



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Avaliação do grau de exposição do ser humano ao agente zoonótico *Toxoplasma gondii*

Ana Rita Pinheiro Torres da Silva

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor Miguel Castelo Branco
Co-orientador: Dr. Hugo Brancal

Covilhã, maio de 2016

Dedicatória

Aos meus pais,
pelo amor e atenção,
mesmo a 2000 quilômetros de distância.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Castelo Branco, pelo interesse e profissionalismo sempre demonstrado.

Ao meu co-orientador, Doutor Hugo Brancal, pela disponibilidade, pelo entusiasmo e pela confiança depositada permanentemente.

À Professora Doutora Ana Patrícia Lopes, pelo precioso contributo.

Ao Departamento de Ciências Veterinárias, da Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias, pertencente à Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, pela realização dos testes de aglutinação modificados.

Ao Doutor Luís Taborda, pela simpatia constante.

À Doutora Marisa Santos Silva, pela paciência e partilha de conhecimentos.

Aos 229 participantes corajosos, que aceitaram integrar esta investigação.

À Faculdade de Ciências da Saúde, pela formação de excelência providenciada.

Aos meus pais, pela perseverança da luta por uma vida melhor.

Aos meus irmãos, pelo apoio incondicional.

Ao meu namorado, Pedro, pelos sorrisos inesperados.

À Camila, ao Duarte e à Rita, pelas gargalhadas e pelos choros incontrolláveis.

À C'a Tuna aos Saltos, Tuna Médica Feminina da UBI, pelo crescimento pessoal exponencial.

Resumo

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, sendo responsável por uma importante zoonose mundial, a toxoplasmose.

As principais vias de transmissão são a horizontal, através da ingestão de quistos tecidulares presentes na carne crua ou malpassada, ingestão de oocistos esporulados na água, e nas frutas e vegetais crus ou mal lavados; e a transmissão vertical, por via placentária.

Em Portugal, foram reportadas elevadas prevalências em indivíduos com idade superior a 45 anos, revelando uma exposição cumulativa com a idade, e em residentes na região norte (70%), em relação ao sul (35%).

Este estudo tem como principal objetivo determinar a seroprevalência de infeção por *T. gondii* na região Cova da Beira, bem como a existência de potenciais fatores de risco para a infeção, tendo sido analisados para o efeito as seguintes variáveis: meio (rural ou urbano), contato com animais e tipo de alimentação (consumo de carne crua ou malpassada).

As amostras de soro de 229 indivíduos, residentes na Cova da Beira, foram analisadas para anticorpos contra *T. gondii*, com o teste de aglutinação modificado (modified agglutination test - MAT). Foi entregue a todos os participantes um inquérito que recolhia as seguintes informações: sexo, idade, concelho, freguesia, meio (rural ou urbano), convivência com gatos e consumo de carne crua ou malpassada.

Os resultados evidenciaram uma seropositividade de cerca de 56,3%, contudo não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre a seroprevalência encontrada e as variáveis consideradas. Ainda assim, dentro da amostra, foi comprovado um maior número de infetados nos grupos etários mais avançados, sugerindo uma exposição cumulativa a *T. gondii* com a idade (nos 129 resultados positivos, a média de idades foi 65,02 anos). Dentro do género, foi observada uma maior frequência da infeção em homens (65,3% dos resultados positivos pertenciam a indivíduos do sexo masculino) podendo este valor evidenciar um risco aumentado de seropositividade associado a atividades laborais tipicamente consideradas masculinas.

Palavras-chave

Infeciologia; *Toxoplasma gondii*; Prevalência; Fatores de risco; Cova da Beira; MAT

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that belongs to the Apicomplexa phylum, accounting for an important global zoonosis, toxoplasmosis.

The main routes of transmission are horizontal, through the ingestion of tissue cysts present in raw or undercooked meat, ingestion of sporulated oocysts in water, and raw or unwashed fruits and vegetables; and vertical transmission, by placental route.

In Portugal, high prevalences were reported in individuals older than 45 years, revealing a cumulative exposure with age, and in residents of the north region of the country (70%), when compared with the south (35%).

This study aimed to determine the seroprevalence of *T. gondii* infection in the Cova da Beira region and the existence of potential risk factors for infection, having been analyzed, for this purpose, the following variables: environment (rural or urban), contact with animals and type of food (raw/undercooked meat consumption).

Serum samples from 229 individuals, living in the Cova da Beira, were analyzed for antibodies against *T. gondii*, with the modified agglutination test (MAT). It was delivered to all participants a survey that collected the following information: gender, age, county, parish, environment (rural or urban), having one or more cats (as pets), living with cats and consumption of raw meat or undercooked.

The results showed a seropositivity of 56.3%, but there was not a statistically significant relationship between the prevalence found and the variables considered. Still, in the sample, it was demonstrated a higher number of infected in older age groups, suggesting a cumulative exposure to *T. gondii* with age (the mean age in the positive results was 65,02 years). Within the gender, a higher frequency of infection was observed in men (65.3% of positive results were from males); this value may show an increased risk of seropositivity associated with work activities typically considered male.

Keywords

Infectiology; *Toxoplasma gondii*; Prevalence; Risk factors; Cova da Beira; MAT

Índice

Lista de Gráficos	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
Introdução.....	1
Objetivos	2
Materiais e Métodos	3
Metodologia estatística	4
Resultados.....	5
Estatística descritiva	5
Estatística indutiva	9
Discussão	15
Limitações do estudo.....	15
Análise dos resultados.....	16
Conclusão	19
Referências bibliográficas.....	20
Anexos	22
Anexo I.....	22
Anexo II	23
Anexo III	25

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Tipo de meio

Gráfico 2. Presença de gatos no domicílio

Gráfico 3. Convivência com gatos

Gráfico 4. Consumo de carne crua/malpassada

Gráfico 5. Seroprevalência de infecção por *Toxoplasma gondii*

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição da amostra de acordo com o sexo

Tabela 2. Distribuição da amostra por idade

Tabela 3. Distribuição da amostra por concelho

Tabela 4. Tabela de contingência: tipo de meio/resultados obtidos no MAT

Tabela 5. Tabela de contingência: presença de gatos no domicílio/resultados obtidos no MAT

Tabela 6. Tabela de contingência: convivência com gatos/resultados obtidos no MAT

Tabela 7. Tabela de contingência: consumo de carne crua ou malpassada/ resultados obtidos no MAT

Tabela 8. Média de idades dos grupos de resultados do MAT para anticorpos contra *T. gondii*

Tabela 9. Tabela de contingência: sexo/resultados obtidos no MAT

Lista de abreviaturas

CHCB	Centro Hospitalar Cova da Beira
ECAV	Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias
UTAD	Universidade de Trás os Montes e Alto Douro
PRODER	Plano de Desenvolvimento Rural
MAT	Teste de aglutinação modificado
IC	Intervalo de confiança
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

Introdução

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, sendo responsável por uma importante zoonose mundial, a toxoplasmose. Este protozoário foi isolado pela primeira vez por Nicolle e Manceaux, em 1908, na Tunísia [1].

