

COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-TOXOPLASMA GONDII EM EXSUDATO CÁRNEO (MEAT JUICE)

Júlia Roriz de Oliveira

Dra. Daniela Pontes Chiebao

Laboratório de Doenças Parasitárias - FMVZ/USP

juliarorizoliveira96@gmail.com

Objetivos

Toxoplasma gondii é um dos parasitas mais estudados devido a sua importância médica e veterinária. A disseminação de *T. gondii* ocorre através da transmissão transplacentária por taquizoítas, através da ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos esporulados e pela ingestão de tecidos animais contendo cistos infectantes, sendo importante via de transmissão para humanos a ingestão de carnes cruas ou malcozidas contaminadas. A detecção de anticorpos contra este protozoário tem sido feita através da análise de exsudato cárneo em monitoramentos epidemiológicos na Europa (Ranucci *et al.*, 2012), porém a eficácia dessa matriz utilizando os métodos sorológicos disponíveis no Brasil também precisa ser validada adequadamente. O objetivo deste projeto foi avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de exsudato cárneo de bovinos e suínos obtidos do comércio varejista no município de São Paulo, comparando dois testes diagnósticos, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste de aglutinação modificada (MAT).

Métodos e Procedimentos

O cálculo da amostragem para determinação de ocorrência foi realizado utilizando os valores de prevalência 12,3% e 2,6% de *T. gondii* em carnes de suínos e bovinos, respectivamente, observados na revisão sistemática de Belluco *et al.* (2018), com margem de erro de 5% e nível de significância de 95%, obtendo-se valores de 39 amostras de bovinos e 166 de suínos para análise.

Amostras de carne bovina e suína mantidas refrigeradas foram adquiridas de diferentes pontos de venda varejistas, como açougues e

feiras livres, no município de São Paulo, SP. O exsudato cárneo acumulado nas embalagens de cada amostra (Hamilton *et al.*, 2015) foi pipetado com pipeta Pasteur descartável, armazenado em microtubos, identificado, centrifugado a 12.000rpm/15min e estocado em freezer a -20°C para posteriores análises.

As amostras foram analisadas pela técnica de RIFI, segundo protocolo de Camargo (1974), sendo considerados reagentes os taquizoítas que apresentam fluorescência periférica total. A pesquisa de anticorpos de anti-*T. gondii* através da MAT foi realizada segundo Dubey, Desmonts (1987). A formação de um botão com contorno definido na base do poço foi considerada como resultado não reagente.

Resultados

Foram coletadas 57 amostras de bovinos e 98 de suínos do mercado varejista de São Paulo. As 166 amostras de carne de suínos previstas no cálculo de amostragem foram obtidas, porém, não houve formação de meat juice, e, portanto, a amostragem de meat juice de suínos testados para *T. gondii* foi menor que o previsto.

Após teste de sensibilidade e especificidade em amostras de meat juice de suínos e bovinos experimentalmente infectados com *T. gondii* (Clemes, 2022) foram estabelecidos os pontos de corte de 1:16 e 1:8, respectivamente, para técnica de RIFI. No teste de sensibilidade e especificidade através da MAT (Clemes, 2022) foi estabelecido o ponto de corte de 1:5 para ambas espécies.

Dentre as noventa e oito amostras de suínos analisadas, três resultaram reagentes na técnica de RIFI (título $\geq$ 16), com prevalência de 3% [95% IC (0,4-6,4)], e uma resultou reagente

das 16 analisadas na técnica de MAT (título $\geq$ 5), prevalência de 6,25% [95% IC (0-19,3)], indicando existência de meat juice com a presença de anticorpos anti-*T. gondii*.

Com relação à cinquenta e sete amostras de meat juice bovinos analisadas, sete resultaram reagentes (título $\geq$ 8), prevalência de 12,28% [95% IC (3,2-20,8)] na técnica de RIFI. No MAT, de 12 análises, obteve-se uma amostra reagente (título $\geq$ 5), prevalência de 8,33% [95% IC (0-26,3)], indicando existência de meat juice com a presença de anticorpos anti-*T. gondii*.

Foi possível observar que nenhuma das amostras analisadas neste estudo positivas na técnica de RIFI apresentaram resultado positivo para MAT. Foi realizado o teste de correlação de ϕ (ϕ) para verificar associação entre os dois métodos analíticos, porém não houve significância observada para suínos ($p=0,30$) ou para bovinos ($p=0,35$), provavelmente pelo baixo número de amostras analisadas pela técnica do MAT. Foi avaliado que os resultados reagentes de cada tipo de carne não apresentavam diferença significativa independente da análise, RIFI ou MAT, através do Teste Z de proporções entre duas populações, sendo $p>0,05$.

