



XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024

ANTICORPOS ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* EM QUIRÓPTEROS DO ESTADO DA BAHIA: FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA E COMPARAÇÃO DE MATRIZES BIOLÓGICAS NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS

Camilla Santos Ferreira de Lima¹; Matheus Oliveira de Melo², Aristeu Vieira da Silva³

1. Bolsista – Modalidade Bolsa/PIBIC/FAPESB, Graduanda em Ciências Biológicas, Grupo de Pesquisa em

Zoonoses e Saúde Pública, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: camillasferreiralima@gmail.com

2. Bolsista - Modalidade de Bolsa/CAPES, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução (PPGECOEVO), Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: matheuso.demelo@gmail.com

3. Orientador - Departamento de Ciências Biológicas, Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: aristeusilva@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*; Quirópteros; Anticorpos.

INTRODUÇÃO

Em ambientes naturais o comportamento dos parasitos em relação a seus hospedeiros é o resultado de uma interação complexa e duradoura, resultando no equilíbrio entre as partes, cientificamente conhecida como coevolução (SANGIONI et al., 2005). O desequilíbrio dessa interação ocorre como consequência das alterações ambientais naturais ou da degradação ambiental antrópica ou ambos (SANGIONI et al., 2005).

A Bahia conquistou a segunda posição do ranking de desflorestamento com 3.230 hectares em 2019. Hoje, restam no estado 2.408.648 ha de Mata Atlântica, o que, originalmente, já correspondeu a 18.875.099 ha (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e BRASIL, 2021), fruto da intensa exploração ambiental. O estudo de agentes zoonóticos em morcegos vem apresentando elevado interesse por parte da comunidade científica, devido aos inúmeros nichos ecológicos ocupados por esses animais e pela oportunidade de adaptação de agentes infecciosos dos quirópteros a outras espécies animais e ao homem (THOMPSON et al, 2013).

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário apicomplexa *Toxoplasma gondii*. Esse protozoário tem distribuição cosmopolita e hábito de vida intracelular parasitário obrigatório, podendo parasitar mamíferos e aves, mas tendo como hospedeiro definitivo os felídeos, onde ocorre a reprodução sexuada do parasito e posteriormente a liberação de oocistos pelas fezes.

É escasso na literatura científica trabalhos que tratam de detecção de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em morcegos. Trabalhos como os de Oliveira et al (2017) e Junior et al (2020) detectaram anticorpos anti-*T. gondii* em morcegos, com frequência de 1/5 (20,00%) e 1/18 (5,55%) respectivamente, mas esses trabalhos não eram direcionados exclusivamente aos morcegos e incluíam outros mamíferos silvestres.

Com isso, o objetivo desse trabalho foi estudar a frequência da presença de morcegos com anticorpos anti-*T. gondii* em morcegos coletados no estado da Bahia e comparar o método de coleta de sangue total com sangue em papel filtro para exames imunológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Ofícios do CEUA de 28 de junho de 2018 e 28 de agosto de 2019).

Os quirópteros coletados na Bahia foram capturados com puçá em ambientes fechados e pela instalação de redes de neblina em locais escolhidos durante as expedições de campo (AURICCHIO; SALOMÃO, 2002; REIS et al., 2010). As redes foram estendidas ao fim da tarde, durante o pôr do sol, sendo recolhidas entre seis a até oito horas depois. A eutanásia foi realizada por administração de quetamina e xilazina em dose anestésica seguida de aprofundamento do plano anestésico induzido por excesso de quetamina, de acordo com os procedimentos sugeridos pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2013).

A coleta de sangue foi feita por via intracardíaca ou pela punção da veia do antebraço, e neste caso duas gotas de sangue (0,06 mL) foram depositadas em papel filtro Whatman nº 4 (Baptista et al., 2006). As amostras de soro, obtidas pela centrifugação das amostras de sangue coletadas pela via intracardíaca, foram transferidas para microtubos de 1,5mL e mantidos em congelador -20°C até a fase de teste. O eluato do sangue coletado em papel de filtro com diâmetro de 0,5 cm foi obtido após incubação das tiras de papel em 75 μ L de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) pH 7,2, por 16h a 4 °C, determinando a concentração de sangue/soro no papel filtro segundo Aston et al. (2014). Daqueles animais que sofreram eutanásia, foram coletadas amostras de fígado, as quais foram maceradas em quatro vezes o volume de PBS estéril, sendo então centrifugadas a 1.600 g por dez minutos para obtenção do sobrenadante do macerado de tecidos, o qual foi estocado em microtubos de 1,5 ml a -20°C até a realização do teste de detecção de anticorpos.

As amostras foram submetidas ao teste de aglutinação direta usando antígeno formolizado (DESMONTS, REMINGTON, 1980) em diluição seriada na razão 2 de 25 a 100 para verificação dos títulos de anticorpos. Foram consideradas reagentes as diluições que formaram uma película acinzentada na superfície da solução e não reagentes as diluições que formaram uma precipitação azul no fundo da cavidade.

