



COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* EM SOROS DE SUÍNOS*

COMPARISON BETWEEN INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE AND INDIRECT HAEMAGGLUTINATION TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST *Toxoplasma gondii* IN SWINE SERA

Cristina Germani Fialho¹ & Flávio Antônio Pacheco de Araújo²

RESUMO

A importância da toxoplasmose suína está relacionada as perdas reprodutivas e as implicações em saúde pública, uma vez que estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de cistos em carne crua ou mal cozida é uma importante fonte de infecção de *Toxoplasma gondii* para a população humana. O presente artigo objetivou comparar os resultados obtidos através das técnicas de Imunofluorescência indireta (IFI) e Hemaglutinação indireta (HAI) na detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de suínos. Foram colhidas 240 amostras de sangue destes animais em frigoríficos da região da Grande Porto Alegre, por ocasião da sangria. Após coagulado, o soro foi separado e congelado a - 20°C, para posterior análise sorológica. As amostras foram analisadas no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN-RS). Os resultados foram submetidos a análise estatística. Para verificar o grau de relacionamento entre as duas técnicas foi calculado a porcentagem de concordância total que foi de 78,7%, sendo a co-positividade 48,1% e a co-negatividade 94,3%. A estatística Kappa foi utilizada para medir o grau de concordância real entre as duas técnicas, sendo que seu valor calculado foi 0,46. Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que, para diagnóstico da toxoplasmose suína, a IFI é superior a HAI e que esta reação tem sua principal indicação em inquéritos soroepidemiológicos da toxoplasmose na espécie suína.

Descritores: *Toxoplasma gondii*, suínos, sorologia, imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI).

ABSTRACT

The importance of the swine toxoplasmosis is related to the reproductive losses and its implications in public health, since epidemic studies suggest that ingestion of cysts in the raw meat or badly cooked is an important source of infection of *Toxoplasma gondii* for human populations. The aim of this paper was to compare the data quantified by indirect immunofluorescence technique (IFAT) and indirect hemagglutination (IHT) for detection antibodies against *Toxoplasma gondii* in swine sera. Samples of 240 swines sera were collected in abattoirs from the area of Great Porto Alegre. After having coagulated, the sera were separated and frozen at -20°C for subsequent analysis. The samples were analyzed at the Veterinary Protozoology Laboratory of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and in Central Laboratory of Rio Grande do Sul State (LACEN-RS). The results were submitted to the statistical analysis. In order to verify the relationship among the two techniques it was calculated the percentage of total agreement that was 78.7%, being the percentage agreement of positives results was 48.1%, while the percentage agreement of negative results was 94.3%. The Kappa's statistic was used for quantifying the real degree of agreement among the two techniques, and the calculated value was 0.46. The results found in this paper demonstrated that, for diagnosis swine toxoplasmosis, IFAT is better than IHT and is the main indication in seroepidemiological studies of swine toxoplasmosis.

Key words: *Toxoplasma gondii*, swine, serology, indirect immunofluorescence technique (IFAT), indirect hemagglutination technique (IHT).

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose suína foi diagnosticada pela primeira vez no mundo, nos Estados Unidos, por Farrel et al. [10] em 1952 e, no Brasil (Minas Gerais), por Silva [19] em 1959.

Os suínos adquirem a toxoplasmose pela ingestão de água e ração contaminadas com oocistos presentes nas fezes de felinos, cistos de roedores, carnes ou restos infectados, ou por infecção transplacentária [13,15,24]. As fêmeas suínas que adquirem a infecção durante a gestação podem apresentar aborto, maceração ou mumificação dos fetos [23]. Pode haver, ainda, o nascimento de leitões com comprometimento pulmonar, nervoso e até mortes em poucas horas [12].

Para a população humana, a transmissão do *Toxoplasma gondii* está relacionada com o consumo de carne mal cozida contaminada com cistos deste parasito, assim como, com o contato com fezes de felídeos [16]. Ocorre ainda, a transmissão congênita transplacentária, com possibilidade de danos fetais, mas apenas se uma mulher soronegativa adquire a primeira infecção durante a gravidez [5].

Os estudos de levantamento da toxoplasmose na espécie suína servem para avaliar, além da ocorrência desta infecção, o risco a que estão expostos os humanos que ingerem carne em determinada região. Diversas provas imunológicas têm sido utilizadas na avaliação da infecção toxoplásmica, destacando-se as reações de hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI) [8].

O objetivo do trabalho foi comparar, através de análises estatísticas dos resultados obtidos, as técnicas diagnósticas de IFI e HAI.

