

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

**SOROPREVALÊNCIA E CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA
TOXOPLASMOSE EM ÁREA RURAL DE SANTA TERESA, ESPÍRITO SANTO**

JULYANA CERQUEIRA BUERY

VITÓRIA
2013

JULYANA CERQUEIRA BUERY

**SOROPREVALÊNCIA E CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA
TOXOPLASMOSE EM ÁREA RURAL DE SANTA TERESA, ESPÍRITO SANTO**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Doenças Infecciosas, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre
em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior

Coorientadora: Prof^a. Dra. Blima Fux

VITÓRIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

B928s Buery, Julyana Cerqueira, 1988-
Soroprevalência e características epidemiológicas da
toxoplasmose em área rural de Santa Teresa, Espírito Santo /
Julyana Cerqueira Buery. – 2013.
65 f. : il.

Orientador: Crispim Cerutti Junior.
Coorientador: Blima Fux.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Toxoplasmose. 2. Epidemiologia. 3. Toxoplasma gondii. 4.
População rural. I. Cerutti Junior, Crispim. II. Fux, Blima. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

DEDICATÓRIA

A Deus, o grande apoiador deste trabalho, e a força que me move até às conquistas.

Aos moradores de Santa Teresa e Santa Maria de Jetibá que gentilmente concordaram em participar e compreenderam o objetivo do estudo, se esforçando, junto conosco, para que o presente trabalho fosse desenvolvido.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Crispim Cerutti Junior, meu orientador, que me acolheu desde o início com muito empenho, sempre transmitindo calma e otimismo. Um exemplo de profissional dentro da Medicina Social e da Epidemiologia.

À professora Dra. Blima Fux, minha coorientadora, pelos conhecimentos transmitidos, pelo empenho em ajudar e pelas colaborações fundamentais.

À toda a equipe de coleta em campo: Edmilso (motorista – Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo), núcleo de Vigilância Epidemiológica da Prefeitura Municipal de Santa Teresa, Flávia Sartori (aluna de Iniciação Científica - UFES) e Vanessa Foeger (laboratório de Análises Clínicas – Prefeitura Municipal de Santa Maria de Jetibá).

Ao professor Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, por ter aberto as portas do Laboratório de Toxoplasmose da UFMG para meu aprendizado e para a realização de toda a sorologia deste estudo.

À querida Rosálida Lopes, pela paciência e dedicação comigo enquanto estive em Belo Horizonte para a realização dos experimentos, ensinando -me como “nada dar errado”, com muita organização e, principalmente, carinho.

À Luciana Dias pela solidariedade em me receber em sua casa e pela amizade selada entre Piauí e Espírito Santo.

À Kamila Rabelo e Isabella Guimarães, grandes amigas, por terem aceitado fazer “participações especiais” nas coletas, quando eu mais precisei, nas condições mais adversas e sem pedirem nada em troca.

Ao laboratório de Protozoologia e a toda equipe do setor de Parasitologia, onde cresci como pesquisadora e tive os melhores e piores momentos dentro da UFES. Agradeço especialmente à Maria Augusta Dario, Steveen Ribeiro, Cynara Possamai e Elisa Lagnier pelo companheirismo e amizade.

Aos professores e turma de 2011 do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas da UFES, pelos ensinamentos, pelas boas risadas e pelas “ciladas” em que nos metemos, mas sempre unidos. Com carinho especial, agradeço novamente à Maria Augusta Dario e também à Mariela Piccin, Teresa Gomes, Antônio Luiz Caus e Marcela Coelho, pelos melhores momentos.

Aos amigos de faculdade e ao colegiado do curso de Farmácia e Bioquímica da UFES, pelo companheirismo, apoio e ensinamentos.

Aos meus amigos de infância, que tenho certeza que são os melhores que alguém pode ter. Nunca me deixam desanimar e estão sempre presentes na minha vida.

Ao meu amado Rafael e família, pela doçura das palavras, pela torcida constante e pela ajuda nos momentos de preocupação, seja subindo a serra capixaba quando não tínhamos transporte ou com um abraço acolhedor.

À minha família, em especial a meus pais Jorge e Cristina e à minha irmã Maria Cecília, por me ensinarem que nada funciona sem amor. A busca pelo ideal vivendo no mundo real é árdua, mas suave ao lado de nossa família honesta e dedicada. Muito obrigada por todos os valores e carinho transmitidos a mim.

À Deus, toda honra e toda glória pelos momentos de alegria que vivi, começando pela aprovação no mestrado e que se estenderam ao longo da jornada, na qual conheci pessoas inesquecíveis e tive experiências únicas. Também agradeço pelas dificuldades enfrentadas, pois me fizeram refletir e criar novas soluções para situações que pareciam insuperáveis.

À CAPES e à FAPES, pelo apoio financeiro ao longo desses dois anos.

“Ó São Jorge, meu Santo Guerreiro, invencível na fé em Deus, que trazeis em vosso rosto a esperança e confiança, abre meus caminhos. Eu andarei vestido e armado com vossas armas para que meus inimigos tendo pés não me alcancem, tendo mãos não peguem, tendo olhos não me enxerguem e nem pensamentos possam ter para me fazerem mal. Armas de fogo o meu corpo não alcançarão, facas e lanças se quebrarão sem ao meu corpo chegar, cordas e correntes se arrebentarão sem o meu corpo amarrar. Glorioso São Jorge, em nome de Deus, estendei vosso escudo e vossas poderosas armas, defendendo-me com vossa força e grandeza. Ajudai-me a superar todo desânimo (...). Dai-me coragem e esperança, fortalecei minha fé (...).”

(Oração de São Jorge)

RESUMO

Este estudo tem como objetivo analisar a prevalência e incidência anual da infecção assintomática causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Avaliou-se 311 amostras provenientes de 79 indivíduos residentes em área rural do município de Santa Teresa, no estado do Espírito Santo. Os dados demográficos, socioeconômicos e de fatores associados à infecção foram coletados utilizando questionários, que foram atualizados trimestralmente. A seleção dos indivíduos foi realizada a partir de uma coorte pré-existente, referente ao estudo de casos assintomáticos de malária na região montanhosa do estado. Após seleção dos participantes, o plasma foi coletado trimestralmente para realização da sorologia anti-*T. gondii* pela técnica de ELISA e complementado a investigação, o teste de avidéz de IgG dos indivíduos positivos foi executado para avaliação da taxa de soroconversão nessa coorte. A prevalência de infecção pelo *Toxoplasma gondii* na comunidade foi de 67,1% e a incidência foi de 6,2 por 100 pessoas-ano de observação. Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre os indivíduos que tiveram contato com gatos e nem entre o consumo de carne de porco ou carneiro, mesmo crua ou mal cozida, e a toxoplasmose. Segundo a análise multivariada, o único fator de risco que está relacionado com a infecção parece ser o aumento da idade dos indivíduos (OR = 1,086). Confirmando dados da literatura, a análise estatística mostrou que a cada ano que passa, os indivíduos estão 8,6% mais propensos a adquirir toxoplasmose. Este estudo confirma que os habitantes de comunidades rurais da região montanhosa do Espírito Santo são altamente expostos ao *Toxoplasma gondii* e possuem pouquíssimo conhecimento sobre a doença, o que os torna vulneráveis a exposição.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Toxoplasmose; População Rural; Epidemiologia; Fatores de Risco; Brasil.

ABSTRACT

This study aims to analyze the prevalence and annual incidence of asymptomatic infection caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. Three hundred and eleven samples were evaluated from 79 individuals living in rural areas of Santa Teresa city, in the state of Espírito Santo. Demographic and socioeconomic data and factors associated with infection were collected using questionnaires, which were updated quarterly. The selection of subjects was made from a pre-existing cohort, based in a study of asymptomatic malaria cases in the mountainous region of the state. After selection of the participants, plasma was collected quarterly for performing the serologic tests anti-*T. gondii* using ELISA techniques and, in addition, IgG avidity was tested for positive samples to evaluate the rate of seroconversion in this cohort. The prevalence of *T. gondii* infection in this community was 67.1% and the incidence was 6,2 per 100 person-year of observation. There was no statistically significant association between individuals who had contact with cats or between the consumption of pork or lamb meat, even raw or undercooked, and toxoplasmosis. According to multivariate analysis, the only risk factor related with infection seems to be an increasing age (OR = 1.086). Confirming published data, the statistical analysis showed that, for each year that passes, the individuals are 8.6% most likely to acquire toxoplasmosis. This study confirms that the inhabitants of rural communities in the mountainous region of the Holy Spirit are highly exposed to *Toxoplasma gondii* and have little knowledge about the disease, which makes them vulnerable to exposure.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis; Rural Population Epidemiology, Risk Factors, Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Ciclo vital do *Toxoplasma gondii*, mostrando as diferentes formas evolutivas do protozoário.....13
- Figura 2 – Perfis sorológicos, segundo o comportamento de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* detectados pelos testes de IFI-IgG, IFI-IgM e HA, no curso da infecção.....18
- Figura 3 – Mapa dos limites administrativos de Santa Teresa, mostrando os seis distritos e algumas das comunidades rurais onde o estudo foi realizado....24
- Figura 4 – Placa de reação sorológica de ELISA, mostrando (A) os controles, (B) reação positiva de ELISA para IgG – em amarelo – e (C) reação de avides para IgG, em que se considerou apenas os resultados das amostras que eram IgG positivas no primeiro teste.....28
- Gráfico 1 – Frequência das faixas etárias observadas na coorte de Santa Teresa, ES, 2011.....31
- Gráfico 2 – Frequência de soropositividade das faixas etárias observadas na coorte de Santa Teresa, ES, 2011.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Hábitos e fatores de risco relacionados com a toxoplasmose na área rural de Santa Teresa, ES, 2011.....	32
Tabela 2 – Avaliação de anticorpos da classe IgG por ELISA <i>in house</i> e avidéz de IgG em amostras de pacientes da região rural de Santa Teresa, ES, 2011..	35
Tabela 3 – Taxa de soroconversão de anticorpos IgG de moradores da área rural de Santa Teresa, ES, 2011.....	36
Tabela 4 – Estatísticas descritivas e associação entre idade e resultados do teste de ELISA IgG dos moradores da região rural de Santa Teresa, ES, 2011..	37
Tabela 5 – Prevalência de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> de acordo com o sexo e a idade dos moradores investigados na área rural de Santa Teresa, ES, 2011.....	37
Tabela 6 – Características comportamentais associadas estatisticamente à infecção pelo <i>Toxoplasma gondii</i> na região rural de Santa Teresa, ES, 2011. Relação dos resultados de ELISA IgG com as variáveis categóricas.....	38
Tabela 7 – Análise do modelo de regressão logística <i>odds ratio</i> (OR) incluindo as variáveis estatisticamente significantes relacionadas à toxoplasmose na área rural do município de Santa Teresa, ES, 2011.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP- Comitê de Ética e Pesquisa

DQ- Distância Interquartílica

ELISA- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

HIV- *Human immunodeficiency virus*

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC 95%- Intervalo de Confiança de 95%

IFI- Imunofluorescência Indireta

IgG- Imunoglobulina da classe G

IgM- Imunoglobulina da classe M

IgA- Imunoglobulina da classe A

IgE- Imunoglobulina da classe E

INCAPER- Instituto Capixaba de Pesquisa e Assistência Técnica e Extensão Rural

ISAGA- *Immunosorbent Agglutination Assay*

MEIA- *Microparticle capture enzyme immuno assay*

n- Número descritivo da amostra

OPD- Ofenilenodiamino

OR- *Odds Ratio*

PCR- *Polymerase chain reaction*

Rpm- Rotações por minuto

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

UFES- Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Toxoplasmose: etiologia e ciclo evolutivo do <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.2 Mecanismo de transmissão.....	13
1.3 Epidemiologia da toxoplasmose no Brasil.....	14
1.4 As manifestações da doença e medidas preventivas	15
1.5 A imunidade relacionada à toxoplasmose e ferramentas diagnósticas	17
1.5.1 Resposta imunológica e perfil sorológico da toxoplasmose.....	17
1.5.2 Métodos diretos e indiretos para detecção do <i>Toxoplasma gondii</i>	19
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Geral	22
3.2 Específico.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Delineamento do estudo	23
4.1.1 Local do estudo.....	23
4.1.2 População do estudo	24
4.1.3 Coleta de dados.....	25
4.1.4 Coleta de sangue.....	25
4.2 Análise de dados.....	28
4.2.1 Variáveis do estudo	29
4.3 Considerações éticas.....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Dados obtidos por meio de questionários	31
5.1.1 Descrição da amostra	31
5.2 ELISA e teste de avidéz de IgG	35
5.3 Taxa de soroconversão.....	35

5.4 Análise dos dados	36
5.4.1 Análise bivariada de fatores associados à prevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em área rural de Santa Teresa	36
5.4.2 Análise multivariada de fatores de risco relacionados à toxoplasmose em área rural de Santa Teresa	42
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	48
ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Toxoplasmose: etiologia e ciclo evolutivo do *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é causada por um protozoário intracelular denominado de *Toxoplasma gondii*, que tem ampla distribuição mundial. Este parasito pertence ao filo *Apicomplexa* e foi descoberto há pouco mais de um século, porém os conhecimentos sobre sua importância clínica e seu ciclo de vida elucidaram-se nos últimos quarenta anos (ROBERT-GANGNEUX *et al.*, 2012).

