

GUILHERME GARCIA

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE CAPRINA NA  
MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ – BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro

CURITIBA

2010

GUILHERME GARCIA

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE CAPRINA NA  
MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ – BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro

CURITIBA

2010



Ministério da Educação e Desporto  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE  
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

## TERMO DE APROVAÇÃO

### “SOROEPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE CAPRINA NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ – BRASIL”

por

**GUILHERME GARCIA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e  
Patologia, pela Comissão formada por:

**Prof. Dr. Vanete Thomaz Soccol (presidente)**

**Prof. Dr. Aguinaldo José Nascimento**

**Prof. Dr. Edilene Alcântara de Castro**

Curitiba, 06 de abril de 2010.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir acontecer.

A minha família, meus pais, Moacir e Mariley, que me criaram, educaram e incentivaram a prosseguir nesta jornada, meus irmãos, Mauricio e Danielle e à minha sobrinha Giovana, pelo amor, carinho, compreensão e pelos momentos divertidos que me proporcionam.

À Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação, dedicação e estímulos durante a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Itamar Teodorico Navarro, por ter cedido a cepa Rh padrão de *Toxoplasma gondii*, os soros controle positivos e negativos e pelo treinamento realizado no hospital veterinário da UEL.

Às professoras Doutoras Edilene Alcântara de Castro e Rosângela Clara Paulino pelo auxílio e boas dicas.

Às laboratoristas Juliana Tracz e Luciane Mara Henning pela ajuda e pelo ótimo ambiente de trabalho.

Aos Colegas de mestrado André Gonçalves e Fagner pela ajuda na coleta de sangue dos caprinos e amigos de laboratório André Melo, Salôê, Martha, Magda, Ellen, Silvia, Tatiana, Jessé, Ricardo, Luana, Giovana, Janaina por toda ajuda e bons momentos que passamos juntos.

À professora Juliana Moura por me mostrar como trabalhar com células vero e a Ludmilla por ceder uma garrafa de células vero.

Ao professor Aguinaldo José do Nascimento e à médica veterinária Maria do Carmo pela ajuda nas análises estatísticas.

Às médicas veterinárias professora Cristina Sotomaior pela ajuda na elaboração do projeto e Maria da Graça pelo auxílio na coleta de sangue de cabras.

Ao seu Nino por permitir usar o microscópio com fonte de luz ultravioleta para leitura das lâminas de imunofluorescência indireta.

Aos médicos veterinários do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos João Carlos Minozzo e professor Valter Queiroz pelas orientações.

Aos animais, que deram seu sangue e sua vida para a realização deste trabalho e aos proprietários dos caprinos e ao biotério do setor de ciências biológicas que permitiram que eu usasse esses animais.

Aos protozoários, parasitas e patógenos em geral, que apesar de causarem tantas mazelas, tem papel fundamental tanto no controle de populações quanto no desenvolvimento da inteligência humana, que por causa deles tem um bom motivo para não se acomodar.

À amiga Ana, que sabia que eu ia terminar esse mestrado antes mesmo de começar, à Fernandinha, Key, Irma, Pity, Fabio, Melleck e muitos outros, obrigado pelo estímulo.

Ao doutor Leocádio José Correia e sua equipe espiritual pelo apoio e orientações necessários.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

“O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos”