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra desta pesquisa foi escolhida de acordo com Thrusfield [22], para uma expectativa de prevalência de 20%, com uma precisão absoluta de 5%, com um nível de confiança de 95%, totalizando 240 suínos criados e abatidos na região da Grande Porto Alegre, divididos em 2 grupos de 120 machos e 120 fêmeas.

As coletas de sangue e os exames foram efetuados durante o período de novembro de 2000 a julho de 2001. O processo de coleta de sangue foi realizado por ocasião da sangria, em abatedouros. Após

coagulado, o soro foi separado, e congelado à -20°C, para posterior análise sorológica. Os exames foram realizados no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (Lacen-RS).

Os resultados foram submetidos à análise estatística. O teste exato de Fischer¹, foi utilizado nas análises comparativas. O teste de McNemar¹ foi utilizado nos estudos pareados. A porcentagem de Concordância foi calculada de acordo com Coutinho et al. [7] e Araújo [1], para verificar o relacionamento entre as duas técnicas (imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta). A estatística Kappa [21], foi utilizada para medir o grau de concordância real entre as duas técnicas.

A técnica de HAI foi realizada utilizando-se o Kit HAP-Toxoplasmose², e a técnica de Imunofluorescência foi de acordo com Camargo [4], com as alterações feitas por Araújo [1], para uso na espécie suína. O antígeno utilizado para a imunofluorescência constituiu-se de taquizoítos íntegros de *T. gondii*, cepa congênita (isolada de um caso humano). Estes taquizoítos foram obtidos de exsudatos peritoniais de camundongos mortos no terceiro dia de infecção [1]. O conjugado utilizado foi o anti-Pig IgG (Sigma^{®3}).

RESULTADOS

Comparação entre as técnicas de HAI e IFI

A Figura 1 representa, em números absolutos, os resultados obtidos através das técnicas de HAI e IFI para a pesquisa de anticorpos da classe IgG em 240 soros de suínos. O Teste Exato de Fisher aplicado aos dados desta figura demonstrou haver diferença significativa entre os dois testes ($p = 0,0009$).

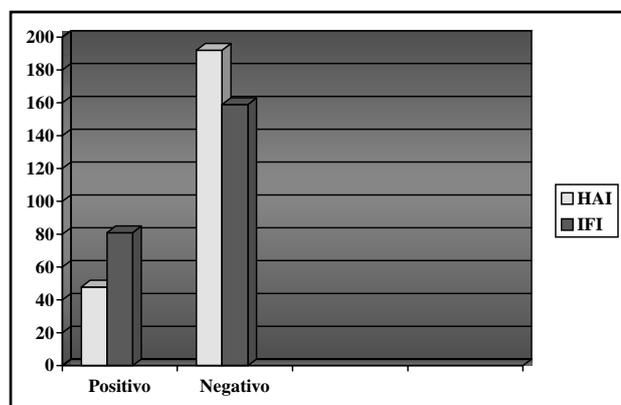


Figura 1. Comparação entre as técnicas de HAI e IFI para o diagnóstico da toxoplasmose em 240 suínos.

A Tabela 1 apresenta os resultados detectados pela HAI e IFI nos 240 soros de suínos agrupados de acordo com a concordância dos resultados.

Segundo os dados da Tabela 1 a percentagem de concordância de resultados positivos nas duas técnicas foi de 48,1% (a/a + b) e a percentagem de concordância de resultados negativos foi de 94,3% (d/ c+d), perfazendo uma percentagem de concordância total de 78,7% (a+d/a+b+c+d). Do total de soros testados, 90 (37,5%) (a+b+c) foram positivos em ambos os testes ou, ao menos em um dos testes, enquanto 159 (66,25%) foram negativos no IFI e 192 soros (80%) negativos na HAI.

O Teste de McNemar aplicado aos dados desta tabela detectou diferença significativa entre as duas técnicas para um $\alpha = 5\%$ ($p = 0,0001$), enquanto o valor Kappa calculado foi 0,46.

DISCUSSÃO

Como podemos verificar, anteriormente nos dados da Tabela 1, a percentagem de concordância de resultados positivos e de negativos, nas duas técnicas, em nossa pesquisa foi de 48,1%, e 94,3%, respectivamente, resultando em uma percentagem de concordância total de 78,7%.

Ishizuka, D'Angelino & Souza [14], também em estudo comparativo das técnicas de IFI e HAI, para anticorpos anti-*T. gondii*, em suínos, obtiveram concordância da ordem de 84,3%, sendo a co-negatividade de 100%, semelhantes aos nossos dados, mas a co-positividade foi bem mais elevada, de 72,8%. Obtiveram um índice Kappa de 69,2%, o que foi maior do que encontramos no presente trabalho.