Na natureza, o *T. gondii* apresenta-se morfologicamente sob três formas: oocistos, bradizoítos e taquizoítos. Os oocistos são as formas evolutivas produzidas no epitélio intestinal dos felídeos e, ainda imaturos, são liberados junto com as fezes do animal para o ambiente. Nos tecidos dos hospedeiros intermediário e definitivo localizam-se os cistos contendo bradizoítos e os taquizoítos, por sua vez, são encontrados no interior de várias células e nos líquidos corporais (DUBEY, 1970; DUBEY, 2008).

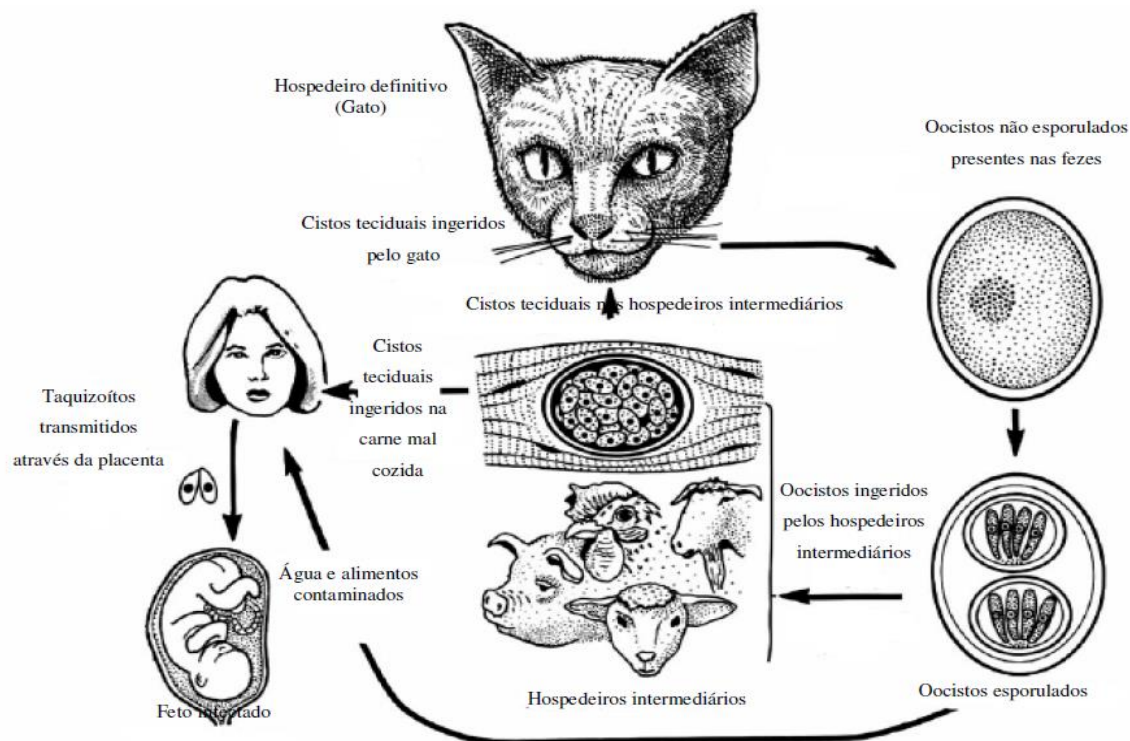
O ciclo biológico do parasito é dividido em duas fases: assexuada ou extra-intestinal, que ocorre nos hospedeiros intermediários e definitivos; e sexuada ou entero-epitelial, que ocorre somente nos hospedeiros definitivos. Os felídeos são considerados os hospedeiros definitivos, enquanto o homem, outros mamíferos e as aves são hospedeiros intermediários. Ambos podem ser infectados por oocistos eliminados nas fezes dos felídeos por via oral. O oocisto se rompe no intestino destes hospedeiros liberando os esporozoítos que invadem os enterócitos. Dentro dos enterócitos, cada parasito é denominado taquizoíto. Estes se multiplicam rapidamente por divisão binária, invadindo novas células, dos tecidos hematopoiético e parenquimatosos, caracterizando a fase aguda da infecção. Logo após a invasão de uma nova célula, o ciclo assexuado pode levar à formação de bradizoítos intracelulares. Estas formas se multiplicam mais lentamente do que os taquizoítos, mas estão menos acessíveis à resposta imune, no interior de cistos teciduais.

Na fase sexuada, os bradizoítos encistados infectam os felídeos, levando à formação final de oocistos e à eliminação dessa forma para o meio ambiente. Em condições

adequadas de umidade e temperatura, esporulam e tornam-se infectantes após um período de 1 a 5 dias, recomeçando o ciclo (Figura 1) (DUBEY, 2008).

Por serem capazes de eliminar os oocistos, forma infectante do parasito, os felídeos são animais de importância primária na transmissão da toxoplasmose, porém não são os únicos responsáveis pela propagação da doença (BONAMETTI *et al.*, 2007; MEIRELES *et al.*, 2011).

Figura 01 – Ciclo vital do *Toxoplasma gondii*, mostrando as diferentes formas evolutivas do protozoário.



Fonte: Adaptado de DUBEY, 1987

1.2 Mecanismo de transmissão

O período de incubação da toxoplasmose varia de acordo com o modo de contaminação: 10 a 23 dias quando a infecção ocorre pela ingestão de bradizoítos, e de 5 a 20 dias após a ingestão de oocistos excretados nas fezes de felídeos infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL, 2010).

Para cada uma das formas evolutivas potencialmente infectantes, há variações quanto às fontes de contaminação. No caso dos oocistos, pode ocorrer pela exposição direta às fezes do gato que estejam no solo e pela ingestão de água, frutas e verduras contaminados com *T. gondii*. Os felídeos geralmente não manifestam sintomas da infecção e isso dificulta o combate à toxoplasmose. Outra via de transmissão ao ser humano é o consumo de carnes cruas ou mal cozidas de ovinos, suínos e caprinos contendo cistos teciduais (TENTER *et al.*, 2000).

No panorama mundial, observa-se que fatores geoclimáticos, sociais, ocupacionais, alimentares, a procedência rural ou urbana dos indivíduos contribuem significativamente para que haja variações nas taxas de prevalência. Nos Estados Unidos da América (EUA) a prevalência da infecção é relativamente baixa, quando comparada a países da América do Sul, onde o Brasil ganha destaque chegando a 80% em certas regiões (CAMARGO *et al.*, 2001; SOBRAL *et al.*, 2005; PAPPAS *et al.*, 2009).

1.3 Epidemiologia da toxoplasmose no Brasil

Um estudo de coorte realizado na área rural no estado do Acre, município de Pedro Peixoto, revelou a prevalência de 65,8% (IC95% = 60,8–70,8%) em indivíduos assintomáticos (FERREIRA *et al.*, 2009). Fatores como o aumento da idade e contato com solo e água contaminados foram relacionados com a infecção causada pelo *T. gondii*. Já na região sudeste, também em localidade rural, foi encontrada prevalência de 32,57% (IC95%=28,95-36,17%) no estado de Minas Gerais, município do Vale do Jequitinhonha, com delineamento de estudo semelhante ao primeiro. Indivíduos que relataram ingestão de ovo cru ou mal cozido com muita frequência, que tiveram contato com galinhas no domicílio e com gatos fora do domicílio durante a infância demonstraram uma maior chance de adquirirem a infecção pelo *T. gondii* (QUITES *et al.*, 2009). Também em Minas Gerais, na cidade de Ituiutaba, região do Triângulo Mineiro, a prevalência foi semelhante, chegando a 36%, em soros avaliados por hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. O aumento da idade pareceu ser, novamente, a principal ligação com a doença (MAIA *et al.*, 2012). Em uma comunidade de baixa renda de Jardim São Remo, localizada no estado de São Paulo,

foram investigadas 339 crianças e a prevalência encontrada foi igual a 32,4%, crescendo, mais uma vez, com a idade dos indivíduos (FRANCISCO *et al.*, 2006). Em Fortaleza, capital do estado do Ceará, foi observada prevalência de até 73% (REY *et al.*, 1999), além de terem demonstrado que, naquela região, a prevalência aumentava de acordo com a idade dos participantes. Num estudo sobre as principais protozooses, no estado da Bahia, nos municípios de Santo Inácio e Iraquara, ocorreram prevalências de toxoplasmose bastante distintas: 25,8% e 65,5%, respectivamente. Nesse estudo, a presença de gatos parece ser determinante para o aparecimento da toxoplasmose, sendo estes animais menos frequentes em Santo Inácio (CERQUEIRA *et al.*, 1998). Já o estudo realizado em Erechim (Rio Grande do Sul) revelou a prevalência de 17,7% em relação à toxoplasmose ocular, pelo exame de fundo de olho. O inquérito epidemiológico realizado nessa localidade demonstrou que os fatores de risco para aquisição de toxoplasmose incluíam comer carne mal cozida ou mal passada, crua, curada ou defumada e trabalhar em contato com o solo mais de uma vez por semana (JONES *et al.*, 2006).

No Espírito Santo, dois estudos de prevalência em humanos ganham destaque no panorama da toxoplasmose. No município de Venda Nova do Imigrante, foi encontrada prevalência de 11, 27% de toxoplasmose ocular, baseado em achados fundoscópicos (ABREU *et al.*, 1998). Na capital do estado, Vitória, um estudo de soroprevalência em gestantes revelou a prevalência de 73,5% em mulheres atendidas na rede básica de saúde pública. Essa taxa foi relacionada com a aquisição de carnes em feiras livres e em relação à escolaridade, ter mais de quatro anos de estudo pareceu ser um fator de proteção para as gestantes avaliadas. (AREAL; MIRANDA, 2008).

No momento, ainda não há dados oficiais sobre a frequência da infecção pelo *T. gondii* em pacientes assintomáticos no estado. O Espírito Santo ainda é carente de estudos de soroprevalência dessa magnitude, observando-se o foco até então nas frequências de pacientes sintomáticos, que abordaram coortes específicas e não representa a realidade de todo o estado.

1.4 As manifestações da doença e medidas preventivas

Há diversos tipos de manifestação da toxoplasmose, que variam, devido às condições imunológicas do indivíduo. Dentre os principais quadros está a toxoplasmose ocular, que geralmente é associada a quadros de retinocoroidite, e pode resultar de infecção congênita ou infecção adquirida. A infecção ocular leva a uma lesão inflamatória aguda da retina, deixando cicatrizes após a fase aguda, que inclui sintomas como dor nos olhos, fotofobia, lacrimejamento e visão turva. Se as estruturas centrais da retina forem envolvidas, pode haver perda progressiva de visão a cada reativação, chegando até a cegueira (COMMODARO *et al.*, 2009).

Outra forma grave da doença é a toxoplasmose congênita que está associada à transmissão vertical, da mãe infectada para o feto em desenvolvimento. Caso a infecção ocorra durante ou imediatamente antes da gravidez, há um alto risco de transmissão congênita. Neste caso, a presença de taquizoítos na corrente sanguínea da mãe propicia o contato do feto com o parasito, com transmissão por meio da placenta, podendo levar a morte intrauterina, retardo mental, defeitos oculares e cegueira anos mais tarde (KRAVETZ *et al.*, 2010).