Lao Tsé

## RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose causada por *Toxoplasma gondii*, protozoário que tem vasta distribuição geográfica e pouca especificidade parasitária. Afeta muitas espécies de animais silvestres e domésticos, incluindo o homem. Nos animais de produção, especialmente pequenos ruminantes como os caprinos, provoca abortos e nascimento de filhotes fracos, acarretando prejuízos econômicos para os criadores desses animais, além de servir como possível fonte de transmissão para o ser humano. O objetivo deste trabalho foi realizar estudo soropidemiológico da toxoplasmose caprina no estado do Paraná. Foram avaliados soros de 406 caprinos da Mesorregião metropolitana de Curitiba, no leste do estado, pelas técnicas de enzima-imunoenensaio (ELISA) e imunofluorescência indireta (RIFI), além da análise epidemiológica das condições de risco. A prevalência encontrada foi de 39,41% e 35,96% pelos métodos ELISA e RIFI, respectivamente. Ao comparar as duas técnicas, os dados obtidos revelam uma associação significativa entre elas, com um índice de copositividade para ELISA de 98,63% e conegatividade de 93,85%. O índice Kappa, que mede o grau de concordância entre as duas técnicas, foi de 0,91 que evidencia um grau de concordância ótimo entre as técnicas. Foi identificada que a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* aumentava com a idade dos animais. Dentre os fatores de risco para infecção por *T. gondii* em caprinos avaliados, verificou-se que foram significantes estatisticamente a idade superior a um ano e presença de gatos junto do rebanho, o acesso dos gatos ao alimento dos caprinos, a alimentação dos gatos, o tipo de manejo e finalidade da criação.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose caprina, epidemiologia, fatores de risco.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonosis caused by *Toxoplasma gondii*, a protozoan which have wide geographical distribution and little parasitic specificity. Affects many species of wild and domestic animals, including humans. It causes abortion and weak animal birth on livestock, especially small ruminants like goats, being the cause of severe economic losses to farmers and representing an relevant source of human infection. The present research has as objective make an seroepidemiological study of caprine toxoplasmosis in Paraná state. Sera from 406 goats from metropolitan meso region of Curitiba have been evaluated, in eastern state, by techniques of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence reaction (RIFI) and epimeiological analysis of risk factors. The prevalence found was 39.41% and 35.96% through ELISA and RIFI respectively. The two techniques used in research were compared, and the obtained data showed a significant association between them, with a copositivety rate to ELISA of 96.63% and conegativety of 93.85%. The Kappa index used to measure the agreement among the two techniques was 0.91 showing a great agreement level. The infection rate of *T. gondii* antibodies increased with animal age and the risk factors for *T. gondii* infection in goats were: age (after the first year), the presence of cats, cats feeding on the goats food, type of management and purpose of creation.

**Key words:** Caprine toxoplasmosis, epidemiology, risk factors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1 –</b>	CICLO DE VIDA DO <i>Toxoplasma gondii</i> .....	20
<b>FIGURA 2 –</b>	MAPA GEOPOLÍTICO DO PARANÁ INDICANDO A MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA.....	37
<b>FIGURA 3 –</b>	COLETA DE SANGUE DE CAPRINOS POR VENOPUNÇÃO JUGULAR.....	38
<b>FIGURA 4 –</b>	INOCULAÇÃO DE SOLUÇÃO DE TAQUIZOÍTOS EM CAMUNDONGOS E LAVAGEM PERITONEAL PARA OBTENÇÃO DE SOLUÇÃO CONTENDO TAQUIZOÍTOS.....	39
<b>FIGURA 5 –</b>	TAQUIZOÍTOS OBTIDOS DE LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS APÓS 48 HORAS DE CULTIVO (AUMENTO DE 400X).....	40
<b>FIGURA 6 –</b>	MONOCAMADA DE CÉLULAS VERO ANTES DA INOCULAÇÃO DE TAQUIZOÍTAS.....	41
<b>FIGURA 7 –</b>	(A) DESTRUIÇÃO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS VERO POR TAQUIZOÍTOS DE <i>T. gondii</i> (100x) E (B) TAQUIZOÍTOS EM AUMENTO DE 400x.....	42
<b>FIGURA 8 –</b>	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS PARA REALIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	44
<b>FIGURA 9 –</b>	(A) PADRÃO POSITIVO PARA RIFI 400X E (B) NEGATIVO 400X.....	44
<b>FIGURA 10 –</b>	PLACA DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO.....	46
<b>FIGURA 11 –</b>	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS SEGUIDAS PARA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO (ELISA).....	46
<b>QUADRO 1 –</b>	MATRIZ PARA CÁLCULO DE INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS.....	51
<b>QUADRO 2 –</b>	INTERPRETAÇÃO DO VALOR DE KAPPA.....	52