As principais vias de transmissão são a horizontal, através da ingestão de quistos tecidulares presentes na carne crua ou malpassada, ingestão de oócistos esporulados na água e nas frutas e vegetais crus mal lavados; e a transmissão vertical, por via placentária [2]. Outras formas de transmissão menos comuns incluem transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e a ingestão de leite ou queijo não pasteurizados [3].

O hospedeiro definitivo, felídeos domésticos e silváticos, excreta oócistos nas fezes, contaminando a água e o solo. Depois da ingestão de oócistos esporulados pelos hospedeiros intermediários, incluindo o homem, os esporozoítos são libertados e penetram no epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítos (forma de multiplicação rápida, encontrada durante a infecção aguda) [4]. Posteriormente, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, no interior de quistos tecidulares, sendo responsáveis pela infecção crónica. Os quistos localizam-se sobretudo no cérebro e músculos cardíaco e esquelético [5]. Este estadio de desenvolvimento produz uma resposta imunitária inferior àquela provocada pelo taquizoíto, mantendo, no entanto, em situações de imunossupressão, a capacidade de conversão em taquizoíto, desencadeando uma reativação da infecção e manifestações clínicas [6].

A infecção no adulto saudável é geralmente assintomática, ou semelhante a uma síndrome gripal (febre, fadiga, mialgia e linfadenopatias) [7]. Pelo contrário, em pacientes imunossuprimidos e nos fetos em desenvolvimento, a infecção por *T. gondii* pode ser fatal.

A infecção por *T. gondii* apresenta uma distribuição mundial, com valores de seroprevalência que variam entre 10% e 90% [8]. A prevalência de infecção varia fortemente com a idade, sendo que, na Europa Central, aumenta, linearmente, 1% a cada ano de vida [9]. Em Portugal, foram reportadas elevadas prevalências em indivíduos com idade superior a 45 anos, revelando uma exposição cumulativa com a idade, e em residentes na região norte (70%), em relação ao sul (35%) [10]. Mais recentemente, Lopes et al. [11] indicaram um valor de seropositividade de 24,4% em mulheres em idade fértil do norte do país.

Muitos estudos realizados, principalmente no interior do Brasil, indicam uma maior seroprevalência de *T. gondii* e de toxoplasmose ocular em áreas rurais. Este fato é justificado pelo maior consumo de carne crua, pela prática mais frequente de agricultura, jardinagem e pecuária, e pelo elevado número de indivíduos que possui animais domésticos, incluindo gatos [12]. Porém, longe vão os tempos em que os gatos eram considerados um perigo para a Saúde Pública no que concerne à infecção por *T. gondii*. Uma transmissão por contacto direto com gatos infetados é inverosímil visto que em nenhum caso foi possível identificar agentes patogéneos com capacidade infecciosa em secreções nasais, saliva ou urina de gatos infetados

[13]. Além disso, acariciar gatos aparenta ser uma forma altamente improvável de transmissão, visto não terem sido detetados oócistos na pelagem de gatos, que estejam a excretá-los [14].

Objetivos

Este estudo tem como principal objetivo determinar a seroprevalência de infecção por *T. gondii* na região Cova da Beira, bem como a existência de potenciais fatores de risco para a infecção, tendo sido analisados para o efeito as seguintes variáveis: meio (rural ou urbano), contato com animais e tipo de alimentação.

Daí resultaram as seguintes hipóteses:

Hipótese 1. O risco de seropositividade para *T. gondii* aumenta em indivíduos que residem em meio rural, quando comparado com os que vivem em meio urbano.

Hipótese 2. O risco de seropositividade para *T. gondii* aumenta em indivíduos que possuem ou convivem com gatos, quando comparado com os que não têm qualquer tipo de contato.

Hipótese 3. O risco de seropositividade para *T. gondii* aumenta em indivíduos que ingerem carne crua ou malpassada, quando comparado com os que não o fazem.

Materiais e Métodos

O presente estudo foi realizado no Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB), que serve a população dos concelhos de Belmonte, Covilhã, Fundão que no seu conjunto perfazem um total de 87869 habitantes [15]. O grupo de estudo foi constituído por utentes que se dirigiram ao Serviço de Sangue do CHCB, para realizar análises laboratoriais, nos dias 11, 15, 17, 18, 22, 23, 24, 25 e 29 de setembro e 1 e 10 de outubro. Como resultado, foram incluídos 229 indivíduos no estudo, que satisfaziam os critérios de inclusão: residência fixa na região da Cova da Beira e realização de análises laboratoriais nos dias acima mencionados.

Para que fosse obtido um intervalo de confiança (IC) de pelo menos 90%, a amostra teria de ter sido constituída por 269 indivíduos, contudo, devido a limitações do estudo, apenas foi possível uma amostra de 229 participantes.

Este estudo foi devidamente apresentado na Comissão de Ética do CHCB, tendo sido aprovado a realização do mesmo a 24 de julho de 2015 (Anexo I).

A apresentação e explicação da investigação e a disponibilização do consentimento informado (Anexo II) a cada um dos participantes foi feita e só após a sua leitura e devida autorização, foi distribuído um inquérito (Anexo III). De seguida, procedeu-se à recolha de uma amostra de cerca de 1 mL de sangue de cada paciente, aquando da realização da recolha de amostras de sangue para as análises laboratoriais que os tinham trazido ao hospital nesse dia. As amostras foram centrifugadas e de seguida conservadas a uma temperatura de -20°C, para posterior transporte para o laboratório do Departamento de Ciências Veterinárias, inserido na Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias (ECAV), da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro (UTAD).

O inquérito realizado recolhia as seguintes informações: sexo idade, concelho, freguesia, meio (rural ou urbano), presença de gatos no domicílio, convivência com gatos e consumo de carne crua ou malpassada. A classificação do meio em rural e urbano foi baseada na classificação de freguesias utilizada pelo Plano de Desenvolvimento Rural (PRODER).

As amostras de soro foram analisadas para anticorpos para *T. gondii*, com o teste de aglutinação modificado (MAT), usando um teste comercial de microaglutinação direta (Tox-Screen DA[®], bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Tal como recomendado pelo fabricante, todos os soros foram testados para uma diluição de 1:40, usando o taquizoítos como antigénio. De modo a descartar possíveis fenómenos de pré-zona, os soros negativos para 1:40, foram testados na diluição de 1:4000. É de realçar que este teste apenas deteta as imunoglobulinas G desenvolvidas pelo sistema imunitário do portador em resposta a esta infeção parasitária, que por norma só aparecem no soro quatro semanas após a infeção primária [13]. Os soros positivos para qualquer uma das diluições foram classificados como positivos. A sensibilidade do MAT é de 96,22% (intervalo de confiança a 95%: 94,55-97,39%) e a especificidade é de 98,80% (IC 95%: 96,46-99,60%).