Camargo et al., [3] compararam o uso da HAI com a IFI e teste imunoenzimático de captura de IgM (CAP-M) em soros humanos. O teste de HAI foi comparável ao teste de imunofluorescência quanto à sensibilidade e especificidade. Em 350 soros, todos os

reagentes no IFI-IgG (50,9%) foram também na HAI (52%) permitindo aos autores concluírem ser viável a utilização da HAI como teste de triagem de indivíduos reatores e não reatores, mas associando ao IFI-IgG e CAP-M, quando para diagnóstico de infecções recentes. Ainda em humanos, Camargo et al. [2], compararam as técnicas de ELFA (enzyme linked fluorescent assay), IFI e HAI para o diagnóstico da toxoplasmose, obtendo positividade em 38 amostras pela ELFA, 48 através de IFI, e 39 pela HAI, de um total de 100 amostras (título positivo a partir de 1:16). Os resultados, em relação a IFI e HAI, conferem com os nossos, pois revelaram um maior índice de positividade pela IFI. Porém, Camargo et al. [2] atribuíram que isto possa ser devido ao fato do teste detectar anticorpos de superfície, os primeiros a serem formados.

Silva et al. [18], compararam para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em cães, as técnicas de ELISA, IFI e HAI. Foram positivos 9 cães (22,5%) através da HAI, 14 (35%) pela IFI e 14 (35%) pelo ELISA. Houve alta correlação entre IFI e ELISA e baixa entre IFI e HAI. Na espécie ovina, Silva [20], encontrou 10 ovelhas positivas pela HAI ($\geq 1:128$) e 15 pela IFI ($\geq 1:160$) de um total de 87 animais. Numa segunda coleta com 36 ovelhas, 8 foram reagentes pela HAI ($\geq 1:32$) e 9 pela IFI ($\geq 1:320$). Esses resultados foram considerados positivos pela HAI e confirmados pela IFI dando uma maior confiabilidade ao resultado, já que podem ocorrer falsos negativos na hemaglutinação devido a interferência de anticorpos IgM.

Concordamos com Camargo et al. [3] e Ishizuka, D'Angelino & Souza [14], que a técnica de HAI deve ser utilizada, por se constituir numa técnica simples de ser executada, de resultado rápido e de baixo custo, podendo ser utilizada para levantamento de prevalência na população suína. Concordamos também com Dubey [9], Frenkel [11], e Araújo [1] que a IFI é um teste específico e sensível, de fácil realização, com a desvantagem ressaltada por Corcuera, Lozada & Lopes [6], do alto custo do microscópio de imunofluorescência, e por Camargo et al. [2], de apresentar interferências como, luminosidade, objetivas do microscópio, filtros, sensibilidade do conjugado e do antígeno, e a subjetividade da leitura.

Corcuera, Lozada & Lopes [6], concluíram que a especificidade e sensibilidade variam com cada técnica, obtendo-se os melhores resultados com IFI,

Tabela 1. Distribuição dos soros de suínos de acordo com os resultados das técnicas de HAI e IFI para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

IFI	HAI		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	39 ^a	42 ^b	81 ^{a + b}
Negativo	9 ^c	150 ^d	159 ^{c + d}
Total	48 ^{a + c}	192 ^{b + d}	240 ^{a + b + c + d}

ELISA e HAI e aconselham que deve-se adotar o critério de utilizar, no mínimo, duas técnicas destas três. Esta conclusão vai ao encontro à do presente trabalho e também a de Camargo et al. [2] e Silva et al. [18], de associar duas técnicas quando o objetivo for diagnóstico e podendo ser utilizada apenas uma para screening.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho, permitem concluir que:

Os resultados encontrados nos permitem afirmar que para fins diagnósticos a IFI é superior à HAI, e que esta reação tem sua principal indicação em inquéritos epidemiológicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a valiosa colaboração da Profa. Dra. Silvia Maria Spalding e do LACEN-RS, na execução da técnica de Imunofluorescência Indireta.

NOTAS INFORMATIVAS

- ¹ Graphpad Instat, Copyright©, 1990-1993, Graphpad Software, v 2.04.
- ² HAP-Toxoplasmosis: SALCK Ind. e Com. Prod. Biológicos Ltda. R. Arapuã, 201 - 04307070 V. Guarani, São Paulo - SP - Brasil.
- ³ Conjugado anti-Pig IgG: SIGMA®, 3050 Spruce Street, Saint Louis, Missouri 61103 - USA.