<b>FIGURA 12 –</b>	MUNICÍPIOS DA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA PESQUISADOS PARA TOXOPLASMOSE CAPRINA.....	53
<b>GRÁFICO 1 –</b>	DIFERENÇA ENTRE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS POR RIFI DE ACORDO COM SEXO E IDADE DOS ANIMAIS.....	57
<b>GRÁFICO 2 –</b>	DIFERENÇA ENTRE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS POR ELISA DE ACORDO COM IDADE E SEXO DOS ANIMAIS.....	58
<b>GRÁFICO 3 –</b>	SOROPREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE EM CAPRINOS NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA DO PARANÁ, POR PROPRIEDADE ESTUDADA.....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 –</b>	TOXOPLASMOSE EM CAPRINOS NO BRASIL, ORDENADO POR ESTADO E POR ANO.....	27
<b>TABELA 2 –</b>	TOXOPLASMOSE EM OUTROS ANIMAIS DE PRODUÇÃO E EM PRODUTOS CÁRNEOS, ORDENADO POR ESPÉCIE ANIMAL, REGIÃO GEOGRÁFICA E ANO..	28
<b>TABELA 3 –</b>	TOXOPLASMOSE EM CÃES E GATOS, ORDENADO POR ESPÉCIE ANIMAL, REGIÃO GEOGRÁFICA E ANO..	29
<b>TABELA 4 –</b>	EFETIVO DE CAPRINOS EM ESTABELECIMENTOS AGROPECUÁRIOS NO BRASIL, REGIÃO SUL E PARANÁ – SÉRIE HISTÓRICA.....	36
<b>TABELA 5 –</b>	PRODUÇÃO DE LEITE DE CABRA (MIL LITROS) EM ESTABELECIMENTOS AGROPECUÁRIOS NO BRASIL, REGIÃO SUL E PARANÁ – SÉRIE HISTÓRICA.....	36
<b>TABELA 6 –</b>	NÚMERO DE ANIMAIS TESTADOS, SEPARADOS POR SEXO E IDADE.....	54
<b>TABELA 7 –</b>	VALORES DE ABSORBÂNCIA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENO E DILUIÇÕES DE SORO E CONJUGADO EM SOROS CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO PARA PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA ELISA.....	55
<b>TABELA 8 –</b>	VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS CONTROLE NEGATIVOS E VALORES DE CUT-OFF POR PLACA/PROPRIEDADE.....	56
<b>TABELA 9 –</b>	RESULTADOS DA RIFI PARA TOXOPLASMOSE CAPRINA POR SEXO E IDADE DOS ANIMAIS.....	57
<b>TABELA 10 –</b>	RESULTADOS DO TESTE ELISA PARA TOXOPLASMOSE CAPRINA POR SEXO E IDADE DOS ANIMAIS.....	58