Já a toxoplasmose em imunocomprometido, também amplamente estudada, ocorre em pessoas com o sistema imunológico deprimido levando a sintomas graves. Os quadros mais comuns incluem febre, confusão mental, dor de cabeça, convulsões, náuseas, falta de coordenação motora e até coma, levando o paciente a morte. A encefalite causada pelo *T. gondii* é a apresentação clínica mais comum da toxoplasmose entre as pessoas infectadas pelo HIV e em quase todos os casos, é resultado da reativação de infecção crônica iniciada por depressão da imunidade (DUBEY, 2008). Os indivíduos que se tornam imunocomprometidos sem antes terem tido contato com o parasito estão mais propensos a desenvolverem uma infecção primária grave (CDC, 2010).

Como visto acima, a infecção pode se apresentar com formas diferentes no organismo humano, sendo a forma ocular e a congênita as mais conhecidas e extensamente estudadas (FERREIRA *et al.*, 2009). Porém, caracteristicamente é assintomática ou oligossintomática nos pacientes imunocompetentes (COSTA *et al.*, 2007). A fase aguda é caracterizada por sintomas inespecíficos, semelhantes a um leve resfriado, e pelo aparecimento de nódulos linfáticos e dores musculares, que duram algumas semanas e

depois desaparecem. No entanto, o parasito permanece no organismo, num estado inativo, sob a forma de cistos contendo bradizoítos (CDC,2010). Por essas características, a toxoplasmose em assintomáticos se torna de grande interesse para a saúde pública (VIEGAS *et al.*, 2002).

A alta prevalência combinada com a natureza assintomática das infecções impõe uma série de medidas visando à redução do impacto desta infecção no âmbito populacional. Visto que essa é uma zoonose passível de prevenção, utilizar luvas para atividades relacionadas ao trabalho com solo, adotar medidas higiênicas na manipulação dos alimentos, como lavar verduras, legumes e frutas, evitar o contato com as fezes dos felídeos que possam estar contaminadas são atitudes importantes. Além disso, congelar carnes a baixa temperatura, evitar consumo de carne crua ou mal cozida e manter gatos de estimação com cuidados adequados são estratégias que podem reduzir a possibilidade da infecção causada pelo *T. gondii* em seres humanos (HILL; DUBEY, 2002). Sendo assim, a investigação sobre o modo de viver dos indivíduos em comunidade, as práticas do cotidiano, os hábitos comportamentais e movimentos migratórios, parecem ser essenciais à compreensão da distribuição da toxoplasmose no espaço e no tempo (CAVALCANTE *et al.*, 2006).

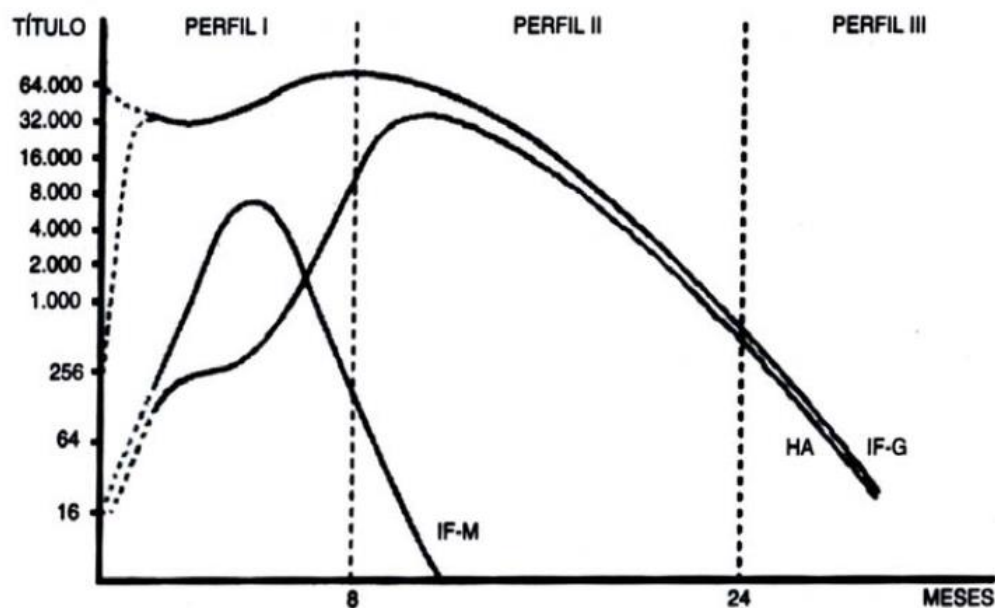
1.5 A imunidade relacionada à toxoplasmose e ferramentas diagnósticas

1.5.1 Resposta imunológica e perfil sorológico da toxoplasmose

Quando um hospedeiro se infecta, ocorre a disseminação do *T. gondii* por todo o organismo, por meio das vias sanguínea e linfática. Ao mesmo tempo, inicia-se a formação de anticorpos específicos e de respostas imunes celulares, com o propósito de eliminar os taquizoítos extracelulares. Durante a fase crônica da toxoplasmose, os bradizoítos intracelulares que resistem são responsáveis pela manutenção de títulos sorológicos que geralmente duram toda a vida do hospedeiro (KAWAZOE, 2002). Nas primeiras semanas de infecção, ainda na fase de parasitemia, surgem anticorpos específicos dos isotipos IgM, IgA, e IgG que lisam os taquizoítos extracelulares, quando

combinados com o complemento. No início da infecção do hospedeiro as classes de imunoglobulinas IgM, IgA e IgG aparecem primeiro, podendo ser detectadas pelas reações sorológicas dentro de oito a doze dias após o contato com *T. gondii*. A pesquisa de IgM e IgA em recém-nascidos é utilizada, por exemplo, para o diagnóstico de toxoplasmose congênita, pois esses anticorpos não atravessam a placenta devido ao tamanho de suas moléculas, que são pentâmeros. Quando presentes no soro, essas moléculas indicam a produção pelo próprio feto, em resposta a uma infecção congênita (CAMARGO, 2001). Na evolução da infecção, configura-se um perfil sorológico de transição, com níveis elevados de anticorpos IgG, de afinidade crescente pelo antígeno. Desaparecem os anticorpos IgA e IgM, podendo os anticorpos IgM ocasionalmente estarem presentes em baixo títulos. Paulatinamente, este quadro de transição dá lugar ao perfil de infecção crônica, que se mantém por toda a vida, com IgG em baixos títulos, alta avidéz e ausência dos anticorpos de outros isotipos (Figura 2). Cabe ressaltar que esse cronograma de transição pode variar de semanas a meses, dependendo do estado imunitário de cada indivíduo (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Figura 2 – Perfis sorológicos, segundo o comportamento de anticorpos anti-toxoplasma detectados pelos testes de IFI-IgG, IFI-IgM e HA, no curso da infecção pelo *T. gondii*.



Fonte: FERREIRA; ÁVILA, 2001

1.5.2 Métodos diretos e indiretos para detecção do *Toxoplasma gondii*

Postula-se que, para um diagnóstico de excelência da toxoplasmose, a combinação adequada de técnicas sorológicas, de cultura e de técnicas moleculares, seja o ideal (LAPPALAINEN *et al.*, 2004). Nesse contexto, a sorologia parece ser a principal abordagem para estabelecer o diagnóstico, tanto do quadro agudo quanto crônico da infecção. As técnicas sorológicas, que são de detecção indireta do parasito, consistem na pesquisa de anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas (principalmente IgG, IgM e IgA) anti-*T. gondii* nos líquidos corporais do paciente. Em indivíduos imunocompetentes, que geralmente são assintomáticos, as pesquisas de IgG e IgM são suficientes para o diagnóstico, por serem sensíveis, específicas e de fácil execução (CAMARGO, 2001). Para tal finalidade, existem diferentes técnicas que tem a propriedade de detectar anticorpos anti-*T. gondii* ou anti-componentes antigênicos do parasito no sangue dos pacientes. Testes como imunofluorescência indireta, hemaglutinação, ensaio de aglutinação imunossorvente (ISAGA), ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) ou ensaio imuno-enzimático ligado a micropartículas (MEIA) têm papel importante no diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* (KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2005). A técnica de ELISA, por sua vez, parece ser a mais utilizada tanto nos laboratórios de pesquisa quanto para a realização de diagnóstico sorológico, já que consegue detectar a presença de anticorpos anti-*T.gondii*, a partir de pequenas quantidades de amostra de soro ou plasma do paciente.

Por sua vez, o teste de avidéz de anticorpos IgG desempenha papel fundamental no âmbito da determinação do tempo de infecção, baseado no perfil sorológico da doença. O termo “avidéz” relaciona-se com a força de ligação entre o antígeno e o anticorpo, demonstrando a afinidade funcional entre eles. Como regra geral, a avidéz do anticorpo IgG é inicialmente baixa pouco tempo depois da infecção e, pela apresentação de antígenos à células B, aumenta durante as semanas e meses subsequentes (LAPPALAINEN *et al.*, 2004). A proporção de IgG de alta avidéz, portanto, está relacionada com uma infecção antiga mesmo que anticorpos IgG de baixa avidéz possam persistir em baixíssimos títulos no soro (KYM *et al.*, 1974). Devido a sua importância, os testes de avidéz são amplamente utilizados combinados com os

resultados de sorologia para IgG e IgM, possibilitando a determinação com maior precisão da provável época de soroconversão dos infectados.

Nos últimos 20 anos, o diagnóstico de agentes infecciosos inclui o uso de tecnologia que envolve os ácidos nucléicos. A principal ferramenta diagnóstica usada, dentro da biologia molecular, é a PCR. Essa técnica normalmente apresenta resultados positivos em casos de parasitemia, demonstrando que a infecção está na fase aguda (KHALIFA *et al.*, 1994).

2. JUSTIFICATIVA

O município de Santa Teresa, na região montanhosa do Espírito Santo, faz parte da área endêmica de malária residual de Mata Atlântica do estado (CERUTTI JUNIOR *et al.*, 2007). Diversos pacientes com quadro febril, suspeitos, inicialmente, de serem portadores de malária, tiveram confirmação diagnóstica de toxoplasmose adquirida. A ocorrência de toxoplasmose nessa região parece estar muito provavelmente relacionada aos hábitos alimentares da população, que incluem a ingestão de carne de porco, inclusive de linguiça artesanal sem cozimento, além de consumo de carne de caça e contato frequente dos indivíduos com solo e água sem tratamento, por exemplo. Ambas as condições mórbidas (malária e toxoplasmose) são potencialmente preveníveis, necessitando de intervenção no âmbito da saúde coletiva. Há uma grande preocupação em relação à malária, em virtude de seu mecanismo não habitual de transmissão nas áreas de Mata Atlântica, mas, como principal diagnóstico diferencial, a toxoplasmose também precisa ser plenamente caracterizada sob o ponto de vista epidemiológico. Um primeiro passo nesse sentido é a quantificação de sua incidência, prevalência e a caracterização epidemiológica da transmissão, o que permitirá determinar a sua magnitude na região e traçar medidas de prevenção.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a magnitude da toxoplasmose na população da área rural do município de Santa Teresa, no Espírito Santo, pela verificação da prevalência, taxa de soroconversão dos indivíduos e caracterização epidemiológica dessa coorte.