Normalmente são encontradas maiores taxas de soroprevalência na carne de suínos infectados por *T. gondii* comparando-a com às demais (Pereira *et al.*, 2020), entretanto, no presente estudo verificou-se maior prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos (gráfico 1).

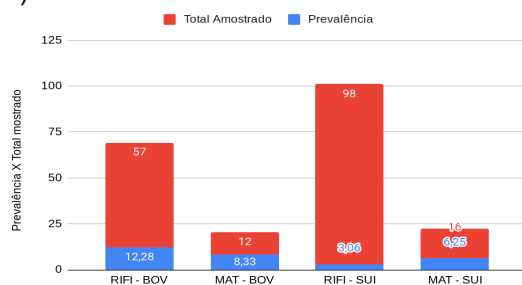


Figura 1 - Comparação das técnicas RIFI e MAT para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em meat juice bovino (BOV) e suíno (SUI), 2022

Conclusões

O meat juice é uma matriz imunológica viável para a pesquisa epidemiológica e na avaliação do risco de infecção de *T. gondii*, porém ainda pouco explorada.

Não foi possível obter correlação entre os testes diagnósticos com o número de amostras analisadas, porém ambas as técnicas possuem sensibilidade para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, com resultados de prevalência dentro do mesmo intervalo de confiança. Ainda, é possível observar que há evidências de risco alimentar de toxoplasmose para o consumidor no mercado varejista de carnes da cidade de São Paulo.

Referências Bibliográficas

BELLUCO, S.; MANCIN, M.; CONFICONI, D.; SIMONATO, G.; PIETROBELLI, M.; RICCI, A. Investigating the determinants of *Toxoplasma gondii* prevalence in meat: A systematic review and meta-regression, **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 10, p. 143-169, 1974.

CLEMES, Y.S. Refinamento do processo de maturação úmida para inviabilização de cistos de *Toxoplasma gondii* em lombos de suínos experimentalmente infectados. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2022.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, p. 337-339, 1987.

HAMILTON, C. M.; KELLY, P. J.; BARTLEY, P. M.; BURRELLS, A.; PORCO, A.; METZLER, D.; CROUCH, K.; KETZIS, J. K.; INNES, E. A.; KATZER, F. *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1-9, 2015.

PEREIRA, D. C.; DUBEY, J. P.; MATA, A.; NETO, H.; CARDOSO, L.; LOPES, A. P. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in domestic cattle, sheep, goats and pigs from São Tomé and Príncipe. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 1, 2020.

RANUCCI, D.; VERONESI, F.; BRANCIARI, R.; MIRAGLIA, D.; MORETTA, I.; FIORETTI, P. D. Evaluation of an immunofluorescence antibody assay for the detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in meat juice samples from finishing pigs. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.9, p.75-78, 2012.

COMPARISON OF TECHNIQUES FOR DETECTION OF ANTIBODIES ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* IN MEAT JUICE

Júlia Roriz de Oliveira

Dra. Daniela Pontes Chiebao

Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science

juliarorizoliveira96@gmail.com

Objectives

Toxoplasma gondii is one of the most studied parasites due to its medical and veterinary importance. It is estimated that 30% of the human population has had contact with this zoonotic pathogen. The dissemination of *T. gondii* is caused by transplacental transmission through tachyzoites, through the ingestion of food and water contaminated with sporulated oocysts and through the ingestion of animal tissues containing infective cysts, including the important route of transmission to humans after the ingestion of raw or undercooked contaminated meat. The detection of antibodies against this parasite has been achieved by the analysis of meat exudate in epidemiological monitoring in Europe (Ranucci *et al.*, 2012), but the effectiveness of this matrix using the serological methods available in Brazil also requires adequate validation. The aim of this project was to evaluate the occurrence of anti-*T. gondii* in samples of meat exudate from cattle and swine obtained from the market in the city of São Paulo, comparing two diagnostic tests, the indirect immunofluorescence test (IFAT) and the modified agglutination test (MAT).

Materials and Methods

The sampling calculation to determine the occurrence was performed using the prevalence values 12.3% and 2.6% of *T. gondii* in swine and cattle, respectively, retrieved from the systematic review by Belluco *et al.* (2018), with error margin of 5% and significance level of 95%, obtaining values from 39 bovine and 166 swine samples for analysis. Refrigerated samples of beef and pork were acquired from different retail outlets, such as

butchers and street markets, in the city of São Paulo. The meat exudate accumulated in the packages of each sample (Hamilton *et al.*, 2015) was pipetted with a Pasteur pipette, stored in microtubes, centrifuged at 12,000rpm/15min and frozen at -20°C for further analysis.

The samples analyzed through the IFAT technique followed the protocol defined by Camargo (1974), being considered reagents when tachyzoites presented total peripheral fluorescence.

The research of antibodies anti-*T. gondii* through MAT was performed according to Dubey, Desmonts (1987). The formation of a button with a defined contour at the base of the well was considered a non reagent result.