Metodologia estatística

Para além da análise descritiva, foram estudadas as relações entre as variáveis consideradas neste estudo, para a amostra, utilizando tabelas de contingência. A estas tabelas foram aplicados o teste T-Student e o teste exato de Fisher (quando mais de 20% dos valores das frequências esperadas eram inferiores a 5) para determinar o respetivo nível de significância. Utilizou-se na análise estatística o software SPSS 21, com um valor de probabilidade (p) < 0.05, como estatisticamente significativo.

Resultados

Estatística descritiva

Tal como já foi referido na secção Materiais e Métodos, a amostra analisada foi constituída por 229 indivíduos, dos quais 58,5% eram do sexo feminino e 41,5% do sexo masculino. A média de idades da amostra foi de 55,97 anos, e o desvio padrão de 18,82 anos.

A amostra analisada contemplava a população que é servida pelo Centro Hospitalar Cova da Beira. A mesma inclui os habitantes dos concelhos de Belmonte, Covilhã e Fundão. Dentro dos participantes neste estudo, houve uma clara maioria de habitantes do concelho da Covilhã, cerca de 79,5%.

Estes dados são apresentados com maior pormenor nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Distribuição da amostra por sexo.

Sexo	Frequência	Percentagem
Feminino	134	58,5
Masculino	95	41,5
Total	229	100

Tabela 2. Distribuição da amostra por idade.

Idade (em anos)	Estatística
Média	55,97
Desvio Padrão	18,82
Mínimo	9
Máximo	94
Mediana	59

Tabela 3. Distribuição da amostra por concelho.

Concelho	Frequência	Porcentagem
Belmonte	22	9,6
Covilhã	182	79,5
Fundão	25	10,9
Total	229	100

Os Gráficos apresentados de seguida retratam as variáveis que foram consideradas ao longo deste trabalho. Foram tidos em conta o tipo de meio em que os participantes viviam (Gráfico 1), a presença contínua de gatos no domicílio, como animais de estimação (Gráfico 2), a convivência frequente com gatos, mas não considerados animais de estimação (Gráfico 3), o consumo de carne (de qualquer origem) crua ou malpassada (Gráfico 4) e os resultados obtidos, das 229 amostras, na análise laboratorial pelo MAT (Gráfico 5). Os primeiros quatro Gráficos refletem as respostas dadas pelos participantes nos inquéritos feitos aquando da recolha da amostra de soro para análise pelo MAT.

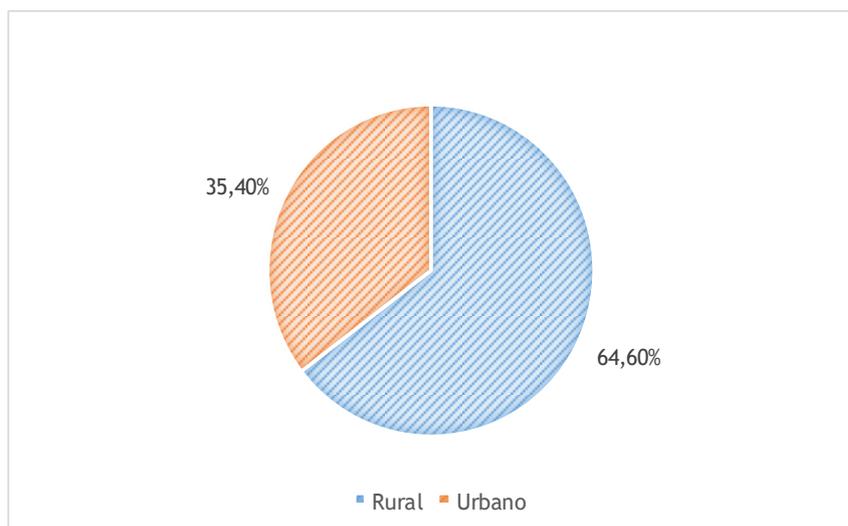


Gráfico 1. Tipo de meio

O Gráfico 1 evidencia uma dominância do meio rural, cerca de 148 indivíduos (64,60%), dentro dos 229 que constituíram a amostra deste estudo.

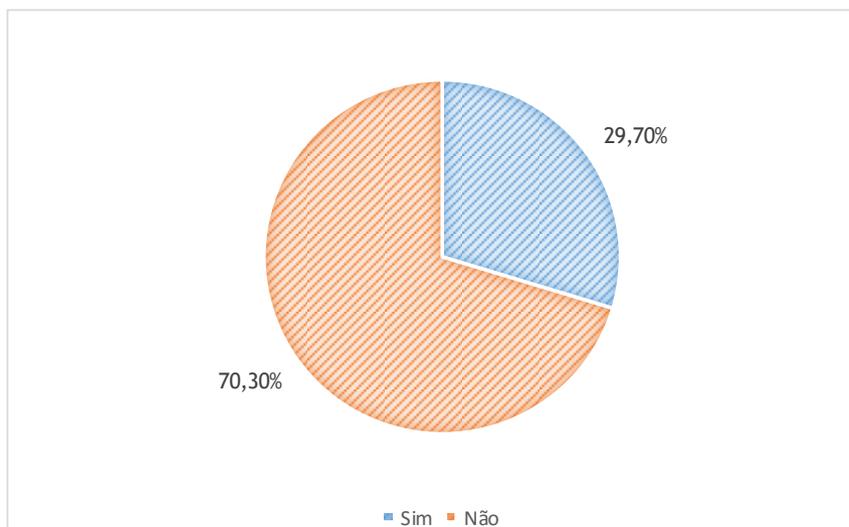


Gráfico 2. Presença de gatos no domicílio

O Gráfico 2 mostra que a maioria dos participantes (70,30%, ou seja, 161 indivíduos) nega, no inquérito, possuir gatos como animais de estimação.