3.2 Específico

- Na coleta inicial da coorte, verificar, por sorologia, a prevalência de indivíduos assintomáticos infectados com *Toxoplasma gondii*;
- Avaliar a taxa de soroconversão anual, por meio de coletas trimestrais;
- Relacionar os indivíduos que apresentam anticorpos da classe IgG anti-*Toxoplasma gondii* com fatores socioeconômicos, demográficos e comportamentais favoráveis à toxoplasmose, avaliados por meio de questionários;
- Comparar a prevalência da toxoplasmose na área rural de Santa Teresa com dados encontrados em outras comunidades rurais do Espírito Santo e de todo Brasil.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

4.1.1 Local do estudo

O estudo foi realizado na área rural do município de Santa Teresa, que se localiza a aproximadamente 80 quilômetros (km) de Vitória, capital do estado do Espírito Santo. Fundada oficialmente em 1891, devido à formação de vilas de imigrantes italianos que chegaram ao estado, a cidade ainda sofre influência maciça dessa cultura, confirmada principalmente pelos hábitos alimentares e laborais. O município possui uma área de 683,15 km² representando 1,5073% do território do estado e é dividido em 6 distritos oficiais: Alto Santa Maria, Alto Caldeirão, Santo Antônio do Canaã, São João de Petrópolis, Vinte e Cinco de Julho e Santa Teresa (sede). O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) é de 0,789 segundo o Atlas de Desenvolvimento Humano/PNUD (2000) e expectativa de vida da população de 74,85 anos. De um total de 21.823 habitantes, aproximadamente 50% vive em áreas rurais e 50% da área do município é destinada à agricultura. Santa Teresa tem cerca de 50 comunidades rurais e todas possuem organização informal, geralmente ligada à parte religiosa (INCAPER-ES, 2011 ;Censo IBGE, 2010). Desse total, foram investigadas comunidades de Lombardia, Valsugana Velha, Rio Saltinho, São José do Caldeirão, Centenário e Patrimônio (Figura 3).

4.1.3 Coleta de dados

Os moradores participantes do estudo foram submetidos a questionário contendo perguntas sobre sua naturalidade, atividades profissionais e de lazer, tempo de residência no local de ocorrência do caso e procedência anterior. Foram feitas também perguntas sobre a presença de animais domésticos (principalmente felídeos), costumes alimentares, tipo de atividades profissionais e de lazer e sobre sinais e sintomas sugestivos de toxoplasmose, assinalando-se o período de sua ocorrência (Anexo B).

4.1.4 Coleta de sangue

Para realização dos experimentos, foram coletados 5 ml de sangue total de veia periférica de membro superior, mediante técnica asséptica, utilizando-se material descartável (Vacutainer®), em tubos secos, com anti-coagulante tipo EDTA, com o intuito de proceder à realização de sorologia, pela técnica de ELISA e também atender à pesquisa sobre malária, que ocorria simultaneamente. A partir da coleta inicial, os moradores foram acompanhados mediante visitas trimestrais. A cada três meses, nova amostra de sangue era coletada e os dados do questionário eram atualizados (Anexo B). As visitas foram em número de quatro, independentemente do fato da amostra colhida ter se tornado positiva. Aqueles indivíduos que eram positivos já na coleta inicial, foram também avaliados e acompanhados, como descrito acima (Anexo B).

4.1.4.1 Transporte e armazenamento de amostras

O sangue total foi centrifugado na Unidade de Medicina Tropical, no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Espírito Santo, a 3600 rpm durante dez minutos, para possibilitar a separação do plasma e do concentrado de hemácias. Alíquotas de aproximadamente 1 ml de cada porção do sangue total foram acondicionadas em tubos de 1,5 ml (Eppendorf®), e mantidas a – 20°C em *freezer* apropriado no Laboratório de Parasitologia até o processamento.

4.1.4.2 Avaliação laboratorial

Os ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA) foram realizados para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Para obtenção do antígeno foi utilizada a cepa RH (tipo I) de *T. gondii* isolada de um paciente com encefalite em Cincinnati (Ohio, EUA) em 1939 (SABIN, 1941). Esta cepa, altamente virulenta, tem sido mantida no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por passagens sucessivas de taquizoítas em camundongos. As amostras positivas na detecção de IgG foram submetidas a outro tipo de ELISA que testou a avidéz dos anticorpos IgG (afinidade funcional entre anticorpo-antígeno) quando colocados em solução de uréia, para verificação de infecção recente.

4.1.4.2.1 ELISA *in house* para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*

Os antígenos protéicos para o ELISA foram obtidos a partir de taquizoítos do exsudato peritoneal de pelo menos dez camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* (cepa RH). Para isto, injetou-se 3 ml de PBS pH 7,2 no peritônio do animal, aspirando em seguida com a mesma seringa, sem massagem do abdome. Centrifugou-se o líquido peritoneal obtido em tubos de 15 ml por 20 segundos (2000 rpm) para retirar células contaminantes do camundongo. Caso houvesse hemácias (sedimento levemente rosado), o sedimento de taquizoítos deveria ser tratado com 2 ml de cloreto de amônio (NH₄Cl - 0,14 Molar) por cinco minutos e centrifugado novamente por 10 minutos, a 2000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e o que líquido que permaneceu no tubo foi lavado com PBS pH 7,2 (10 minutos, a 2000rpm). Tomou-se uma preparação de aproximadamente 10^8 a 10^9 taquizoítos suspensos em 1 ml de PBS pH 7,2 em tubo de 15 ml e foi feita a sonicação à 20 hertz (em banho de gelo) de cinco à sete vezes, durante 45 segundos com intervalos de descanso de 2 minutos entre os procedimentos (Ultrasonic Homogeneizer – 4710; Coler-Palmer Instrument Co.). Observou-se o rompimento dos parasitas em microscópio, entre lamina e lamínula e em seguida, foi dosada a concentração de proteínas pelo método de Lowry.

A realização da técnica de ELISA para detecção de anticorpos IgG foi feita em microplacas de polietileno com 96 orifícios (poços) de fundo chato (Sasterdt®), as quais foram previamente sensibilizados com antígenos contendo 2000 µg (2mg) de proteína/ml, *overnight*, a 4 °C. Posteriormente, a placa foi lavada duas vezes com solução NaCl 0,87% contendo Tween 20 à 0,05% em água destilada (solução de lavagem) e bloqueou-se a placa com caseína 2%, por 30 minutos, à 37°C. Lavou-se a placa por quatro vezes com solução de lavagem. Os plasmas foram diluídos em solução PBS-Tween 20 a 0,05% e caseína a 0,25%, chegando a diluição final de 1:100, e foram colocados 100 µl de amostra diluída em cada orifício, em duplicata. Após esta etapa, foram adicionados em cada orifício 100 µl do conjugado anti-imunoglobulina humana marcada com peroxidase. A placa foi novamente incubada, a 37°C por 45 minutos, e lavada quatro vezes com solução de lavagem. Em seguida, adicionou-se em cada orifício 100µl do substrato enzimático com ofenilenodiamino (OPD). Após incubação por 20 minutos a 37°C, a reação foi interrompida adicionando 30 µl de ácido sulfúrico 4N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Bio-Rad®, Modelo 3550), em comprimento de onda de 490 nm. Como controle, também em duplicata, foram utilizados seis soros negativos e dois sabidamente positivos por placa, verificados por ELISA previamente.

O limite de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média da densidade óptica (DO) dos soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Os resultados foram expressos em índices de reatividade (IR), de acordo com a fórmula: $IR = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$, onde valores de $IR > 1,0$ foram considerados positivos e os soros com IR entre 0,95 e 1,05 eram novamente processados. Durante o acompanhamento trimestral dos moradores da região, consideramos que todos os indivíduos que não compareceram/rejeitaram participação (“sem registro”) na primeira coleta e apareceram positivos nas demais, foram positivos em todas as coletas.

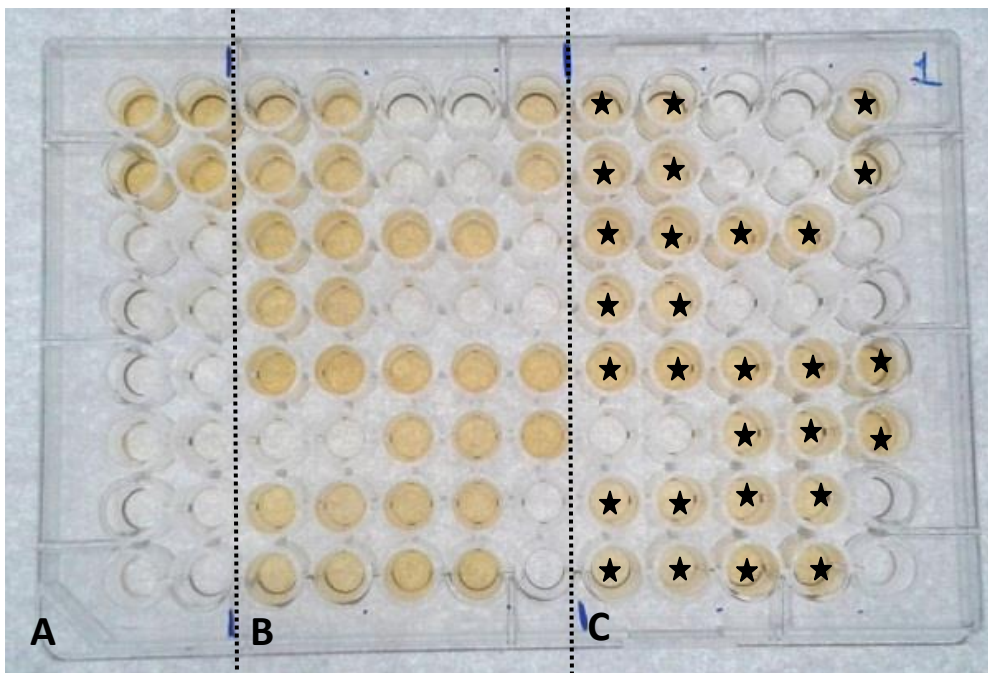
4.1.4.2.2 Avaliação de avidéz de IgG por ELISA

A adsorção do antígeno à placa de reação foi executada da mesma maneira descrita acima, bem como a diluição dos soros e aplicação das amostras na placa também em

duplicata. Neste caso, porém, cada poço testado recebeu incubação adicional de 10 minutos a 37°C com 100 µl solução caotrópica neutra de uréia 6M contendo PBS-Tween 20 0,02M pH 7,2. A seguir, foi feita a revelação do anticorpo ligado por conjugado peroxidase anti-IgG humano como acima descrito. A avidéz foi determinada pela porcentagem de anticorpos resistentes ao caotrópico, quando comparada à primeira reação (ELISA para IgG), e amostras cujos valores eram maiores que 50% foram considerados de alta avidéz (LAPPALAINEN *et al.*, 2004).

Com o objetivo de otimizar o tempo de execução e por consequência potencializar o controle das reações, os dois testes descritos acima – ELISA para detecção de IgG e teste de avidéz de IgG – foram realizados sempre na mesma placa (Figura 4).

Figura 4 – Placa de reação sorológica de ELISA mostrando (A) os controles, (B) reação positiva de ELISA para IgG – em amarelo – e (C) reação de avidéz para IgG, em que se considerou apenas os resultados das amostras que eram IgG positivas no primeiro teste.



Fonte: BUERY, 2012

4.2 Análise de dados

A partir dos resultados laboratoriais obtidos com as amostras da primeira coleta, foi calculada a prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* na coorte abordada pelo

estudo. Para isso, fez-se um cálculo de porcentagem simples a partir da quantidade bruta de indivíduos soropositivos, obtendo o resultado final. Já a incidência foi calculada baseando-se na taxa de soroconversão dos indivíduos com o passar do tempo. Foi calculada a taxa de soroconversão contendo o número de pessoas-ano no denominador, normalizada para a base 100 (FERREIRA *et al.* 2009), já que o acompanhamento dos moradores teve duração de um ano, com quatro visitas.

As variáveis categóricas foram expressas pelas suas frequências absolutas e relativas. A distribuição das variáveis quantitativas contínuas foi avaliada mediante a determinação de suas medidas de posição central e variabilidade, quer fossem média e desvio padrão, para o caso de se adequarem ao modelo de Gauss, quer fossem mediana e distância interquartílica, para o caso de não se adequarem ao referido modelo. A comparação entre variáveis categóricas foi realizada pelo teste Qui-quadrado, exceto nos resultados menores do que cinco que foram esperados para a hipótese nula, em cuja situação foi utilizado o teste Exato de Fisher.

No caso da variável de exposição expressa por uma resposta quantitativa contínua, a comparação foi feita por meio do teste de Mann-Whitney, uma vez que o desfecho foi dicotômico e a distribuição não se adequou ao modelo de Gauss.

