veterinário, M.Sc., Professor Associado da UFRA/ISP.

## AN INDIRECT IMMUNOENZYMATIC REHEARSAL FOR *Toxoplasma gondii* IgG ANTIBODIES DETECTION IN CATS OF THE BELÉM CITY, PARÁ STATE, BRAZIL

**ABSTRACT:** Toxoplasmosis is a high potential zoonotic protozoan disease of felids., Cats act as definitive hosts that can eliminate, in their feces, million of *Toxoplasma gondii* oocysts. These oocysts survive for approximately one year outside the organism in warm and humid soil (37°C). The objective of this study was to evaluate the presence of *Toxoplasma gondii*-specific IgG antibodies in 32 serum samples obtained from domestic cats coming from the Metropolitan area of Belém, Pará State, Brazil. The animals' private owners answered to an epizootiological questionnaire regarding feline toxoplasmosis. All the samples were tested for *T. gondii*-specific IgG antibodies utilizing an indirect solid-phase enzyme immunoassay, the ImmunoComb® II Toxo IgG kit. After the laboratory test, the results were analyzed and associated to the epizootiological survey. In the serological survey, 100% of the samples were negative. In the epizootiological survey, it was observed that, from the 32 animals, 11 (34.37%) were domiciled, 9 (28.12%) were free-ranging and 12 semi-domiciled, where 4 (12.5%) presented diurnal habits and 8 (25%) nocturnal habits. As for the feeding, 11 (34.37%) consumed only commercial food, 8 (25%) commercial food and raw meat, 6 (18.75%) associated commercial and home-made food and 7 (21.87%) home-made food and raw meat. Therefore, it can be concluded that the analyzed feline population had no contact with the protozoan *T. gondii*.

**INDEX TERMS:** IgG Antibody, Domestic Cat, Toxoplasmosis, Diagnosis, Belém/Pará-Brazil.

### 1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma protozoonose causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* do filo Apicomplexa (Coccidiorida: Toxoplasmatidae), com relatos de surtos em todo o mundo. Observa-se uma maior prevalência em regiões tropicais ou subtropicais de clima úmido, pois estas condições favorecem a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente. Os vários níveis de higiene e os hábitos alimentares da população têm, claramente, um papel importante na disseminação da toxoplasmose (BRASIL, 2005).

O índice de infecção, certamente, é mais alto em comunidades onde os gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) são abundantes e defecam próximo ou dentro das moradias. Porém, em áreas onde não prevalecem os felídeos domésticos e sim os silvestres, como

o 'jaguarundi' (*Herpailurus yaguarondi*), 'jaguar' (*Panthera onça*) e 'ocelote' (*Leopardus pardalis* ou *Felis pardalis*), também é alta a prevalência de anticorpos nos habitantes. Igualmente é elevado o índice de infecção toxoplásmica, em que os hábitos alimentares incluem o consumo de carne crua ou mal cozida. E como consequência desse efeito, no Brasil, concentra-se maior número de casos de toxoplasmoses nos estados do Pará, Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul, e em menor grau na Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso (BRASIL, 2005).

De fato, no Brasil 50,0% a 83,0% da população humana adulta são de soropositivos para *T. gondii*, variando de acordo com a localização regional (ORÉFICE; BAHIA-OLIVEIRA, 2005).

De acordo com Dubey e Frenkel (1973), e Dubey (1996), a resposta imunológica do

hospedeiro é diretamente proporcional à virulência, patogenicidade, forma infectante, cepa do parasito e a susceptibilidade do hospedeiro. Derouin (1992) acrescenta que os níveis de produção de anticorpos no organismo estão associados ao estado imunológico do hospedeiro e à rota de infecção do parasita.