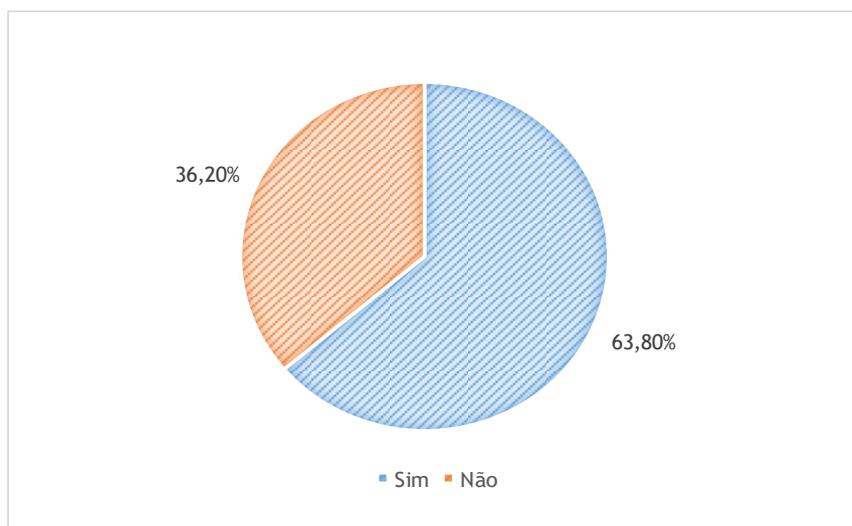


Gráfico 3. Convivência com gatos

Apesar de no Gráfico 2, 70,30% dos indivíduos ter negado possuir um gato como animal de estimação, à pergunta “convive habitualmente com gatos?”, 146 pessoas responderam afirmativamente. A questão pressupunha uma convivência, pelo menos, semanal com gatos, domésticos ou não. A designação “convivência” incluía alimentar, tocar ou limpar os mesmos animais. Esta explicação foi dada aos participantes aquando da realização do questionário.

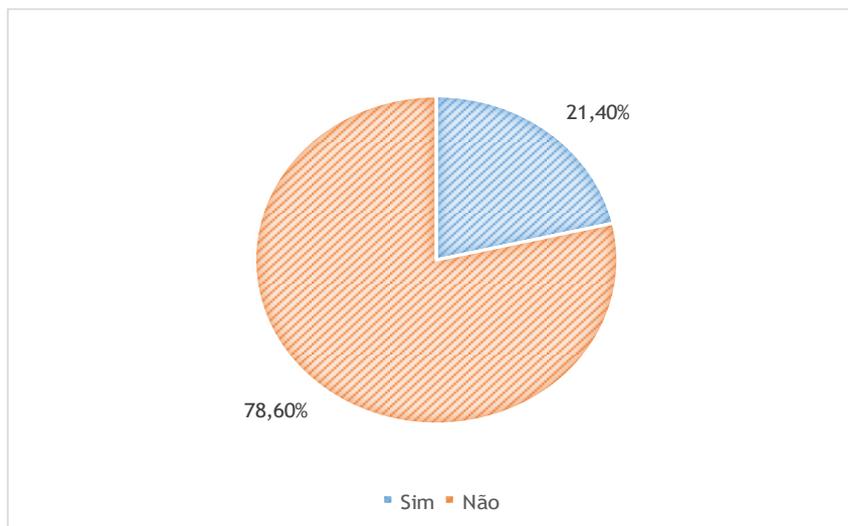


Gráfico 4. Consumo de carne crua ou malpassada

O Gráfico 4 incide na questão “por norma consome carne crua ou malpassada?”. A esta questão 180 participantes responderam negativamente. Este ponto não incluía a ingestão de carne processada ou fumada, mas sim a ingestão de carne (de qualquer origem animal) não cozinhada ou malpassada por parte do inquirido. Todos foram devidamente esclarecidos aquando da concretização das respostas ao inquérito.

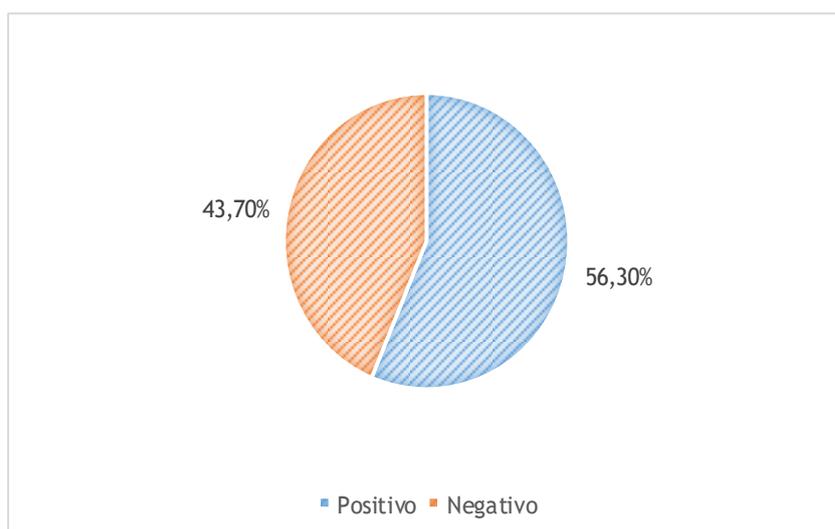


Gráfico 5. Seroprevalência de infecção por *Toxoplasma gondii*

229 amostras de soro foram recolhidas de diferentes indivíduos para posterior análise por MAT para anticorpos contra *T. gondii*. As amostras foram consideradas positivas quando os títulos eram positivos para diluições de 1:40. Quando os resultados foram negativos para esta diluição, as amostras foram novamente testadas para diluições 1:4000, para despistar

“fenómenos de pré-zona”. 56,3% da amostra, ou seja, 129 indivíduos foram positivos para *T. gondii*, evidenciando uma infecção crônica pelo parasita.

Estatística indutiva

Um dos objetivos deste estudo foi testar a influência de determinados fatores de risco, inumerados pela bibliografia, na exposição, da população da Cova da Beira, a *T. gondii*. Toda a análise estatística realizada teve como foco relacionar as respostas dadas pelos inquiridos, nos questionários, com a análise das 229 amostras de soro, através do MAT para anticorpos contra *T. gondii*, cujos resultados possíveis foram “positivo” ou “negativo”.

De acordo com as hipóteses enumeradas na seção Objetivos, começou-se por estudar a possível influência do tipo de meio na exposição deste agente zoonótico.

Hipótese 1. O risco de seropositividade para *T. gondii* aumenta em indivíduos que residem em meio rural, quando comparado com os que vivem em meio urbano.

Tabela 4. Tabela de contingência: tipo de meio/resultados obtidos no MAT

	TIPO DE MEIO		
	Rural	Urbano	Total
Positivo	90 39,3%	39 17,0%	129 56,3%
Negativo	58 25,3%	42 18,3%	100 43,7%
Total	148 64,6%	81 35,4%	229 100%

Teste exato de Fisher, $p=0,071 > 0,050$

Podemos concluir que para um nível de significância $\alpha < 0,05$, não existe uma associação estatisticamente significativa entre o tipo de meio em que o indivíduo reside e o resultado obtido pelo MAT.