A presença de possíveis variáveis de confusão foi avaliada por meio de regressão logística. Para este estudo usou-se o teste de ajuste de modelo de Hosmer-Lemeshow, que baseia-se em agrupar os riscos e em comparar a probabilidade observada com a prevista dentro de cada grupo. Em cada passo, testou-se a hipótese nula de que o modelo se adequou bem aos dados. Se o resultado do teste tivesse um p-valor $< 0,050$, então se rejeitava a hipótese nula, isto é, o modelo não se adequou bem aos dados.

Uma vez calculada a *odds ratio* (OR), estimou-se o intervalo de confiança de 95%.

O banco de dados foi analisado mediante o uso do programa estatístico SPSS, versão 21 (SPSS Inc.).

4.2.1 Variáveis do estudo

4.2.1.1 Variáveis dependentes

A variável dependente foi a presença de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* resultante da sorologia pelo método de ELISA em indivíduos da população do estudo.

4.2.1.2 Variáveis independentes

- 1) Sóciodemográficas: local da residência; sexo; idade ; ocupação dos indivíduos.
- 2) Características comportamentais relacionados à infecção: presença de animais de estimação atualmente, locais onde animais defecam, contato com animais, realização de atividades ligadas ao solo e a areia; consumo de carne crua ou mal cozida e consumo de animais abatidos em caça.

4.3 Considerações éticas

Aprovação do protocolo do estudo foi obtida a partir do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil (050/2011). A assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtida de todos os participantes do estudo ou seus responsáveis.

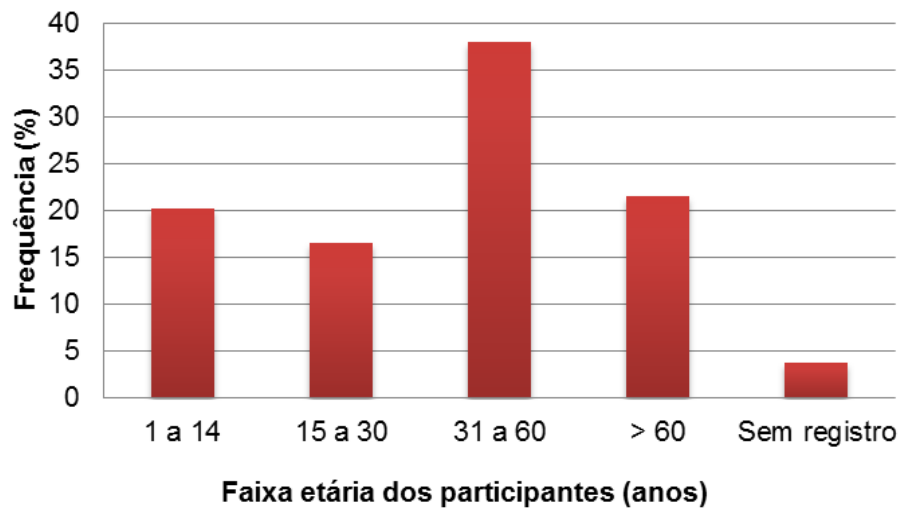
5. RESULTADOS

5.1 Dados obtidos por meio de questionários

5.1.1 Descrição da amostra

A população total do estudo foi constituída por 79 indivíduos com idade entre um e 92 anos, dos quais 42 (53,1%) eram do sexo masculino e 37 (47,9%) do sexo feminino e nenhuma era gestante. A mediana de idade foi de 43,5 (distância interquartílica – DQ: 16,5 a 58,5) anos. Na coorte abordada pelo estudo, a frequência de idades se distribuiu como mostrado no gráfico 1.

Gráfico 1 – Frequência das faixas etárias observadas na coorte de Santa Teresa, ES, 2011.



No que diz respeito às características relacionadas à infecção, do número total de participantes, apenas três (3,85%) tinham conhecimento sobre toxoplasmose e foram os únicos que souberam responder se havia casos de toxoplasmose em suas famílias. Quarenta e nove (62,0%) indivíduos relataram exercer atividades profissionais agrícolas e, durante as atividades de lazer, apenas 15 indivíduos (19,0%) não estavam em contato direto com atividades características de ambientes rurais, como pescaria,

jardinagem ou contato com a mata. Dos 79 indivíduos, 38 (48,1%) relataram ter como animal doméstico pelo menos um gato e, desses, 12 indivíduos (31,57%) mantinham o hábito de ter uma caixa de areia para que os animais defecassem. O restante relatou que os animais defecavam em qualquer lugar no quintal. Quando perguntados sobre o consumo de carne de caça (cotias, tatus, pacas, etc.), apenas cinco indivíduos (6,41%) admitiram o consumo. Já em relação ao consumo de carne ou linguiça de porco, 60 moradores (76,93%) admitiram comer pelo menos uma vez por semana esse tipo de alimento e, desse total, apenas 18 (23,07%) relataram o consumo ocasional ou frequente do alimento cru. Com a intenção de encontrar alguma relação entre as infecções pelo *Plasmodium sp.* e *Toxoplasma gondii*, também foi questionado se os moradores daquelas localidades já haviam adquirido malária. Do total, nove (11,4%) confirmaram a infecção pelo parasito no passado (Tabela 1).

Tabela 1 – Hábitos e fatores de risco relacionados com a toxoplasmose na área rural de Santa Teresa, Espírito Santo, em 2011.* (Continua)

Variáveis	n (%)
Episódio anterior de malária	
Não	67 (84,8)
Sim	9 (11,4)
Sem registro	3 (3,8)
Conhecimento sobre ter ou não toxoplasmose	
Não	73 (92,4)
Sim	3 (3,8)
Sem registro	3 (3,8)
Conhecimento sobre episódio de toxoplasmose sintomática ou congênita na família	
Não	73 (92,4)
Sim	3 (3,8)
Sem registro	3 (3,8)
Tipo de atividade profissional	
Agrícolas	40 (50,6)
Não agrícolas, mas relacionada ao meio rural	11 (13,9)
Não agrícola e não relacionada ao meio rural	25 (31,6)
Sem registro	3 (3,8)

Tabela 1 – Hábitos e fatores de risco relacionados com a toxoplasmose na área rural de Santa Teresa, Espírito Santo, em 2011.* (Continuação)

Variáveis	n (%)
Contato com cães	
Não	19 (24,1)
Sim	57 (72,2)
Sem registro	3 (3,8)
Contato com gatos	
Não	34 (43)
Sim	42 (53,2)
Sem registro	3 (3,8)
Animais possuem lugar específico para defecar	
Não	44 (55,7)
Sim	12 (15,2)
Sem registro	23 (29,1)
Atividades de lazer relacionadas à mata	
Não	57 (72,2)
Sim	11 (13,9)
Sem registro	11 (13,9)
Atividades de lazer relacionadas à margens de rios ou córregos	
Não	57 (72,2)
Sim	11 (13,9)
Sem registro	11 (13,9)
Atividades de lazer relacionadas à outros ambientes da área rural	
Não	45 (57)
Sim	23 (29,1)
Sem registro	11 (13,9)
Atividades de lazer relacionadas à contato direto com animais	
Não	48 (60,8)
Sim	20 (25,3)
Sem registro	11 (13,9)
Atividades de lazer relacionadas à contato direto com o solo	
Não	41 (51,9)
Sim	27 (34,2)
Sem registro	11 (13,9)

Tabela 1 – Hábitos e fatores de risco relacionados com a toxoplasmose na área rural de Santa Teresa, Espírito Santo, em 2011.* (Conclusão)

Variáveis	n (%)
Atividades de lazer em que não há nenhum contato com a área rural	
Não	56 (70,9)
Sim	16 (20,3)
Sem registro	7 (8,9)
Consumo de linguiças artesanais ou carne de porco	
Não	15 (19)
Sim	61 (77,2)
Sem registro	3 (3,8)
Consumo de carne de caça atualmente	
Não	69 (87,3)
Sim	7 (8,9)
Sem registro	3 (3,8)
Consumo de carne de caça no passado	
Não	66 (83,5)
Sim, há em média 2 anos	7 (8,9)
Sim, há mais de 10 anos	3 (3,8)
Sem registro	3 (3,8)
Frequência de consumo de carne de porco ou de carneiro (inclusive linguiça)	
Nunca	17 (21,5)
Todos os dias	1 (1,3)
Várias vezes por semana	4 (5,1)
Cerca de uma vez por semana	16 (20,3)
De vez em quando	38 (48,1)
Sem registro	3 (3,8)
Frequência de consumo de carne/linguiça de porco ou de carneiro crua	
Nunca	58 (73,4)
Raramente	6 (7,6)
Ocasionalmente	12 (15,2)
Sem registro	3 (3,8)
Total	79 (100)

*dados condensados, proveniente de todas as coletas realizadas.

5.2 ELISA e teste de avidéz de IgG

Em relação aos resultados obtidos por ELISA com as amostras de sangue coletadas na primeira visita, 53 indivíduos apresentaram sorologia positiva para anticorpos anti-*T. gondii*. Logo, a prevalência da toxoplasmose mostrou-se igual a 67,1% (IC 95% = 56,7% - 77,5%) na região rural do município. Inicialmente, nenhum indivíduo foi diagnosticado como tendo infecção recente, baseando-se nos testes de avidéz de anticorpos da classe IgG. Porém, nas coletas posteriores houve a verificação de novos casos, inclusive recentes, mostrados por ambos os testes. A partir desses dados foi calculada a taxa de soroconversão na coorte durante a vigência do estudo (Tabela 2).

Tabela 2 – Avaliação de anticorpos da classe IgG por ELISA *in house* e avidéz de IgG em amostras de pacientes da região rural de Santa Teresa, Espírito Santo.

Variáveis	n (%)
Resultado ELISA IgG (IR)	
Negativo	26 (32,9)
Positivo	53 (67,1)
Avidéz de IgG	
Baixa Avidéz	5 (6,3)
Alta Avidéz	47 (59,5)
Sem registro	27 (34,2)
Total	79 (100)

*dados condensados, referentes a todas as coletas realizadas.

5.3 Taxa de soroconversão

De 79 indivíduos que participaram do estudo, durante o ano de 2011, 75 compareceram à primeira coleta. Desses, 26 (32,9%) não apresentaram anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii* detectáveis na primeira amostra de plasma coletada. Um morador tornou-se positivo na 3ª coleta e outros dois na 4ª coleta, indicando que eles foram expostos durante o ano. O primeiro indivíduo a sofrer soroconversão era do sexo feminino e os outros do sexo masculino. Tinham 26 e 72 anos de idade, sendo que o terceiro indivíduo não registrou a idade na ocasião do questionário. Os dois indivíduos que responderam a todas as perguntas não executavam atividades profissionais

relacionadas ao meio rural, suas atividades de lazer eram relacionadas ao solo e relatavam que não ingerem carne ou linguiça crua. Como se pode observar na tabela 3, a taxa de soroconversão foi, portanto, estimada em 6,2 por 100 pessoas-ano de observação (IC 95% 1,3-18,2% pessoa-ano). Duas dessas amostras, frente à solução caotrópica no teste de avidéz de IgG, mostraram valores de afinidade funcional menor que 50% caracterizando baixa avidéz desses anticorpos pelo antígeno testado. A outra amostra de soro mostrou avidéz alta nesse teste (>50%).

Tabela 3 – Taxa de soroconversão de anticorpos IgG de moradores da área rural de Santa Teresa, ES, 2011.

Incidência	Valores	IC 95%
Número de soroconvertidos	3	-
População/Tempo	48,3	-
Taxa de incidência (%)	6,2	1,3 - 18,2

5.4 Análise dos dados

5.4.1 Análise bivariada de fatores associados à prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em área rural de Santa Teresa

5.4.1.1 Variáveis sociodemográficas

A mediana de idade dos indivíduos infectados foi de 52 anos (DQ: 32 a 65). A comparação entre a distribuição das faixas etárias para os indivíduos positivos e para os indivíduos negativos pelo teste de Mann-Whitney revelou que a idade está estatisticamente associada à soroconversão (Tabela 4; Gráfico 2). Em relação ao sexo dos participantes, ser do sexo feminino ou masculino não foi estatisticamente relevante ($p < 0,200$) para adquirir a infecção ($p = 0,567$), como mostrado na tabela 5.

Tabela 4 – Estatísticas descritivas e associação entre idade e resultados do teste de ELISA IgG dos moradores da região rural de Santa Teresa, ES, 2011.