A principal fonte de infecção toxoplásmica constitui-se por felídeos jovens, tanto domésticos quanto silvestres. Deste modo, a toxoplasmose pode ser adquirida pelo homem e pelos animais (carnívoros e onívoros) após o nascimento, principalmente, pelo consumo de carne suína, ovina e bovina, ou seus derivados contendo cistos do *T. gondii* nas fibras musculares. Pode ser adquirida também por meio da ingestão de oocistos esporulados presentes em hortaliças, frutas, leite não pasteurizado de cabras, ovos e água; assim como pelas mãos que mantêm contato com o solo, areia, latas de lixo, quintais e jardins, onde, certamente, os felídeos jovens defecaram (SOUZA et al., 1987; NAVARO et al., 1992).

Os felídeos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii* e apresentam as três formas infectantes deste parasito: taquizoíto, bradizoíto e esporozoíto, enquanto que os demais animais (mamíferos e aves) são hospedeiros intermediários, apresentando somente as formas de taquizoíto e bradizoíto (ORÉFICE; BAHIA-OLIVEIRA, 2005). De acordo com Souza (1995), o diagnóstico da toxoplasmose pode ser realizado pela sorologia para detecção das imunoglobulinas G (IgG) e/ou M (IgM), através do ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Além deste método, pode-se diagnosticar a toxoplasmose pelo isolamento do agente causal, através da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) e do boiensaio ou ensaio biológico em camundongos (REY, 2002).

Segundo Braga Filho (2004), as implicações desta protozoonose na Saúde

Pública estão associadas ao consumo de produtos de origem animal e refletem como causa importante de morbidade e mortalidade, em face da infecção poder ser transmitida aos seres humanos de qualquer idade.

A toxoplasmose é ainda uma causa importante de alterações neonatais, como lesões oculares, microcefalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais e retardo mental (DUBEY; SCHMITZ, 1981; BRAGA FILHO, 2004).

Na Região Metropolitana da cidade de Belém, Estado do Pará, não há registros de pesquisas que comprovem a situação sorológica para *T. gondii* na população felina, diferentemente do que já ocorreu com outros grandes centros urbanos de nosso país.

Diante do exposto, torna-se de extrema importância determinar a ocorrência de anticorpos específicos anti-*T. gondii* em gatos domésticos em Belém/PA. Além de realizar estudos epidemiológicos para melhor investigação das fontes de contaminação para o homem, com o papel indispensável do Médico Veterinário, como parte dos Programas de Saúde Pública no Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Colheita e processamento do material

No presente estudo foram analisadas 32 amostras de soro obtidas de sangue colhido de gatos domésticos procedentes da região Metropolitana de Belém/PA. Oito machos (25%) e 24 fêmeas (75%), sem raça definida, com idade variando entre um e sete anos, e sem qualquer suspeita clínica.

Amostras de sangue foram colhidas no período de maio a julho de 2006. Após assepsia local com álcool iodado, foram colhidos 3 mL de sangue por venopunção jugular, em tubos tipo

*vacutainer* estéreis de 5 mL sem anticoagulante, segundo Norsworthy (2004). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 g durante 15 minutos, no laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), para obtenção do soro, que foi aliqotado em tubos tipo *Eppendorf*®. As amostras de soro, devidamente identificadas, foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento da realização do teste.

## 2.2 MÉTODO

### 2.2.1 Obtenção dos dados

Os proprietários dos felinos responderam a um questionário

epidemiológico para obtenção de dados referentes ao sistema de criação, manejo alimentar e hábitos higiênicos (dos proprietários e destes com os animais).

### 2.2.2 Teste sorológico

As 32 amostras processadas no Laboratório de Patologia Clínica da UFRA foram testadas utilizando-se o *kit* comercial *ImmunoComb*® II *Toxo IgG*, da *Orgenics*®. O princípio deste teste sorológico é a detecção de anticorpos IgG específicos anti-*Toxoplasma gondii* pelo ensaio imunoenzimático indireto em fase sólida (*indirect solid-phase enzyme immunoassay* – EIA) (Figura 1).