Uma outra questão que surgiu com o desenvolvimento deste trabalho, foi se a prevalência de *T. gondii* era superior em indivíduos que possuem gatos como animais de

estimação ou nos que convivem, pelo menos, semanalmente com gatos. E assim surgiu a segunda hipótese desta dissertação.

Hipótese 2. O risco de seropositividade para *T. gondii* aumenta em indivíduos que possuem ou convivem com gatos, quando comparado com os que não têm qualquer tipo de contato.

Tabela 5. Tabela de contingência: presença de gatos no domicílio/resultados obtidos no MAT

PRESENÇA DE GATOS NO DOMICÍLIO			
	Sim	Não	Total
Positivo	32 14,0%	97 42,4%	129 56,3%
Negativo	36 15,7%	64 27,9%	100 43,7%
Total	68 29,7%	81 70,3%	229 100%

Teste exato de Fisher, $p=0,080 > 0,050$

Concluímos que para um nível de significância estatística $\alpha < 0,05$, não há uma associação estatisticamente significativa entre a presença de gatos no domicílio e os resultados positivos pelo MAT para anticorpos contra *T. gondii*. O mesmo se verifica para quem não tem gatos, contudo convive com os mesmos frequentemente, tal como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Tabela de contingência: convivência com gatos/resultados obtidos no MAT

CONVIVÊNCIA COM GATOS			
	Sim	Não	Total
Positivo	83 36,2%	46 20,1%	129 56,3%
Negativo	63 27,5%	37 16,2%	100 43,7%
Total	146 63,8%	83 36,2%	229 100%

Teste exato de Fisher, $p=0,089 > 0,05$

Ainda dentro do estudo dos fatores de risco para uma maior exposição da população da Cova da Beira a *T. gondii*, foi feita uma averiguação, por inquérito, acerca do consumo de carne crua ou malpassada por parte dos participantes, tendo-se construído a terceira hipótese.

Hipótese 3. O risco de seropositividade para *T. gondii* aumenta em indivíduos que ingerem carne crua ou malpassada, quando comparado com os que não o fazem.

Tabela 7. Tabela de contingência: consumo de carne crua ou malpassada/ resultados obtidos no MAT

CONSUMO DE CARNE CRUA/MALPASSADA			
	Sim	Não	Total
Positivo	29 12,7%	100 43,7%	129 56,3%
Negativo	20 8,7%	80 34,9%	100 43,7%
Total	49 21,40%	180 78,60%	229 100%

Teste exato de Fisher, $p=0.746 > 0.05$

Uma vez mais, para um nível de significância estatística $\alpha < 0,05$, a hipótese em análise foi rejeitada, pois não há uma relação estatisticamente significativa entre o consumo de carne crua ou malpassada e uma maior exposição do indivíduo ao parasita.

Aquando da análise estatística dos dados, a investigação da relação entre os resultados de MAT obtidos e a idade e o gênero dos participantes mostrou ser de elevado interesse para o estudo.

Para o efeito, começou por se dividir a amostra em resultados positivos e resultados negativos no MAT, calculando a média das idades dos participantes pertencentes aos respetivos grupos.

Tabela 8. Média de idades dos grupos de resultados do MAT para anticorpos contra *T. gondii*

	IDADE		
	Frequência de indivíduos	Média de Idades (em anos)	Desvio Padrão (em anos)
Positivo	129 56,3%	65,02	13,137
Negativo	100 47,3%	44,31	18,672

Teste T-student, $p=0,000 < 0,05$

Há, notoriamente, uma média de idades superior entre os indivíduos que apresentam um resultado de MAT positivo para anticorpos contra *T. gondii*. Esta conclusão é apoiada por um valor de $p < 0,05$, calculado com o teste T-student, ou seja, é estatisticamente significativo para a amostra.

Em relação ao sexo, foi feito o mesmo exercício, para determinar dentro dos resultados positivos, qual o mais prevalente.

Tabela 9. Tabela de contingência: sexo/resultados obtidos no MAT

	SEXO		
	Feminino	Masculino	Total
Positivo	67 29,3%	62 27,1%	129 56,3%
Negativo	67 29,3%	33 14,4%	100 43,7%
Total	134 58,5%	95 41,5%	229 100%

Teste exato de Fisher, $p=0,03 < 0,05$

Dentro do sexo feminino, a distribuição entre resultados positivos e os resultados negativos foi equitativa (67 em cada grupo, 50%). Já no sexo masculino, observaram-se 33 (34,7%) indivíduos com resultado negativo e 62 (65,3%) com resultado positivo no MAT, havendo uma relação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os níveis de prevalência de *T. gondii* e o sexo masculino.

Discussão

Limitações do estudo

O início da realização deste trabalho foi marcado pela dificuldade em encontrar informação referente à prevalência e aos fatores de risco para infeção por *Toxoplasma gondii* na região acometida, por escassez de fontes bibliográficas. Os únicos estudos existentes incidiam mais sobre a prevalência e prevenção em grávidas, e não na população em geral.

O estudo tinha como principal objetivo determinar a prevalência de *T. gondii* na população da Cova da Beira. Esta população é constituída por 87869 indivíduos, como tal, para que a amostra pudesse ser considerada estatisticamente significativa, teria de ter sido composta por 269 participantes (para um intervalo de confiança de 90%). Tal não foi possível devido a limitações económicas na análise pelo MAT das amostras de soro recolhidas, sendo que o número final de intervenientes neste estudo foi 229. Assim sendo, os resultados obtidos não podem ser extrapolados para a população. Todas as conclusões aqui apresentadas serão referentes apenas à amostra.

A informação sobre os fatores de risco, para uma exposição aumentada a *T. gondii*, considerados nesta dissertação, foi obtida através de um inquérito feito pouco antes da recolha de sangue, na presença da investigadora para o esclarecimento de possíveis dúvidas que pudessem surgir. Esse facto pode ter influenciado de alguma forma as respostas dadas. A mesma informação está ainda dependente da subjetividade com que cada inquirido vê os fatores abordados no questionário, sendo este aspeto dependente da experiência e dos conceitos pessoais de cada um, como por exemplo, a definição do que é carne malpassada, que pode variar imensamente.

Esta investigação tinha como fator de inclusão ser residente na região da Cova da Beira, contudo, isto não exclui indivíduos que se tenham mudado de uma outra região do país, e que atualmente sejam residentes em Belmonte, Covilhã ou Fundão. Sendo que o MAT apenas deteta imunoglobulinas G (anticorpos de fase crónica), a infeção por *T. gondii* pode ter sido contraída em outros concelhos, sujeitos a diferentes prevalências e fatores de risco.