ELISA	n	P25	Mediana	P75	Média	Desvio-padrão	Intervalo de confiança (95%)	Resultado do teste de Mann-Whitney	
								Postos Médios	p-valor*
Negativo	25	8	16	31	22,52	17,84	15,15-29,89	21,76	0,000
Positivo	51	32	52	65	49,94	22,07	43,73-56,15	46,71	

*p-valor < 0,05

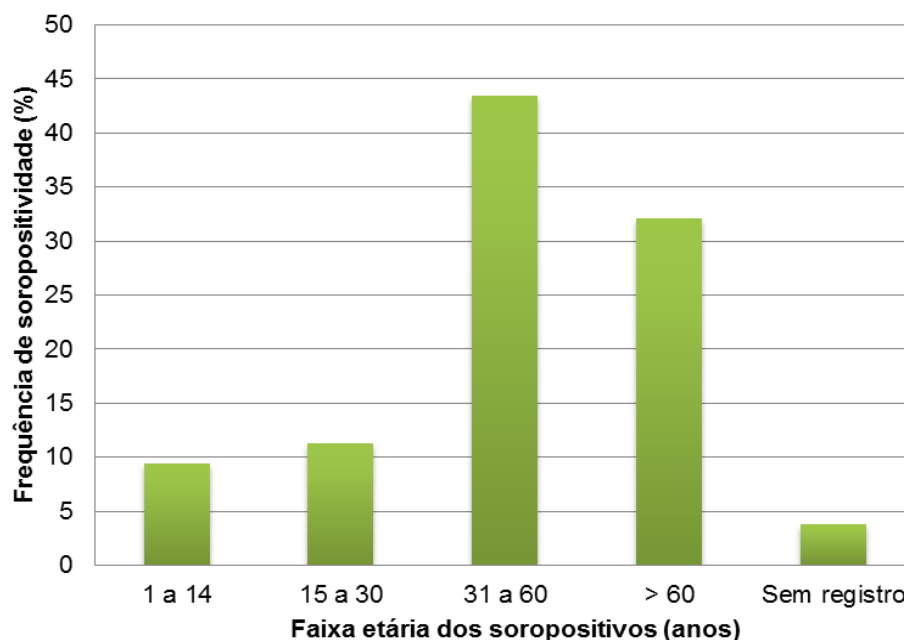
Tabela 5 – Prevalência de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* de acordo com o sexo e a idade dos moradores avaliados na área rural de Santa Teresa, ES, 2011.

Variáveis	Número de indivíduos	Prevalência de anticorpos IgG (%)	p-valor
Sexo			0,567*
Maculino	25	49	
Feminino	26	51	
Idade			0,000**
5-14 anos	5	9,4	
15-30 anos	6	11,3	
31-60 anos	23	43,4	
>60 anos	17	32,1	
Sem registro	2	3,8	-
Total	53	100	-

*p-valor < 0,200, teste Qui-quadrado

**p-valor < 0,05, teste de Mann-Whitney

Gráfico 2 – Frequência de soropositividade das faixas etárias observadas na coorte de Santa Teresa, ES, 2011.



5.4.1.2 Características comportamentais relacionadas à infecção

Na amostra estudada foram verificadas associações entre as diversas características comportamentais pesquisadas e a soroprevalência na amostra estudada. As características que atenderam ao critério estabelecido para inclusão no modelo de análise multivariada ($p < 0,2$) encontram-se destacadas na tabela 6.

Tabela 6 – Características comportamentais associadas estatisticamente à infecção pelo *Toxoplasma gondii* na região rural de Santa Teresa, ES. Relação do resultado de ELISA IgG com as variáveis categóricas.(Continua)

com as variáveis categóricas. (Continua)				
Variáveis	ELISA		p-valor	Odds ratio (OR)
	Positivo	Negativo		IC 95%
Sexo				
Masculino	25 (49,0%)	11 (56,0%)	0,567	0,755 (0,289-1,977)
Feminino	26 (51,0%)	11 (44,4%)		-
Episódio anterior de malária				
Sim	8 (15,7%)	1 (4,0%)	0,257*	4,465 (0,526-37,875)
Não	43 (84,3%)	24 (96,0%)		-

Tabela 6 – Características comportamentais associadas estatisticamente à infecção pelo *Toxoplasma gondii* na região rural de Santa Teresa, ES. Relação do resultado de ELISA IgG com as variáveis categóricas.(Continuação)

Variáveis	ELISA		p-valor	Odds ratio (OR)
	Positivo	Negativo		IC 95%
Conhecimento sobre ter ou não toxoplasmose				
Sim	2 (3,9%)	1 (4,0%)	1,000*	-
Não	49 (96,1%)	24 (96,0%)		1,021 (0,088-11,825)
Conhecimento de episódio de toxoplasmose sintomática ou congênita na família				
Sim	1 (2,0%)	2 (8,0%)	0,250*	-
Não	50 (98,0%)	23 (92,0%)		4,348 (0,375-50,420)
Atividade profissional desenvolvida				
Agrícolas	31 (60,8%)	9 (36,0%)	0,042	2,756 (1,022-7,426)
Não agrícola	20 (39,2%)	16 (64,0%)		-
Contato com animais domésticos				
Não	9 (17,6%)	7 (28,0%)	0,773**	-
Sim, com gatos	2 (3,9%)	1 (4,0%)		1,556 (0,116-20,855)
Sim, com cães	13 (25,5%)	5 (20,0%)		2,022 (0,485-8,434)
Sim, com cães e gatos	27 (52,9%)	12 (48,0%)		1,750 (0,528-5,806)
Contato com cães				
Sim	40 (78,4%)	17 (68,0%)	0,324	1,711 (0,585-5,004)
Não	11 (21,6%)	8 (32,0%)		-
Contato com gatos				
Sim	29 (56,9%)	13 (52,0%)	0,689	1,217 (0,466-3,180)
Não	22 (43,1%)	12 (48,0%)		-

Tabela 6 – Características comportamentais associadas estatisticamente à infecção pelo *Toxoplasma gondii* na região rural de Santa Teresa, ES. Relação do resultado de ELISA IgG com as variáveis categóricas.(Continuação)

Variáveis	ELISA		p-valor	Odds ratio (OR)
	Positivo	Negativo		IC 95%
Animais possuem lugar específico para defecar				
Sim	12 (30,0%)	0 (0,0%)	-	-
Não	28 (70,0%)	16 (100,0%)		
Atividades de lazer relacionadas à mata				
Sim	4 (9,3%)	7 (28,0%)	0,084*	0,264 (0,068-1,017)
Não	39 (90,7%)	18 (72,0%)		-
Atividades de lazer relacionadas à margens de rios ou córregos				
Sim	7 (16,3%)	4 (16,0%)	1,000*	1,021 (0,267-3,903)
Não	36 (83,7%)	21 (84,0%)		-
Atividades de lazer relacionadas à outros ambientes da área rural				
Sim	15 (34,9%)	8 (32,0%)	0,809	1,138 (0,399-3,248)
Não	28 (65,1%)	17 (68,0%)		-
Atividades de lazer relacionadas à contato direto com animais				
Sim	10 (23,3%)	10 (40,0%)	0,144	0,455 (0,156-1,323)
Não	33 (76,7%)	15 (60,0%)		-
Atividades de lazer relacionadas à contato direto com o solo				
Sim	15 (34,9%)	12 (48,0%)	0,286	0,580 (0,213-1,585)
Não	28 (65,1%)	13 (52,0%)		-
Atividades de lazer em que não há nenhum contato com a área rural				
Sim	11 (23,4%)	5 (20,0%)	0,741	-
Não	36 (76,6%)	20 (80,0%)		0,818 (0,249-2,690)

Tabela 6 – Características comportamentais associadas estatisticamente à infecção pelo *Toxoplasma gondii* na região rural de Santa Teresa, ES. Relação do resultado de ELISA IgG com as variáveis categóricas.(Conclusão)

Variáveis	ELISA		p-valor	Odds ratio (OR)
	Positivo	Negativo		IC 95%
Consumo de linguiças artesanais ou carne de porco				
Sim	41 (80,4%)	20 (80,0%)	1,000*	1,025 (0,309-3,401)
Não	10 (19,6%)	5 (20,0%)		-
Consumo de carne de caça atualmente				
Sim	5 (9,8%)	2 (8,0%)	1,000*	1,250 (0,225-6,942)
Não	46 (90,2%)	23 (92,0%)		-
Consumo de carne de caça no passado				
Não	43 (84,3%)	23 (92,0%)	0,277**	-
Sim, há em média 2 anos	5 (9,8%)	2 (8,0%)		1,337 (0,240-7,440)
Sim, há mais de 10 anos	3 (5,9%)	0 (0,0%)		3,782 (0,187-76,369)
Frequência de consumo de carne de porco ou de carneiro (inclusive linguiça)				
Nunca	9 (17,6%)	8 (32,0%)	0,470**	-
Todos os dias	1 (2,0%)	0 (0,0%)		2,684 (0,096-75,124)
Várias vezes por semana	2 (3,9%)	2 (8,0%)		0,889 (0,101-7,857)
Cerca de uma vez por semana	11 (21,6%)	5 (20,0%)		1,9556 (0,471-8,114)
De vez em quando	28 (54,9%)	10 (40,0%)		2,489 (0,753-8,224)
Frequência de consumo de carne/linguiça de porco ou de carneiro crua				
Nunca	37 (72,5%)	21 (84,0%)	0,387**	-
Raramente	4 (7,8%)	2 (8,0%)		1,135 (0,192-6,730)
Ocasionalmente	10 (19,6%)	2 (8,0%)		2,838 (0,567-14,196)
Avidez de IgG				
Baixa Avidéz	5 (9,6%)	0 (0,0%)	-	-
Alta Avidéz	47 (90,4%)	0 (0,0%)		-
Total	100,00%	100,00%	-	-

* Teste Exato de Fisher

** Máxima Verossimilhança

p-valor < 0,200

5.4.2 Análise multivariada de fatores de risco relacionados à toxoplasmose em área rural de Santa Teresa

Foram incluídas neste modelo as seguintes variáveis que apresentaram p-valor menor que 0,2 na etapa de análise bivariada: idade, tipo de atividades profissionais, atividades de lazer relacionadas à mata e atividades de lazer relacionadas a contato direto com animais. Observou-se uma associação positiva entre a soropositividade e a idade dos indivíduos, com OR ajustado de 1,086 (IC 95% = 1,031-1,145, p-valor = 0,002) (Tabela 07), o que significa dizer que a cada ano a mais de vida implica em um acréscimo de 8,6% no risco de estar infectado.