O resultado da sorologia foi tabulado com as variáveis: espécie, sexo, guilda alimentar e local de coleta dos morcegos, analisadas pelo teste de χ^2 de Pearson com correção de continuidade em tabelas de contingência usando o programa EpiInfo 7 (DEAN et al., 2011). Estatísticas de associação entre os resultados dos exames das amostras de soro, de sobrenadante de tecidos e do eluato do papel de filtro serão avaliadas na planilha DagStat (MACKINNON, 2000) pelo cálculo do χ^2 de McNemar, coeficiente kappa e índices de concordância de resultados positivos e negativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo foram analisados 45 animais, com coletas de amostras de sangue total, papel de filtro e sobrenadante de fígado, abrangendo diferentes municípios da Bahia. Feira de Santana teve maior número de amostras (18), seguido por Santo Amaro (13) e Ilhéus (10). A amostragem incluiu tanto zonas rurais (26) quanto urbanas (19), permitindo investigar a influência do ambiente na prevalência da infecção. As guildas dos animais estudados foram frugívoros (9), hematófagos (5), insectívoros (4) e nectarívoros (4).

Dos 45 animais, 9 apresentaram anticorpos, com 7 positivos em sangue total e papel filtro, e 1 em fígado. A análise de sensibilidade e especificidade para amostras de sangue e fígado indicou resultados perfeitos, com 100% de acurácia nos testes (Tabela 1).

Tabela 1. Estatísticas de acurácia diagnóstica para a detecção de anticorpos anti-Toxoplasma gondii pelo método de aglutinação direta modificada (MAT) em amostras de sobrenadante de fígado de quirópteros da Bahia, comparados a detecção de anticorpos no soro sanguíneo.

<i>Índice</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Estimativa</i>	<i>se</i>	<i>Lower 95% CI</i>	<i>Upper 95% CI</i>
Sensibilidade	SE	1,0000	0,0000	0,0250	ND
Sensibilidade de um teste aleatório	SE_RAN	0,0714			
Especificidade	SP	1,0000	0,0000	0,7529	ND
Especificidade de um teste aleatório	SP_RAN	0,9286			
Eficiência (taxa de classificação correta)	EFF	1,0000	0,0000	0,7684	ND
Eficiência de um teste aleatório	EFF_RAN	0,8673			
Valor preditivo do teste positivo	PVP	1,0000	0,0000	0,0250	ND
Valor preditivo positivo de um teste aleatório	PVP_RAN	0,0714			
Valor preditivo do teste negativo	PVN	1,0000	0,0000	0,7529	ND
Valor preditivo negativo de um teste aleatório	PVN_RAN	0,9286			
Taxa de falso positivo	FP	0,0000	0,0000	ND	0,2471
Taxa de falso negativo	FN	0,0000	0,0000	ND	0,9750
Razão de probabilidade de teste positivo	LR+	ND	ND	ND	ND
Razão de probabilidade de teste negativo	LR-	ND	ND	ND	ND
Coefficiente Kappa	κ	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000
Acordo observado	PO	1,0000	0,0000	0,7684	ND
Acordo de chance	PE	0,8673			
Acordo positivo	PA	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000
Acordo negativo	NA	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000

Fonte: Imagem autoral.

No entanto, ao comparar sangue e papel filtro, a sensibilidade foi de apenas 60%, com 40% de falsos negativos, apesar de uma alta especificidade de 92,31%. Isso sugere que, embora um resultado negativo seja geralmente confiável, um resultado positivo deve ser interpretado com cautela devido à elevada taxa de falsos negativos, possivelmente ligada à degradação de anticorpos durante a coleta.

O índice Kappa entre sangue total e papel filtro foi de 0,5231, indicando uma concordância moderada. O teste de qui-quadrado mostrou associação significativa entre os resultados ($p = 0,0036$), mas o teste de McNemar não revelou diferenças significativas nas proporções de discordância ($p = 1,0000$). Apesar da boa especificidade e valor preditivo negativo, a sensibilidade moderada e a alta taxa de falsos negativos limitam a aplicabilidade clínica do teste (Tabela 2).

Tabela 2. Estatísticas de acurácia diagnóstica para a detecção de anticorpos anti-Toxoplasma gondii pelo método de aglutinação direta modificada (MAT) em amostras de eluato de sangue de quirópteros coletado em papel de filtro, comparados a detecção de anticorpos no soro sanguíneo.