Análise dos resultados

O estudo mais recente acerca da prevalência de toxoplasmose na população portuguesa data de 1979 e declarava a existência de uma seroprevalência de 47%. A prevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* verificada na amostra analisada (referente à região Cova da Beira), na investigação atual, foi de 56,3%. Este achado aproxima-se do valor registado, pelo mesmo artigo de 1979 [16], no distrito de Viana do Castelo (56,4%), e distancia-se da percentagem encontrada no sul do país (Évora), que foi de 33%. Curiosamente, o mesmo estudo não encontrou uma relação direta entre a seroprevalência em humanos e em gatos da mesma região. Pelo contrário, as maiores prevalências de *T. gondii* em gatos vadios (44,2%) encontraram-se em Lisboa (entre 2009 e 2010) [17]. Esta diferença poderá justificar-se pelo tipo de atividades laborais que prevalecem em cada região e pelos diferentes padrões de alimentação estabelecidos.

Nenhuma das variáveis assumidas no início do estudo - tipo de meio, posse de gatos como animais de estimação, conviver com gatos (domésticos ou vadios) e consumo de carne crua ou malpassada - se revelou significativamente associada à infecção por *Toxoplasma gondii*.

Durante esta investigação, o tipo de meio em que o participante residia não constituiu um fator de risco para o desenvolvimento da infecção por *T. gondii*. Apesar de 148 indivíduos declararem viver em meio rural, e desses, 90 (60.8%) apresentarem resultado positivo no MAT para anticorpos contra *T. gondii*, o valor de significância estatística (p) era > 0.05 ($p = 0.071$). Contudo, estudos realizados no Brasil [18] [19] defendem seroprevalências superiores em meios rurais (superiores a 70%), comparativamente aos meios urbanos.

Os resultados desta investigação no que diz respeito ao tipo de meio poderão ser justificados pela melhoria geral dos cuidados veterinários por parte dos criadores de gado e pelo aumento de informação disponível à população, que alerta para os comportamentos de risco a evitar. Ainda assim, devido aos hábitos alimentares, ao contato constante com animais e solo infetados e ao maior risco de consumo de água com esporozoítos, medidas profiláticas devem ser instituídas, principalmente nos grupos de riscos.

O fato de possuir um ou mais gatos como animais de estimação revelou não ser um fator de risco para a infecção por *T. gondii* com um nível de significância estatística de $p = 0.08$ (> 0.05). Dos 129 participantes com resultado positivo no MAT, 97 (75,2%) não tinham gatos em casa, enquanto que, dos que tinham gatos, a minoria (47,1%) apresentava resultado positivo no MAT. Dos participantes com MAT positivo, 83 (64.3%) assumiram que conviviam com gatos frequentemente, contudo dentro dos indivíduos que não conviviam, cerca de 46 (55,4%) apresentavam um resultado positivo para MAT, por isso também esta variável não mostrou uma relação com significância estatística ($p = 0.089$, > 0.05). Esta situação é corroborada por estudos recentes [11], que indicam que a convivência diária com gatos não é um fator de risco para toxoplasmose, desde que as devidas medidas de higiene animal e acompanhamento veterinário sejam tomadas.

Quanto ao consumo de carne crua ou malpassada, uma vez mais, não se verificou uma associação estatisticamente significativa ($p = 0.746$, > 0.05), sendo que dos 129 resultados positivos, apenas 29 indivíduos (22,5%) afirmaram consumir carne malpassada. A grande maioria dos participantes (180, ou seja, 78,6%) afirmou não consumir carne crua ou malpassada, porém, dos 180, 100 indivíduos (55,6%) revelaram um resultado positivo no MAT. Esta relação negativa é também apontada por A.P. Lopes (2011) [11], num estudo realizado em grávidas na região norte de Portugal, em que o consumo de carne crua ou malpassada não comprovou ser um fator de risco. Os autores escalonaram a importância dos fatores de risco para toxoplasmose, no mesmo estudo, da seguinte forma (por ordem decrescente): prática de atividades relacionadas com o solo, sem luvas; consumo de vegetais ou fruta crus (as) ou mal lavados (as); e ingestão de carne de porco fumada ou curada.

A vigilância cada vez mais apertada dos profissionais de Saúde Pública no que toca ao controlo da qualidade das carnes comercializadas pode justificar a menor transmissão de esporozoítos por esta via. Ainda assim, numa revisão realizada em 2013 [10] sobre a transmissão de *Toxoplasma gondii* em Portugal, verificou-se uma prevalência de toxoplasmose de 5% em porcos (entre os 6 e os 10 meses) criados no norte do país, e a idade dos mesmos provou ser um fator de risco importante na infeção; um valor equivalente (6,8%) foi observado por Esteves *et al.* (2014) [20] num matadouro em Lisboa. Prevalências ainda mais altas foram confirmadas em ovelhas e cabras, cerca de 17,1%, bem como em javalis selvagens (20,6%). Estes últimos, são de elevada importância na região da Cova da Beira, visto ser comum a caça ao javali, com posterior consumo da carne e derivados (ex. enchidos), que são muitas vezes cozinhados sem que haja as condições ideais para a confeção alimentar [21].

A média de idades nos indivíduos que apresentaram resultado positivo no MAT para anticorpos contra *T. gondii* foi de 65,02 anos (desvio padrão - 13,137 anos), valor esse significativamente mais alto do que a média de idades encontrada entre os participantes com resultado negativo (44,31 anos, desvio padrão - 18,672 anos), com um nível de significância estatística de $p = 0.00$ (< 0.05), ou seja, há uma relação estatisticamente significativa entre a idade e a infeção parasitária em estudo. Este fato não é novidade, visto que numa investigação realizada em 1983, em Portugal [16], se admitiu uma exposição ao agente infeccioso cumulativa com a idade. Também Eckert *et al.* (2005) [14] apontam para a possibilidade de uma subida da seroprevalência para *T. gondii* de até 80% em função da idade da população estudada.

Neste estudo, a amostra analisada foi constituída por 134 elementos do sexo feminino (58,5%) e por 95 do sexo masculino (41,5%). Dentro do sexo feminino, a distribuição de resultados negativos e positivos no MAT foi igual (50%). Contudo, nos homens foi de notar uma diferença considerável, tendo sido registados 62 resultados positivos (65,3%) e 33 negativos (34,7%), com um nível de significância estatística de $p = 0.03$ (< 0.05), comprovando-se uma relação positiva entre a variável e os níveis de prevalência. Esta relação é sugestiva da diferença de atividades laborais assumidas pelos dois sexos na região estudada, sendo que os homens, por norma, dedicam-se mais à agricultura, silvicultura, pecuária e jardinagem,

profissões que por si só exigem um contato praticamente direto com o solo. Por outro lado, é descrito por alguns artigos da literatura [22][23], um maior consumo de carne crua/malp passada/curada/fumada por parte dos homens. Outras investigações descrevem uma maior prevalência em mulheres de países em desenvolvimento, devido ao fato destas serem as responsáveis pela preparação das refeições para o agregado familiar (manuseamento de vegetais ou frutas crus (as) e confecção da carne) [24][25].