Results

Fifty-seven samples of cattle and 98 samples of swine meat juice were collected from the retail market in São Paulo. The 166 samples of swine meat predicted in the sampling calculation were obtained, however, there was no formation of meat exudate, and therefore the number of meat juice from swine tested for *T. gondii* was lower than expected.

After testing the sensitivity and specificity of meat juice samples from swine and cattle experimentally infected with *T. gondii* (Clemes, 2022), cut-off points of 1:16 and 1:8, respectively, were established for the IFAT technique. From the sensitivity and specificity test using MAT (Clemes, 2022), cut-off points of 1:5 were established for both species.

Among the ninety-eight swine samples analyzed, three were reactive in the IFAT technique (title $\geq$ 16), with a prevalence of 3%

[95% CI (0.4-6.4)], and one was reactive out of the 16 analyzed. in the MAT technique (title $\geq$ 5), with prevalence of 6.25% [95% CI (0-19.3)], indicating the existence of meat juice with the presence of anti-*T. gondii*.

Regarding the fifty-seven samples of meat juice from cattle analyzed, seven were reactive (title $\geq$ 8), with a prevalence of 12.28% [95% CI (3.2-20.8)] in the IFAT technique. Using MAT in 12 analyses, a reagent sample was obtained (title $\geq$ 5), with prevalence of 8.33% [95% CI (0-26.3)], also indicating the existence of meat juice with the presence of anti-*T. gondii*.

It was possible to observe that none of the samples analyzed in this study that were positive in the IFAT technique presented a positive result for MAT. The phi correlation test (ϕ) was performed to verify the association between the two analytical methods, but there was no observed significance for swine ($p=0.30$) or cattle ($p=0.35$), probably due to the low number of samples analyzed by the MAT technique. However, it was evaluated that the reagent results of each type of meat did not present significant difference independent of the analysis, IFAT or MAT, using the Z Test of proportions between two populations which resulted as $p>0.05$.

Meat from pigs infected with *T. gondii* has a high parasite load of tissue cysts (Dubey, 2010), and higher seroprevalence rates are usually found in this species when compared to the others (Pereira *et al.*, 2020; Belluco *et al.*, 2016) but, in the present study there was a higher prevalence of anti-*T. gondii* in bovine species (Figure 1).

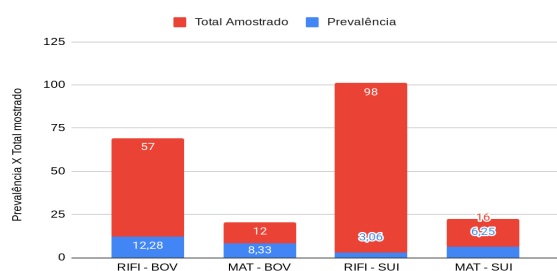


Figure 1 - Comparison of RIFI and MAT techniques to detect antibodies anti-*T. gondii* in meat juice from bovine (BOV) and swine (SUI), 2022

Conclusions

The meat juice is a viable option as immunological matrix for epidemiological

research and for assessing the risk of *T. gondii* infection, although little explored.

It was not possible to obtain a correlation between the diagnostic tests and the number of samples, but both techniques are sensitive for the detection of anti-*T. gondii*, with prevalence results within the same confidence interval. Yet it could be observed that there is evidence of foodborne toxoplasmosis for the consumer in the meat market of the city of São Paulo.

References

- BELLUCO, S.; MANCIN, M.; CONFICONI, D.; SIMONATO, G.; PIETROBELLI, M.; RICCI, A. Investigating the determinants of *Toxoplasma gondii* prevalence in meat: A systematic review and meta-regression, **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.
- CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 10, p. 143-169, 1974.
- CLEMES, Y.S. **Refinamento do processo de maturação úmida para inviabilização de cistos de *Toxoplasma gondii* em lombos de suínos experimentalmente infectados.** Dissertação (Mestrado), FMVZ da Universidade de São Paulo, 2022.
- DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, p. 337-339, 1987.
- HAMILTON, C. M.; KELLY, P. J.; BARTLEY, P. M.; BURRELLS, A.; PORCO, A.; METZLER, D.; CROUCH, K.; KETZIS, J. K.; INNES, E. A.; KATZER, F. *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1-9, 2015.
- PEREIRA, D. C.; DUBEY, J. P.; MATA, A.; NETO, H.; CARDOSO, L.; LOPES, A. P. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in domestic cattle, sheep, goats and pigs from São Tomé and Príncipe. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 1, 2020.
- RANUCCI, D.; VERONESI, F.; BRANCIARI, R.; MIRAGLIA, D.; MORETTA, I.; FIORETTI, P. D. Evaluation of an immunofluorescence antibody assay for the detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in meat juice samples from finishing pigs. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.9, p.75-78, 2012.