Tabela 7 – Análise do modelo de regressão logística *odds ratio* (OR) incluindo as variáveis estatisticamente significantes relacionadas à toxoplasmose na área rural do município de Santa Teresa, ES, 2011. (Continua)

Variáveis	Resultados da análise bivariada			Resultados da regressão		
	p-valor	OR Bruto	IC 95%	p-valor	OR ajustado	IC 95%
Atividades de lazer relacionadas à contato direto com animais	0,144			0,865		
Sim		0,455	0,156-1,323		0,89	0,232-3,413
Não		-	-		-	-
Atividades de lazer relacionadas à mata	0,084			0,12		
Sim		0,264	0,068-1,017		0,28	0,056-1,395
Não		-	-		-	-
Atividade profissional desenvolvida	0,042			0,168		
Agrícolas		2,756	1,022-7,426		0,274	0,043-1,728
Não agrícola		-	-		-	-

Tabela 7 – Análise do modelo de regressão logística *odds ratio* (OR) incluindo as variáveis estatisticamente significantes relacionadas à toxoplasmose na área rural do município de Santa Teresa, ES, 2011. (Conclusão)

Variáveis	Resultados da análise bivariada			Resultados da regressão		
	p-valor	OR Bruto	IC 95%	p-valor	OR ajustado	IC 95%
Idade	0	-	-	0,002	1,086	1,031-1,145

* Teste de Homer-Lemeshow = 0,316 – o modelo se ajustou bem aos dados
p-valor < 0,05

6. DISCUSSÃO

Ainda são escassos, em nosso país, trabalhos que contemplem as comunidades rurais e a investigação dos fatores que levam à infecção pelo *Toxoplasma gondii* em indivíduos que habitam essas regiões, principalmente quando tal infecção permanece assintomática. O presente estudo, realizado em uma área no Brasil rural, encontrou uma alta prevalência (67,1%) de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, com uma taxa de soroconversão anual de 6,2 por 100 pessoas-ano de observação. Nesse estudo, a soroprevalência aumentou com a idade e não variou entre os sexos. Os indivíduos soropositivos tiveram idade superior a dos casos negativos (medianas de 52 anos e 16 anos, respectivamente. Teste de Mann-Whitney: $p < 0,001$). Observou-se que, em relação ao trabalho de Ferreira *et al.* (2009), feito em área rural do estado do Acre, aproximadamente um terço a menos das crianças foram positivas no nosso estudo. Em Santa Teresa, a maioria da população se tornou positiva mais tarde na vida, o que é revelado pelo percentual cumulativo de positividade onde apenas 38% dos indivíduos soroconvertem até os 30 anos de idade, seguida de aumento considerável para 57,6% até os 60 anos. Diante disso, evidenciou-se uma menor taxa de soroconversão da juventude em área rural do Espírito Santo, demonstrando importante diferença entre as regiões amazônica e extra-amazônica. A variável idade, por sua magnitude, se manteve significativa no modelo multivariado, se mostrando como um fator de risco. Dentro dessa população, à medida que se envelhece um ano, o risco de se ter resultado positivo no teste de ELISA para IgG anti-*T. gondii* aumenta em 1,086 vezes (8,6%). Esse resultado já era esperado, uma vez que, segundo diversos pesquisadores (DAGUER *et al.*, 2004; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; QUITES *et al.*, 2007; ELSHEIKHA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.* 2009), o aumento da idade relaciona-se diretamente com a maior chance de adquirir a infecção pelo *T. gondii*, explicado pela maior probabilidade que o indivíduo tem em entrar em contato com os diversos fatores de transmissão ao longo dos anos. Foram encontrados, na literatura, trabalhos (QUITES *et al.*, 2007) que excluem o fator idade das análises multivariadas devido à sua forte relação com o desfecho, mas, ao ser realizado o mesmo procedimento em

relação aos dados obtidos neste estudo, não houve mudança na expressão das demais variáveis (resultados não mostrados)

Embora resultados diferentes tenham sido encontrados no estudo de Quites *et al.* (2007), em que a prevalência observada foi de 32,57%, várias características comportamentais e a taxa de soroprevalência encontradas em nosso estudo corroboram os dados obtidos em uma outra população rural brasileira, avaliada com delineamento semelhante ao nosso (FERREIRA *et al.*, 2009)(soroprevalência de 65,8%). Com o objetivo de assegurar a representatividade dos dados obtidos no acompanhamento da coorte de Santa Teresa, foi feito um acompanhamento paralelo em uma amostra menor de habitantes do município vizinho de Santa Maria de Jetibá (28 km de Santa Teresa). Foi encontrada soroprevalência igual a 61,1%, mediante a mesma técnica laboratorial.

Diferentes fatores relacionados ao estilo de vida das populações humanas estão associados ao risco da infecção pelo *T. gondii*, o que é justificado pelas diferentes formas de adquirir a infecção. Se considerarmos que a infecção pelo *T. gondii* ocorre, de acordo com o ciclo de vida desse agente etiológico, pelo consumo de alimentos contaminados com oocistos, contato direto com oocistos provenientes de fezes de gato no solo ou pela ingestão de cistos contendo bradizoítos em tecido de animais previamente infectados (CHOI *et al.*, 1997; ELSHEIKHA *et al.*, 2008; DUBEY, 2008), é curioso não haver associação entre a alta prevalência na área rural estudada e tais fatores comportamentais. Em relação ao contato com animais domésticos (gatos e cães), o contato com gatos mostrou-se bastante expressiva (53,2%), mas menor do que o contato com cães (72,2%). De acordo com Ferreira *et al.* (2009), a presença de cães na casa pode ter sido um fator de proteção em área rural do estado do Acre, considerando que esses animais são capazes de afugentar gatos e felinos selvagens, reduzindo o risco de contaminação ambiental com oocistos. Dos indivíduos que relataram ter contato com algum animal de estimação (65,8%), muitos deles (76,92%) não sabiam onde esses animais defecavam e tal fato sugere que possa haver contaminação do solo ou da água de irrigação por oocistos (no caso das fezes dos gatos). Como exercer atividades profissionais agrícolas (p-valor = 0,042) foi estatisticamente significativa na análise bivariada, é possível inferir que o contato com o

parasito, direta ou indiretamente, possa se originar aí e não exatamente pelo contato com as fezes dos felídeos. Condições favoráveis de sobrevivência de oocistos e maturação (esporogonia), na ausência de medidas eficazes de prevenção, pode contribuir para a taxa de soroprevalência elevada observada. Por outro lado, a ampla distribuição no ambiente e as múltiplas possibilidades de infecção obscureceriam as relações com fatores de exposição específicos, justificando a falta de associação estatisticamente significativa observada no presente estudo.

A contribuição da transmissão do *T. gondii* pela água para humanos nas regiões rurais do país permanece pouco estudada, embora o consumo de vegetais cultivados em horta particular (p-valor = 0,002) e a origem da água consumida para beber (p-valor = 0,02) tenham sido fortemente associados (p-valor < 0,05) com soropositividade na Amazônia rural (CAVALCANTE *et al.*, 2006). O mesmo estudo afirma ainda que a ingestão de oocistos parece ser a principal fonte de contaminação de humanos no Brasil.

Sobre os hábitos alimentares, 75,9% dos moradores admitiram o consumo de carne ou linguiça de porco ou carneiro pelo menos uma vez por semana. Porém, apenas 20,3% admitiram o hábito de ingerir esses alimentos crus, de onde se conclui ser essa via de transmissão pouco frequente na região. Essa observação contradiz os dados de Jones *et al.* (2006) que demonstram a associação desse hábito alimentar com o risco de infecção pelo parasito (OR = 2,00, p-valor = 0,01) em Erechim, interior do Rio Grande do Sul. No entanto, a tribo indígena Enawenê-Nawê, que apresenta uma das maiores taxas de soroprevalência de *T. gondii* no país (78,8%), não consome qualquer carne vermelha e não cria animais domésticos, como galinhas, para consumo próprio (SOBRAL, *et al.*, 2005), sugerindo que o consumo de carnes, cruas ou não, não tem papel significativo na transmissão da toxoplasmose no Brasil.

O consumo de carne de caça durante o estudo foi relatado por poucos indivíduos (6,3%), porém o número de confirmações aumentou (12,7%) quando foi perguntado sobre consumo desse tipo de alimento no passado (2 a 10 anos atrás e 10 ou mais anos atrás). Acreditamos que, neste ponto, houve um viés de informação porque a caça de animais silvestres é proibida no Brasil (BRASIL, 1967). Muitos indivíduos, na ocasião das visitas, demonstraram receio em responder à pergunta “Você costuma comer carne

de caça atualmente?” e, apesar de não haver estudos quantificando o consumo desse tipo de carne no país, os indivíduos relataram informalmente que essa prática é comum na região estudada. Diante disso, uma melhor abordagem para esta questão talvez tivesse sido obtida caso o questionário trouxesse perguntas referentes a “carnes exóticas”, descaracterizando o consumo proibido.

A relação entre a prevalência e os locais de habitação dos moradores não foi analisada visto que a coorte foi determinada na vigência do estudo de malária com a condição de serem avaliados indivíduos que morassem a um raio de 2 km do primeiro caso de malária registrado na área rural do município. Portanto, a pequena área de dispersão da amostra impediu uma análise espacial adequada.

Durante o acompanhamento dos indivíduos, houve três soroconversões. Dois indivíduos puderam ser avaliados em todas as coletas e o outro apenas na primeira e na última, quando a avidéz de seus anticorpos IgG já era alta. Interessantemente, na última coleta, resultados referentes à baixa avidéz de anticorpos IgG foram observados em outros dois pacientes que já se apresentavam soropositivos e com altas taxas de avidéz de IgG desde a primeira coleta. Atribuímos esse achado ao fato de que, em raros casos, há permanência de anticorpos IgG de baixa avidéz por muitos anos após o contato inicial com o parasito (KYM *et al.*, 1974).

7. CONCLUSÃO

Este estudo confirma que os habitantes de comunidades rurais da região montanhosa do Espírito Santo são altamente expostos ao *Toxoplasma gondii*, o que reflete na robusta prevalência encontrada (67,1%) e a taxa de soroconversão igualmente preocupante (6,2 por 100 pessoas-ano de observação). Nossos resultados indicam que, dentre os vários fatores investigados, apenas a idade dos indivíduos teve associação com a aquisição da infecção pelo *T. gondii* na comunidade. Apesar da ausência de significância estatística, o alto número de indivíduos infectados na região rural do município de Santa Teresa pode estar associado a hábitos ou costumes comuns aos moradores expostos aos fatores relacionados à infecção, investigados por questionário. A ampla distribuição do protozoário no ambiente e o aspecto de agregado espacial da amostra avaliada podem ter impedido a identificação de tais associações.

Os moradores da região estudada possuem pouquíssimo conhecimento sobre a toxoplasmose e como se dá a transmissão da doença, o que os torna vulneráveis a exposição frente a práticas que consideram comuns e sem risco. Sendo assim, baseando-se em estudos populacionais como o nosso e tantos outros, cabe aos gestores em saúde o planejamento e execução de ações de informação, controle e prevenção da toxoplasmose, bem como oferecer condições de diagnóstico para os já infectados, que são a maioria dos indivíduos (67,1%) na área rural do município. A semelhança dos resultados obtidos em Santa Maria de Jetibá confirma a necessidade de implantação de políticas voltadas para a saúde pública em outras áreas da região montanhosa do estado do Espírito Santo.

A complexidade da epidemiologia da toxoplasmose é inquestionável e os estudos com uma abordagem ampla, capazes de envolver os aspectos socioeconômicos, ambientais, imunológicos, genéticos dentre outros, vem sendo executados visando a esclarecer os diversos mecanismos envolvidos na transmissão e infecção pelo *T. gondii*. Este estudo, ao fornecer informações epidemiológicas sobre a infecção, fornece as bases para o estabelecimento de estratégias voltadas para a prevenção da toxoplasmose, considerada um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo.

Em síntese:

- A soroprevalência na área avaliada foi de 67,1%.
- A taxa de soroconversão foi de 6,2 por 100 pessoas-ano de observação.
- Não foi encontrada associação entre a soropositividade para anticorpos da classe IgG e fatores socioeconômicos, demográficos e comportamentais.
- A soroprevalência encontrada foi semelhante àquela observada na Região Amazônica e diferente daquela de outra região extra-Amazônica.

Contudo, ao serem comparados com os indivíduos avaliados na Região Amazônica, os participantes do presente estudo tiveram uma taxa de soroconversão menor, resultando em aumento menos acentuado da soroprevalência ao longo do tempo.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.T.et al. Toxoplasmose ocular em Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 61, p. 540-545, 1998.

AREAL, K. R.; MIRANDA, A. E. Estudo de Soroprevalência de Toxoplasmose em gestantes atendidas na rede Municipal de Saúde de Vitória, ES. **NewsLab**, ed. 87, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro: ABNT, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

BONAMETTI, A.M. et al. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 30, p. 21-25, 1997.

BRASIL, Lei nº 5.197, de 3 de janeiro de 1967. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L5197.htm >. Acesso em: 13 de fevereiro de 2013.

BUERY, J. C. **[Sem título]**, 2012. 1 fotografia

CAMARGO, M.E. Toxoplasmosis. In: FERREIRA, A.W.; AVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial da principais doenças infecciosas e auto-imunes**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001; p.165-174.

CAVALCANTE, G.T. et al. Seroprevalence of Toxoplasma gondii antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 647-649, 2006.

CDC, Centers of Diseases Control and Prevention. **Disease: Toxoplasmosis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/disease.html>> Acesso em: 09 de fevereiro de 2013.

CERQUEIRA, R.L. et al. Santo Inácio revisited: protozoan diseases in an isolated village in northeastern Brazil after twenty years. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 5, p. 736–740, 1998.