Conclusão

Os resultados desta tese, apesar de não serem estatisticamente significativos, abrem portas a que mais estudos sejam feitos com o intuito de identificar comportamentos de risco que possam estar a ser praticados pelos habitantes da Cova da Beira. Sendo a toxoplasmose uma patologia tão deletéria, quando transmitida congenitamente ou quando reativada em doentes imunocomprometidos, é de extrema importância o reconhecimento do seu comportamento demográfico, para que os profissionais de saúde possam assim identificar pacientes de risco aumentado, intensificando as medidas profiláticas devidas.

É aconselhável que em grupos de risco para infeção por este parasita (mulheres grávidas não imunizadas, indivíduos HIV positivos, sujeitos imunocomprometidos por outras patologias) haja um cuidado acrescido na prática das atividades diárias, como por exemplo, usar luvas durante a jardinagem e ao tratar da higiene dos gatos, limpar vigorosamente os alimentos frescos provenientes do solo e cozinhar muito bem todo o tipo de carne, evitando, ao mesmo tempo, a ingestão de carne processada (ex. enchidos).

Referências bibliográficas

- [1] J. P. Dubey, "Toxoplasmosis of animals and humans," *Lancet*, vol. 363, no. 6, pp. 1965-1976, 2009.
- [2] a J. Cook, R. E. Gilbert, W. Buffolano, J. Zufferey, E. Petersen, P. a Jenum, W. Foulon, a E. Semprini, and D. T. Dunn, "Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis.," *BMJ*, vol. 321, no. 7254, pp. 142-147, 2000.
- [3] M. J. MILLER, "Late Parasitemia in Asymptomatic Acquired Toxoplasmosis," *Ann. Intern. Med.*, vol. 71, no. 1, p. 139, Jul. 1969.
- [4] W. Zhou, J. H. Quan, Y. H. Lee, D. W. Shin, and G. H. Cha, "Toxoplasma gondii Proliferation Require Down-Regulation of Host Nox4 Expression via Activation of PI3 Kinase/Akt Signaling Pathway," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, 2013.
- [5] Z. X. Turner M , Lenhart S , Rosenthal B, "Modeling effective transmission pathways and control of the world." 2013.
- [6] P. R. Millar, F. L. de Moura, O. M. P. Bastos, D. P. B. G. de Mattos, A. B. M. Fonseca, A. P. Sudré, D. Leles, and M. R. R. Amendoeira, "Toxoplasmosis-Related Knowledge Among Pregnant and Postpartum Women Attended in Public Health Units in Niterói, Rio De Janeiro, Brazil," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 56, no. 5, pp. 433-438, 2014.
- [7] C. Martins, "Toxoplasmose na Gravidez," *Rev Port Cliiica Geral*, vol. 18, pp. 333-340, 2002.
- [8] A. M. Tenter, "Toxoplasma gondii in animals used for human consumption," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 2, pp. 364-369, 2009.
- [9] J. Kravetz, *Congenital toxoplasmosis*, vol. 2008. Paris: Springer Paris, 2000.
- [10] A. P. LOPES, J. P. DUBEY, M.-L. DARDÉ, and L. CARDOSO, "Epidemiological review of Toxoplasma gondii infection in humans and animals in Portugal," *Parasitology*, vol. 141, no. 13, pp. 1699-1708, 2014.
- [11] A. P. P. Lopes, J. P. P. Dubey, O. Moutinho, M. J. J. Gargaté, A. Vilares, M. Rodrigues, and L. Cardoso, "Seroepidemiology of Toxoplasma gondii infection in women from the North of Portugal in their childbearing years.," *Epidemiol. Infect.*, vol. 140, no. 5, pp. 872-877, 2011.
- [12] J. L. Garcia, I. T. Navarro, L. Ogawa, R. C. De Oliveira, and E. Kobilka, "Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil," *Rev. Panam. Salud Pública*, vol. 6, no. 3, pp. 157-163, 1999.
- [13] A. M. Tenter, A. R. Heckeroth, and L. M. Weiss, "Toxoplasma gondii: from animals to humans.," *Int. J. Parasitol.*, vol. 30, no. 12-13, pp. 1217-58, 2000.
- [14] G. García Gómez, "Zoonosis parasitarias," *Portales Medicos. com*, 2009. [Online]. Available: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/1357/1/Zoonosis->

parasitarias. -Importante-problema-de-salud.

- [15] Instituto Nacional de Estatística, “Censos 2011 Resultados Definitivos,” *Censos 2011*, vol. 26, pp. 1-41, 2012.
- [16] M. H. Ângelo, “Prevalência de anticorpos antitoxoplasmose.” 1983.
- [17] H. Waap, R. Cardoso, A. Leitão, T. Nunes, A. Vilares, M. J. Gargaté, J. Meireles, H. Cortes, and H. Ângelo, “In vitro isolation and seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in stray cats and pigeons in Lisbon, Portugal,” *Vet. Parasitol.*, vol. 187, no. 3-4, pp. 542-547, 2012.
- [18] J. Garcia and I. Navarro, “Levantamento soropidemiológico da toxoplasmose em moradores da zona rural do município de Guaraci-Paraná-Brasil,” *Semina: Ciências Agrárias*. 1995.
- [19] J. M. Marques, da S. D. V, C. N. A. B, L. G. Velasquez, D. Silva, R. C, H. Langoni, and da S. A. V, “Prevalence and Risk Factors for Human Toxoplasmosis in a Rural Community,” *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, no. 4, pp. 673-684, 2008.
- [20] F. Esteves, D. Aguiar, J. Rosado, M. L. Costa, B. de Sousa, F. Antunes, and O. Matos, “*Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal,” *Vet. Parasitol.*, vol. 200, no. 1-2, pp. 8-12, 2014.
- [21] C. Coelho, M. Vieira-Pinto, A. S. Faria, H. Vale-Gonçalves, O. Veloso, M. das N. Paiva-Cardoso, J. R. Mesquita, and A. P. Lopes, “Serological evidence of *Toxoplasma gondii* in hunted wild boar from Portugal,” *Vet. Parasitol.*, vol. 202, no. 3-4, pp. 310-312, 2014.
- [22] G. Excler JL, Pretai E, Pozzeto B, Charpin B, *Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in Burundi*. Trop Med Parasit, 1988.
- [23] E. Konishi and J. Takahashi, “Some epidemiological aspects of *Toxoplasma* infections in a population of farmers in Japan,” *International Journal of Epidemiology*, vol. 16, no. 2. pp. 277-281, 1987.
- [24] R. S. Goldsmith, I. G. Kagan, R. Zarate, M. A. Reyes-Gonzalez, and J. Cedeno-Ferreira, “Low *Toxoplasma* antibody prevalence in serologic surveys of humans in southern Mexico,” *Arch Invest Med (Mex)*, vol. 22, no. 1. pp. 63-73, 1991.
- [25] A. A. Abdel-Hameed, “Sero-epidemiology of toxoplasmosis in Gezira, Sudan,” *J Trop Med Hyg*, vol. 94, no. 5. pp. 329-332, 1991.