<i>Índice</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Estimativa</i>	<i>se</i>	<i>Lower 95% CI</i>	<i>Upper 95% CI</i>
Sensibilidade	SE	0,6000	0,2191	0,1466	0,9473
Sensibilidade de um teste aleatório	SE_RAN	0,1613			
Especificidade	SP	0,9231	0,0523	0,7487	0,9905
Especificidade de um teste aleatório	SP_RAN	0,8387			
Eficiência (taxa de classificação correta)	EFF	0,8710	0,0602	0,7017	0,9637
Eficiência de um teste aleatório	EFF_RAN	0,7294			
Valor preditivo do teste positivo	PVP	0,6000	0,2191	0,1466	0,9473
Valor preditivo positivo de um teste aleatório	PVP_RAN	0,1613			
Valor preditivo do teste negativo	PVN	0,9231	0,0523	0,7487	0,9905
Valor preditivo negativo de um teste aleatório	PVN_RAN	0,8387			
Taxa de falso positivo	FP	0,0769	0,0523	0,0095	0,2513
Taxa de falso negativo	FN	0,4000	0,2191	0,0527	0,8534
Taxa de classificação incorreta	1-EFF	0,1290	0,0602	0,0363	0,2983
Kappa e índices Relacionados					
Coefficiente Kappa	κ	0,5231	0,2088	0,1139	0,9323
Acordo observado	PO	0,8710	0,0602	0,7017	0,9637
Acordo de chance	PE	0,7294			

Fonte: Imagem autoral.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa revelou uma frequência significativa de anticorpos anti-*T.gondii* em morcegos da Bahia, com 20% de amostras positivas. Os testes de sangue e papel filtro demonstraram boa especificidade e alto valor preditivo negativo, eficazes para identificar indivíduos não infectados. No entanto, a sensibilidade moderada (60%) e a alta taxa de falsos negativos do teste em papel filtro indicam que ele pode perder uma parte considerável de verdadeiros positivos. O índice Kappa sugere uma concordância moderada entre os testes, evidenciando a necessidade de melhorias, embora ambos não estejam totalmente desalinhados. Assim, embora o uso de papel filtro seja uma alternativa viável, o sangue permanece a matriz mais confiável para a detecção de anticorpos.

REFERÊNCIAS

- AURICCHIO, P.; SALOMÃO, M.G. Técnicas de coleta e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos. São Paulo: Arujá: Instituto Pau Brasil de História Natural. 348 p. 2002.
- ASTON, E.J.; et al 2014. Use of filter papers to determine seroprevalence of Toxoplasma gondii among hunted ungulates in remote Peruvian Amazon. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife., 3(1):15-19. 2014.
- AYRES, J. M. et al. Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil. Belém, Sociedade Civil. Mamirauá, 256p. 2005.
- BIAZUS, A.H., et al. Antibodies against Toxoplasma gondii in bats (Desmodus rotundus) captured near caves in cities from western region of Santa Catarina State, Brazil. Comp Clin Pathol 25, 505–507. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2223-3>. 2016.
- BAPTISTA, M. et al. Técnica para punção venosa em morcegos (Mammalia, Chiroptera).
- BRASIL, Fundação SOS Mata Atlântica; INPE. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2019/2020, relatório técnico. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 73p. 2021.
- Chiroptera Neotropical, 12(2):291-292. 2006.
- CABRAL, A. D. et al. Occurrence and diversity of Sarcocystidae protozoa in muscle and brain tissues of bats from São Paulo state, Brazil. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife p. 14 91–96. 2021.
- CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais. Brasília: Conselho Federal de Medicina Veterinária. 66p. 2013.
- DEAN, A. G. et al. Epi info™, a Data Base and Statistics Program for Public Health Professionals. CDC, Atlanta, GA, USA, 2011.
- JONES et al. Nature 451:990-3, 2008.
- JUNIOR P. A. B., et al. Survey of anti-Toxoplasma gondii antibodies in wild mammals captured from Atlantic Forest fragments in Bahia, northeastern Brazil. Braz J Vet Parasitol; 29(4): e004720. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120200083>. 2020.
- MACKINNON A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. Computers in Biology and Medicine, v.30, n.3, p. 127-134, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001048250000068?via%3Dihub>. Acesso em: 11 maio 2023.
- OLIVEIRA, P. M. V. et al. Pesquisa de Toxoplasma gondii em mamíferos silvestres de duas áreas do estado da Bahia. SEMIC: n. 21 (2017): XXI Seminário de Iniciação Científica. 2017.
- REMINGTON JS. Direct agglutination test for diagnosis of Toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity. J Clin Microbiol, 11:562-8, 1980.
- SANGIONI, L.A. et al. Emerg. Infect. Dis.; v. 11, n.2, p. 265-270, 2005.
- THOMPSON, R.C. A. International Journal for Parasitology. v. 43, p. 10791088. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23892130/>; Acesso em: 04 de maio. 2023.
- ZETUN C. B. Leptospira spp. and Toxoplasma gondii antibodies in vampire bats (Desmodus rotundus) in Botucatu region, SP, Brazil. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 15 (3). <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000300014>. 2009..