REFERÊNCIAS

- Araujo F.A.P. 1999.** Avaliação soroepidemiológica de anticorpos para *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 em soros de suínos (*Sus scrofa*) da região da Grande Erechim, RS - Brasil, detectados através das técnicas de imunofluorescência indireta e imunoenzimática. 125p. Rio de Janeiro - RJ. Tese (Doutorado). Instituto Oswaldo Cruz.
- Camargo A.C., Silva A.C.S., Marrocos H.H.S., Rosenail J., Oliveira L.M.A. & Falcão R.R. 1998.** Estudo comparativo entre diferentes métodos para diagnóstico da toxoplasmose humana. *Newslab*. 28: 121-128.
- Camargo M.E., Ferreira A.W., Rocca A. & Belem Z.R. 1986.** Um teste prático para a sorologia da toxoplasmose: o teste de hemaglutinação. Estudo comparativo com os testes de imunofluorescência e imunoenzimático de captura de IgM. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*. 22: 196-201.
- Camargo M.E. 1974.** Introdução as técnicas de imunofluorescência. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*. 10: 87-107.
- Chemello D., Eckert G.U. & Teixeira C.G. 1998.** Imunidade a Parasita. In: Scroferneker M.L. & Pohlmann P.R. (Eds). *Imunologia Básica e Aplicada*. Porto Alegre: Sagra Luzatto, 373p.
- Corcuera M.T., Lozada J. & Lopez R-F. 1981.** Estudio comparativo de las distintas técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la toxoplasmosis. *Revista de la Sanidad y Higiene Publica*. 55: 1045-1059.
- Coutinho S.G., Andrade C.M., Malvar G.S. & Ferreira L.F. 1970.** Analise comparativa entre as sensibilidades da Reação Indireta de Anticorpos Fluorescentes e da Reação de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos séricos para toxoplasmose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 5: 315-325.
- D'Angelino J.L. & Ishizuka M.M. 1986.** Toxoplasmose suína. III. Avaliação da prevalência de infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pela prova de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 100:634-647.
- Dubey J.P. 1990.** Diagnosis of livestock abortion due to *Toxoplasma gondii*. In: *Laboratory Diagnosis of Livertock Abortion*. 3rd edn. Ames: Iowa State University Press, 260p.
- Farrel R.L., Docton F.L., Chamberlain D.M. & Cole C.R. 1952.** Toxoplasmosis. *Toxoplasma* isolated from swine. *American Journal Veterinary Research*. 13: 181-184.
- Frenkel J.K. 1997.** Toxoplasmose. In: Veronesi R. & Foccacia R. (Eds). *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, pp. 1290-1306.
- Freyre A. 1989.** *Toxoplasmosis en las especies domésticas y como zoonosis*. Montevideo: Departamento de Publicaciones de la Universidad de la Republica do Uruguai. 332p.
- Giraldi N., Freire R.L., Navarro I.T. & Vidotto, O. 1991.** Toxoplasmose congênita natural em suínos na região de Londrina, PR. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 1: 1- 5.
- Ishizuka M.M., D'Angelino J.L. & Souza J.M.P. 1986.** Toxoplasmose suína. II. Estudo comparativo das provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, para a avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros suínos. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 100: 524-530.
- Lindsay D.S, Blagburn B.L. & Stuart B.P. 1992.** Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). In: Lemam A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'allaire S. & Taylor D.J. (Eds). *Diseases of Swine*. 7th edn. Ames: Iowa State University Press, 1021p.

- 16 **Morris J.G. 1996.** Food safety symposium: The safety of foods of animal origin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 209: 2045-2047.
- 17 **Schenk M.A.M. 1976.** Frequência e isolamento de *Toxoplasma gondii* em suínos do Estado de Minas Gerais. *Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG*. 28: 261-266.
- 18 **Silva D.A.O., Cabral D.D., Bernardina B.L.D., Souza M.A. & Mineo J.R; 1997.** Detection of *Toxoplasma gondii* - specific antibodies in dogs. A comparative study of immunoenzymatic, immunofluorescent and haemagglutination titres. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 92: 785-789.
- 19 **Silva J.M.L. 1959.** Sobre um caso de Toxoplasmose espontânea em suínos. *Arquivos da Escola Superior de Veterinária*. 12: 425-428.
- 20 **Silva K.L.M.V. 2001.** Análise de transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) em ovinos em duas propriedades no município de Rosário do Sul. Santa Maria -RS. 16p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria.
- 21 **Smith R.D. 1995.** *Veterinary Clinical Epidemiology, a problem-oriented approach*. 2nd edn. Boca Ratón: CCR Press, 279p.
- 22 **Thrusfield M. 1986.** *Veterinary Epidemiology*. Great Britain: Butterworth, 483p.
- 23 **Vidotto O., Costa A.J., Balarin M.R.S. & Rocha M.A. 1987.** Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. I. Observações Clínicas e hematológicas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 39: 623-639.
- 24 **Vidotto O., Navarro I.T., Giraldi N., Mitsuka R. & Freire, R.L. 1990.** Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina - PR. *Semina*. 11: 53-59.