**Figura 1** – *kit* comercial *ImmunoComb*® II *Toxo IgG*, da *Orgenics*®. Usado para a detecção de anticorpos IgG específicos anti-*Toxoplasma gondii*, pelo ensaio imunoenzimático indireto em fase sólida (*indirect solid-phase enzyme immunoassay* – EIA).

O teste é composto por uma placa reveladora, contendo soluções reagentes e de lavagem; um pente sensibilizado com imunoglobulina humana da classe G em um ponto e com *Toxoplasma gondii* em outro ponto logo abaixo, e uma régua com escala colorimétrica para leitura. Todo o material

utilizado permaneceu à temperatura ambiente (TA), entre 22 e 26°C.

A placa reveladora foi incubada em estufa a 37°C durante 20 minutos, sob agitação para que houvesse a mistura dos reagentes. Após essa incubação, depositou-se 10  $\mu\text{L}$  de amostra na primeira fileira da

placa e inseriu-se o pente sensibilizado durante dez minutos nesta fileira para que houvesse a reação antígeno-anticorpo. Ao término deste período, o pente foi inserido durante 2 minutos na fileira seguinte para realizar a primeira lavagem. Na terceira fileira, ocorreu a ligação de conjugação e o pente ficou inserido durante 20 minutos durante esta etapa. Na quarta fileira, durante 2 minutos, foi realizada a segunda lavagem. Na etapa seguinte, ocorreu a terceira lavagem em tempo igual (2 minutos). A reação colorimétrica aconteceu na sexta fileira, onde o pente ficou inserido durante 10 minutos. Ao término deste período, o pente retornou à quinta fileira, durante 1 minuto, para que houvesse a parada da reação. Após este tempo, o pente ficou em repouso, ao ar livre para secar, naturalmente.

A leitura do teste é semiquantitativa e foi realizada visualmente, sem a necessidade de uso de aparelho leitor. O nível de IgG anti-*Toxoplasma* em cada amostra foi estimado comparando-se a intensidade de cor do ponto inferior de cada dente com a escala de cor *CombScale* fornecida com o *kit*.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 32 amostras analisadas, 100% apresentaram-se negativas para a presença de anticorpos IgG específicos anti-*Toxoplasma gondii*, pelo ensaio imunoenzimático indireto em fase sólida (EIA), utilizando-se o *kit* comercial *ImmunoComb® II Toxo IgG*, da *Organics®*.

Durante a realização do trabalho, diversos aspectos da epidemiologia foram abordados, como sistema de criação, manejo alimentar, hábitos higiênicos do proprietário e deste com os felinos.

Devido à negatividade sorológica obtida no teste laboratorial, não foi

possível o tratamento estatístico dos dados epidemiológicos coletados.

O presente estudo obteve resultado semelhante ao de Salata et al. (1985), estudo no qual 100% das amostras analisadas, na região de Botucatu, Estado de São Paulo, foram negativas para *T. gondii*. Entretanto, a soronegatividade observada nas amostras estudadas difere ao relatado em outros estudos (LARSSON; JAMRA; RIBEIRO, 1987; DUBEY et al., 1995; GARCIA et al., 1999) que em diferentes regiões, valendo-se de diferentes testes sorológicos, encontraram variações entre 19 e 68,3% de positividade para toxoplasmose.

O grupo de animais estudado que recebia alimentação comercial *ad libitum*, e que mostrou resultado negativo, pode ter como fator determinante, além da ausência de estímulos à predação, a possibilidade de não ter tido contato com o parasita durante sua vida pregressa. Além disso, a carne crua e a comida caseira que 21 (65,62%) dos gatos deste estudo recebiam têm, provavelmente, origem idônea, ou seja, de fontes livres de contaminação e mantidas em condições higiênicossanitárias adequadas, conforme relatado por Tenter, Heckerroth e Weiss (2000).

O resultado observado em Belém/PA apresentou grande diferença do relatado por Araújo et al. (2003), em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, que encontraram 25% de gatos de vida livre sororeagentes para *T. gondii* (72/287), através da técnica de hemaglutinação indireta (HI).