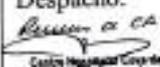
Anexos

Anexo I



Centro Hospitalar
Cova da Beira, E.P.E.

Recebido em
15/07/2015
E.S.

Parecer:	Despacho:  Centro Hospitalar Cova da Beira Hospital de Especialidade de Medicina Interna Prof. Doutor Miguel Castelo Branco										
ASSUNTO: Projecto de Investigação nº 56/2015 - "Avaliação do Grau de exposição do ser humano ao agente zoonótico <i>Toxoplasma gondii</i> "											
PARA: Excmo. Sr. Presidente do Conselho de Administração DE: Gabinete de Investigação e Inovação	N.º 63/UJH Data 10/07/2015										
<p>Em relação ao assunto em epígrafe, junto envio o pedido de autocriação de Ana Rita Pinheiro Torres da Silva, aluna de Mestrado em Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade da Beira Interior, para a realização de um estudo subordinado ao tema "Avaliação do Grau de exposição do ser humano ao agente zoonótico <i>Toxoplasma gondii</i>", a realizar no serviço de Patologia Clínica, deste Centro Hospitalar.</p> <p>Envio ainda o parecer nº 42/2015, emitido pela Comissão de Ética.</p> <p>Informo que se encontram reunidos todos os requisitos necessários de acordo com o Regulamento e Procedimentos do Centro de Investigação Clínica.</p> <p>Com os melhores cumprimentos,</p> <p style="text-align: center;">  (Dr.ª Rosa Saraiva) </p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>ENVIADO ao Gabinete de Investigação e Inovação Em 21 JUL 2015</p> <table border="1" style="border-collapse: collapse; width: 150px;"> <tr> <td style="font-size: 8px;">Centro Hospitalar Cova da Beira Presidência do Conselho de A.A.</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> <tr> <td style="font-size: 8px;">Presidência de C.A. / Director Clínico Prof. Doutor Miguel Castelo Branco</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> <tr> <td style="font-size: 8px;">Região Executiva de C.A. Dr. Vítor Pinheiro Lima</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> <tr> <td style="font-size: 8px;">Região Executiva de C.A. Joaquim Pinheiro Mendes, Dr.</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> <tr> <td style="font-size: 8px;">Unidade de Patologia Clínica Dr.ª Amélia Pinheiro</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> </table> </div>		Centro Hospitalar Cova da Beira Presidência do Conselho de A.A.		Presidência de C.A. / Director Clínico Prof. Doutor Miguel Castelo Branco		Região Executiva de C.A. Dr. Vítor Pinheiro Lima		Região Executiva de C.A. Joaquim Pinheiro Mendes, Dr.		Unidade de Patologia Clínica Dr.ª Amélia Pinheiro	
Centro Hospitalar Cova da Beira Presidência do Conselho de A.A.											
Presidência de C.A. / Director Clínico Prof. Doutor Miguel Castelo Branco											
Região Executiva de C.A. Dr. Vítor Pinheiro Lima											
Região Executiva de C.A. Joaquim Pinheiro Mendes, Dr.											
Unidade de Patologia Clínica Dr.ª Amélia Pinheiro											

Pág. 1 / 1

Anexo II

Ana Rita Pinheiro Torres da Silva, aluna do curso de Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde da UBI a realizar um trabalho de investigação subordinado ao tema “Avaliação do grau de exposição do ser humano ao agente zoonótico *Toxoplasma gondii*”, vem solicitar a sua colaboração neste estudo. Informo que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados pelo CHCB, EPE; informo ainda que a sua privacidade será respeitada, todos os dados recolhidos serão confidenciais e não serão fornecidas quaisquer compensações.

Objetivo do trabalho de investigação:

Avaliar o grau de exposição de seres humanos aos parasitas em causa, através da deteção (a) de anticorpos séricos específicos *Toxoplasma gondii* em amostras de sangue.

Critérios de inclusão: qualquer doente que se dirija ao Laboratório do CHCB

Procedimentos necessários: resposta a um breve questionário

Risco / Benefício da sua participação: Não existe qualquer tipo de risco nem benefício

Duração da participação no estudo: 3 meses

Nº aproximado de participantes: 200

Consentimento informado - Aluno / Investigador

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- * Entregou esta informação;
- * Explicou o propósito deste trabalho;
- * Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo participante ou representante legal.

<input style="width: 90%; border: 1px solid black;" type="text" value="Nome do Aluno / Investigador (Legível)"/>	<input style="width: 80%; border: 1px solid black;" type="text" value="___/___/___"/> Data
--	---

<input style="width: 90%; border: 1px solid black;" type="text" value="Assinatura do Aluno / Investigador"/>
--

Consentimento informado - Participante

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- * O Sr. (a) leu e compreendeu todas as informações desta informação, e teve tempo para as ponderar;
- * Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente;
- * Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao aluno/investigador uma explicação, tendo este esclarecido todas as dúvidas;
- * O Sr. (a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Participante (Legível)

Representante Legal (Legível)

Assinatura do Participante ou Representante Legal

____ / ____ / ____
Data

Anexo III

Serviço de Patologia Clínica do CHCB e Faculdade de Ciências da Saúde da UBI

Estudo científico de avaliação do grau de exposição de seres humanos a *Leishmania infantum*
e *Toxoplasma Gondii*

INQUÉRITO ANÓNIMO

1. Sexo:	Masculino <input type="checkbox"/>	Feminino <input type="checkbox"/>
2. Data de nascimento:	_____ (DD/MM/AA)	
3. Localidade de residência:	_____	
4. Meio Rural ou urbano?	_____	
5. Freguesia:	_____	
6. Tem cães em casa ou no quintal?	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
7. Tem gatos em casa ou no quintal?	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
8. Convive habitualmente com estes animais?	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
9. Costuma comer “carne malpassada”?	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>

Obrigado pela sua colaboração.

AMOSTRAS

Número de série da amostra de sangue (apenas para efeitos deste estudo): _____	
Amostra de soro <input type="checkbox"/>	Amostra de sangue em EDTA <input type="checkbox"/>
Data da recolha das amostras: _____ (DD/MM/AA)	