CERUTTI-JUNIOR, et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malaria Journal**, v. 6, n. 33, p. 1-12, 2007.

CHOI, W.Y. et al. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 5, p. 1280-1282, 1997.

COÊLHO, L.A.R. et al. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 4, p. 229–231, 2003.

COMMODARO, A. et al. Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, v.2, p.345-350, 2009.

COSTA, T.L. **Otimização e avaliação de métodos parasitológicos para diagnóstico da toxoplasmose em gestantes de risco e seus recém-nascidos após terapêutica específica**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2007.

DUBEY, J.P. The History of *Toxoplasma gondii* — The First 100 Years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J.P. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 4, p. 636-662, 1970.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **The Veterinary clinics of North America**, v. 17, n.6, p.1389-1404, 1987.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**. v. 126, p. 57-72, 2004.

ELSAID, M. et al. Diagnosis of human toxoplasmosis by a Dot enzyme-linked immunosorbent assay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.37, n. 2, p. 117-122, 2002.

ELSHEIKHA, H.M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Journal of the Royal Institute of Public Health**, v. 122, p. 335-353, 2008.

FERREIRA, M. U. et al. A Community-based Survey of Human Toxoplasmosis in Rural Amazonia: Seroprevalence, Seroconversion Rate, and Associated Risk Factors. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 81, n. 1, p. 171–176, 2009.

FERREIRA, W.A.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnósticos laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P. 278-288, 2001.

FRANCISCO, F.M. et al. Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in the São Paulo municipality, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 167-170, 2006.

HEDMAN, K. et al. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **The Journal of Infectious Diseases**, v.159, p.736-740, 1989.

HILL, D.; DUBEY, J.P. Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p.634–640, 2002.

IBGE. **Censo Demográfico 2010 - Resultados de amostra**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 fev. 2013.

INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. **Programa de Assistência Técnica e Extensão Rural: PROATER 2011 – 2013 (Santa Teresa, ES). Planejamento de Programa e Ações**. Governo do estado do Espírito Santo, 2011.

INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES (Vitória, ES). **Limites Administrativos – Santa Teresa, 2012**. Escala não disponível. Disponível em: http://www.ijsn.es.gov.br/Sitio/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=109. Acesso em: 07 fev. 2013.

JONES, J.L. et al. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 12, p. 582-587, 2003.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu. p. 149-156, 2002.

KHALIFA, K.E.S. et al. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2813-2819, 1994.

KIM, Y.T. et al. Distribution of antibody-binding affinity. III. Detection of low affinity antibody in the presence of high affinity antibody. **Journal of Immunology**, v. 112, p.2002-2012, 1974.

KOMPALIC-CRISTO, A. et al. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n.4, p. 229-235, 2005.

KRAVETZ, J. Congenital Toxoplasmosis. **Clinical Evidence BMJ**, v. 6, p.906, 2010.

KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantitation. **Methods of Molecular Biology**, v. 32, p. 9-15, 1994.

LAKATUS, E.M.; MARCONI, M.A. **Metodologia do Trabalho Científico**: procedimentos básicos, pesquisa bibliográfica, projeto e relatório, publicações e trabalhos científicos. 7. ed. São Paulo: Atlas, 2011.

LAPPALAINEN, M.; HEDMAN, K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, n. 1, p. 81-88, 2004.

LOWRY, O. H. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAIA, L. P. et al. Soroprevalência de toxoplasmose na região do Pontal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, p. 457-464, 2012.

MEIRELES, L. R. **Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011.

Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Investigação de casos de toxoplasmose aguda em Paraty e Angra dos Reis – Rio de Janeiro, Agosto de 2010. **Boletim Epidemiológico**, v. 43, n. 2, p. 12-16, 2012.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de bolso doenças infecciosas e parasitárias**. ed. 7, p. 404-407. Brasília, 2008.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.

PAPPAS, G. et al. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal of Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385-1394, 2009.

QUITES, H.F.O. **Fatores associados à infecção com *Toxoplasma gondii* em comunidade rural do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

REY, L.C.; RAMALHO, L.C. Seroprevalence of Toxoplasmosis in Fortaleza. Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41 n. 3, p.171-174, 1999.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Review**, n. 25, p. 264-296, 2012.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of American Medical Association**, v. 116, p.801–807, 1941.

TENTER, A.M. et al. Toxoplasma gondii: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p.1217-1258.

VIEGAS, C.L. et al. Toxoplasmose com comprometimento pulmonar. **Jornal de Pneumologia**. v. 28, n.4, p. 241-243, 2002.

VOLLER, A. et al. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, n. 6, p. 507–520, 1978.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento pós-informação para acompanhamento da coorte de novos moradores possíveis portadores de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

1) Objetivos do Estudo:

Você reside em uma área em que ocorrem casos de malária, uma doença infecciosa parasitária transmitida por mosquitos e que causa destruição dos glóbulos vermelhos do sangue, manifestando-se por febre, calafrios e outros sintomas. Apesar de ser muito comum na Região Amazônica, recentemente têm sido observados casos relacionados a áreas de mata Atlântica em localidades montanhosas de vários estados. Pouco se sabe a respeito destes casos.

A partir de um estudo sobre malária, foi observada a presença de outro tipo de doença. Diversos pacientes com quadro de febre e calafrios, suspeitos de serem portadores de malária, tiveram diagnóstico de toxoplasmose adquirida, uma infecção causada pelo parasita *Toxoplasma gondii*, que é encontrado tanto no sangue quanto em tecidos no corpo humano causando alterações importantes quando causa infecção sintomática. A transmissão em sua região não é muito comum e está portanto provavelmente relacionada aos hábitos alimentares da população, que incluem a ingestão de carne de porco, inclusive de linguiça artesanal sem cozimento.

Muitas vezes a infecção não apresenta sintomas, sendo então essa pesquisa uma ferramenta de investigação importante para diagnosticar os portadores.

2) Termo de Consentimento:

Por terem sinais e sintomas em comum, a malária e a toxoplasmose são muitas vezes doenças diferenciadas apenas no laboratório. Por se conhecer pouco sobre as características da toxoplasmose em sua região, o presente estudo visa esclarecer os modos de transmissão e detectar os casos silenciosos .

O presente termo de consentimento traz informações sobre este estudo que serão discutidas com você agora e em outras ocasiões ao longo do mesmo. Se você concordar em participar, pediremos que assine o presente termo. Você receberá uma cópia deste termo para guardar.

Se você concordar em participar do estudo, faremos uma série de perguntas sobre seus dados pessoais. Por fim, colheremos cerca de uma colher de sobremesa de seu sangue para pesquisar a presença de anticorpos contra o parasito. Qualquer que seja o resultado, para determinar o comportamento do fenômeno ao longo do tempo, serão necessárias coletas periódicas de seu sangue, ou seja, uma vez a cada três meses.

Para completar o tempo necessário de avaliação, será necessário que você nos autorize a realizar exames para toxoplasmose também no sangue que já coletamos de você, por causa da pesquisa sobre malária, em março (para a coorte de Santa Teresa).

3) Benefícios e Riscos: Caso você decida participar do estudo, não haverá benefícios diretos para você, mas você estará contribuindo para uma melhor compreensão da transmissão da toxoplasmose no Espírito Santo e sobre possíveis estratégias para o seu controle.

O risco de sua participação no estudo é dor e possível formação de um hematoma no local da coleta do sangue.

4) Procedimentos Alternativos:

Sua participação no estudo é voluntária, ou seja, não haverá nenhum tipo de remuneração pela sua participação e também nenhum gasto de sua parte. Você é livre para recusar-se a participar e isso não resultará em perdas para você ou na impossibilidade de você vir a participar de outros estudos no futuro. Além disso, caso decida participar, você pode retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

5) Precauções:

A coleta de seu sangue será feita utilizando-se material descartável.

6) Razões para Exclusão do Estudo sem o seu Consentimento:

Não existem razões para que você seja excluído do estudo sem o seu consentimento.

7) Confidencialidade: As informações obtidas de você são de natureza confidencial e não serão divulgadas. Apenas os investigadores envolvidos no estudo, os membros do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, as autoridades da Secretaria Estadual de Saúde e do Ministério da Saúde terão acesso às informações obtidas de você.

O sangue que será coletado de você, será identificado de forma a proteger a confidencialidade das informações, de acordo com a lei brasileira.

8) Problemas ou Perguntas:

Caso você tenha qualquer dúvida sobre os objetivos do estudo e sobre sua participação no mesmo, você poderá perguntar agora ou em qualquer momento que julgar necessário. Você poderá dirigir-se ao Dr. Crispim Cerutti Junior (tel.: 3335-7225 ou 9941-3195) ou a mestrande Julyana Cerqueira Buery (tel.: 9945-0405) ou a qualquer membro da equipe de investigação. Caso seja necessário, você poderá procurar o Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Espírito Santo com endereço na Avenida Maruípe, Campus Maruípe, Prédio Básico (3º andar – Setor de Parasitologia). Bairro Maruípe, Vitória - ES.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante do estudo, você poderá dirigir-se ao Dr. Adauto Emmerich, presidente do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFES (tel.3335-7210).

9) Declaração de Consentimento:

Eu compreendo o objetivo deste estudo e o que devo fazer para participar do mesmo. Também compreendo quais são os riscos e os benefícios para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Nome do voluntário

Assinatura do voluntário

Data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

Data

Declaração do Investigador:

Expliquei o objetivo do estudo ao voluntário. Tenho pleno conhecimento de que ele/ela entendeu o objetivo, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo.

Nome do investigador

Assinatura do investigador

Data

ANEXO B – Questionário estruturado sobre a prevalência e duração do estado de portador de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em coorte de moradores do município de Santa Teresa (geograficamente relacionados ao local de ocorrência de um caso de malária autóctone) e de Santa Maria de Jetibá.

Nome:

Iniciais:

Gênero:

Idade:

Profissão:

Qual seu estado civil?

() Casado () Solteiro () Divorciado(a)/separado(a)

() Outros _____

Possui filhos?

() Sim () Não Se sim, quantos? _____

Local de Moradia:

Tempo de moradia no local atual (em meses):

Moradias anteriores:

Local:

Período (mês e ano):de / a /

Local:

Período (mês e ano):de / a /

Local:

Período (mês e ano):de / a /

Local:

Período (mês e ano):de / a /

Local:

Período (mês e ano):de / a /

Teve episódio anterior de malária?

() Sim () Não

Você tem conhecimento sobre ter ou não toxoplasmose?

() Sim () Não

Se sim, há quanto tempo? _____

Tem conhecimento de episódio de toxoplasmose sintomática ou de toxoplasmose congênita em sua família?

() Sim () Não

Se sim, qual o grau de parentesco com você? _____

Atividades Profissionais:

() Agrícolas () Não agrícolas, mas relacionadas ao meio rural

() Não agrícolas e não relacionadas ao meio rural

Possui contato com animais domésticos, principalmente gatos?

() Sim () Não

Quais animais? _____

Se sim, os animais possuem lugar específico para defecar, como caixas de areia ou similares?

() Sim () Não Se SIM, quem limpa esse local? _____

Se NÃO, qual o destino dessas fezes?

Atividades de lazer:

☐ Relacionadas à mata ☐ Relacionadas à margem de rios ☐ Relacionadas a outros ambientes da área rural ☐ Não relacionadas ao ambiente rural ☐ Atividades com contato direto com animais ☐ Atividades em contato direto com o solo (terra)

Estão incluídos em sua dieta alimentos como linguiças artesanais ou de carne de porco?

☐ Sim ☐ Não

Você costuma comer carne de caça?

☐ Sim ☐ Não

Se sim, qual foi a última vez em que você comeu e qual o tipo?

Data aproximada:

Com que frequência você come carne de porco ou de carneiro (inclusive linguiça)?

☐ Todos os dias ☐ Várias vezes por semana

☐ Cerca de uma vez por semana

☐ Só de vez em quando.

Você costuma comer linguiça de porco ou de carneiro crua?

☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Ocasionalmente

☐ Frequentemente.

Fez PCR?

☐ Sim ☐ Não

☐ Toxoplasmose ☐ Malária

Resultado: _____

OBS: Anotar o tamanho do baço em cada coleta.