Outro ponto determinante, e que deve ser levado em consideração, é o número de animais estudado. Provavelmente, se o número for aumentado, a probabilidade de encontrar animais soropositivos aumentará e, então, poderá retratar a real situação local.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que, provavelmente, em função do hábito alimentar e do modo de criação dos animais, os felinos domésticos deste estudo não foram expostos ao *Toxoplasma gondii*. Visto que não foi observada a presença de anticorpos específicos anti-*T. gondii* nestes animais.

Contudo, há necessidade de serem realizados estudos adicionais, mais aprofundados e com um número maior de animais para que a prevalência da infecção por *T. gondii* na espécie felina no município de Belém/PA seja determinada.

#### REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F.A.P.; SILVA, N.R.S.; OLICHESKI, A.T.; BECK, C.; RODRIGUES, R.J.D.; FIALHO, C.G. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de gatos internados no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, detectados através da técnica de hemaglutinação indireta. *Acta Scientiae Veterinária*, Porto Alegre, v.31, n.2, p.89-92, 2003.

BRAGA FILHO, E. *Diagnóstico sorológico de Toxoplasma gondii em ovinos criados em dois municípios do Estado do Pará e considerações relativas à saúde animal e humano*. 2004. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará/ Centro Agropecuário / Museu Paraense Emílio Goeldi / EMBRAPA, Belém, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Toxoplasmose*. Net. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <<http://www.ipecc.fiocruz.br/pepes/toxo/link7.html>>. Acesso em: fev. 2007.

DEROUIN, F. Pathogeny and immunological control of toxoplasmosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v.25, p. 1163-1169, 1992.

DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Veterinary Parasitological*, Amsterdam, v. 64, p.65-70, 1996.

\_\_\_\_\_; FRENKEL, J.K. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v.59, p.505-512, 1973.

\_\_\_\_\_; SCHMITZ, J.A. Abortion associated with toxoplasmosis in Oregon. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.178, n. 7, p. 675-678, 1981.

\_\_\_\_\_; WEIGEL R.M.; SIEGEL A.M.; THULLIEZ P.; KITRON U.D.; MITCHELL M.A.; MANNELLI A.; MATEUS-PINILLA N.E.; SHEN S. K.; KWOK O.C.H.; TODD K.S. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *Journal of Parasitology*, n.81, p.723-729, 1995.

GARCIA, J.L. ; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C.; GARCIA, S.M.F.; LEITE, J. Seroepidemiology of toxoplasmosis and ocular evaluation by Amsler Grid in patients from the rural area treated at the Jaguapitã county health center, Paraná State, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, v.32, n.6, p.671-676, nov./dez. 1999.

LARSSON C.E.; JAMRA L.M.F.; RIBEIRO M.F. Prevalência de toxoplasmose felina determinada pela reação de Sabin Feldman, em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOONOSE, 1., 1987, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro, 1987. p.70-71.

NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii*: isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, Pr. *Semina*, v.13, p.15-18, 1992.

ORÉFICE F.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. Toxoplasmose. In: ORÉFICE, F. *Uveíte clínica e cirúrgica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2005. v.2 p.699-703.

REY, L. *Parasitologia*. 2.ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 718.

SALATA, E.; YOSHIDA, E. L. A.; PEREIRA, E. A.; CORRÊA, F. M. A. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.27, n.3, p.20-22, 1985.

SOUZA, W.J.S. Toxoplasmose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 14., 1995, Goiânia. *Anais...* Goiânia, 1995.

\_\_\_\_\_; COUTINHO, S. G.; LOPES, C. W. G.; SANTOS, C. S.; NEVES, N. M.; CRUZ, A. M.. Epidemiological aspects of toxoplasmosis in schoolchildren residing in localities with urbano rural characteristics within the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz*, v. 82, n.4, p.475-482, 1987.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.