<b>TABELA 11</b>	– ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES SEGUNDO O SEXO, ANALISADOS POR RIFI PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> .....	59
<b>TABELA 12</b>	– ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES SEGUNDO O SEXO, ANALISADOS POR ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> .....	59
<b>TABELA 13</b>	– ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES SEGUNDO A IDADE, ANALISADOS POR RIFI PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> .....	59
<b>TABELA 14</b>	– ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES SEGUNDO A IDADE, ANALISADOS POR ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> .....	60
<b>TABELA 15</b>	– ANÁLISE ENTRE FAIXAS ETÁRIAS POR RIFI E ELISA (TESTE Z PARA DUAS PROPORÇÕES PARA CATEGORIAS MUTUAMENTE EXCLUSIVAS).....	60
<b>TABELA 16</b>	– TABELA DE CONTINGÊNCIA E COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS SOROLÓGICOS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Toxoplasma</i> .....	62
<b>TABELA 17</b>	– CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES CRIADORAS DE CAPRINOS.....	64
<b>TABELA 18</b>	– DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA TOXOPLASMOSE EM CAPRINOS.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RSF = reação de Sabin-Feldman  
RIFI = reação de imunofluorescência indireta  
ELISA = ensaio imunoenzimático  
IgM = imunoglobulina M  
IgG = imunoglobulina G  
 $\mu\text{m}$  = micrômetro  
RN = Rio Grande do Norte  
PE = Pernambuco  
PB = Paraíba  
CE = Ceará  
BA = Bahia  
MG = Minas Gerais  
RJ = Rio de Janeiro  
SP = São Paulo  
PR = Paraná  
RS = Rio Grande do Sul  
HAI = hemaglutinação indireta  
MAD = método de aglutinação direta  
MAT = teste de aglutinação modificado  
 $^{\circ}\text{C}$  = grau centígrado  
PCR = Polimerase chain reaction  
IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
g = força g  
ml = mililitro  
PBS = solução de tampão fosfato  
 $^{\text{TM}}$  = trade mark  
 $\text{CO}_2$  = gás carbônico  
pH = potencial hidrogeniônico  
 $\mu\text{l}$  = microlitro  
ng = nanograma  
OPD = ortofenilenodiamino  
nm = nanômetros  
 $\chi^2$  = qui-quadrado  
RR = risco relativo  
mg = miligrama  
CP = controle positivo  
CN = controle negativo  
conj. = conjugado  
ag. = antígeno  
IC = intervalo de confiança  
® = marca registrada  
neg = negativo  
pos = positivo  
UEL = Universidade Estadual de Londrina  
UFPR = Universidade Federal do Paraná  
CAPES = Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 – REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>19</b>
2.1 – SISTEMÁTICA.....	19
2.2 – O PARASITO.....	19
2.2.1 – Taquizoíto.....	20
2.2.2 – Bradizoítos e cistos teciduais.....	21
2.2.3 – Estágios enteroepiteliais.....	21
2.2.4 – Oocistos.....	22
2.3 – TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA.....	23
2.4 – INFECÇÕES POR <i>Toxoplasma gondii</i> EM CAPRINOS NO MUNDO E NO BRASIL.....	25
2.5 – PATOGENIA/PATOLOGIA.....	29
2.6 – DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE.....	31
2.7 – CAPRINOCULTURA NO PARANÁ.....	35
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 – ÁREA DE ESTUDO.....	37
3.2 – AMOSTRAGEM DE SORO DE CAPRINOS PARA ESTUDO.....	37
3.3 – COLETA DE SANGUE.....	38
3.4 – OBTENÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DE <i>Toxoplasma gondii</i> PARA PRODUÇÃO DE ANTÍGENO.....	39
3.4.1 – Cultivo <i>in vivo</i> .....	39
3.4.2 – Cultivo <i>in vitro</i> .....	40
3.4.2.1 – Cultivo celular.....	40
3.4.2.2 – Cultivo de <i>Toxoplasma gondii in vitro</i> .....	41
3.5 – PRODUÇÃO DE ANTÍGENO ÍNTEGRO DE <i>Toxoplasma gondii</i> PARA RIFI.....	42
3.6 – PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>Toxoplasma gondii</i> PARA ELISA.....	43
3.7 – MÉTODOS SOROLÓGICOS.....	43
3.7.1 – Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	43
3.7.2 – Enzimaimunoensaio Indireto (ELISA).....	45

3.7.2.1 – Padronização do método ELISA.....	49
3.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
3.9 – COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS SOROLÓGICOS.....	50
<b>4 – RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 – COLETA DE SANGUE DE CAPRINOS.....	53
4.2 – CARACTERÍSTICAS POPULACIONAIS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	54
4.3 – PADRONIZAÇÃO DA RIFI.....	54
4.4 – DOSAGEM PROTEICA DO ANTÍGENO SOLÚVEL E PADRONIZAÇÃO DO ELISA.....	55
4.4.1 – Estabelecimento do “Cut-off” ou ponto de corte entre soro reagente e não reagente.....	55
4.5 – DETERMINAÇÃO DA SOROPREVALENCIA DA TOXOPLASMOSE CAPRINA NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA – PARANÁ.....	56
4.6 – RESULTADOS POR PROPRIEDADE.....	61
4.7 – COMPARAÇÃO DOS TESTES: RIFI X ELISA.....	62
4.8 – ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO.....	63
<b>5 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada por *Toxoplasma gondii*, um coccídeo intracelular obrigatório com maior sucesso biológico entre os parasitos. Possui uma ampla gama de hospedeiros (pode acometer a maioria dos mamíferos e aves), tem vasta distribuição geográfica, várias formas morfológicas, parasita qualquer célula e se expande por todo corpo dos hospedeiros. Outros aspectos que impressionam, neste parasito, é que durante o curso do seu ciclo biológico possui várias formas (taquizoítos, bradizoítos, oocistos) e vários são seus mecanismos de infecção e patogenicidade (FRENKEL, 1973; AMATO NETO *et al.*, 1995; TENTER *et al.*, 2000; VILLENEUVE, 2003; DUBEY, 2004; SU *et al.*, 2010). As infecções são essencialmente causadas pela ingestão de carne mal cozida contendo cistos, com bradizoítos viáveis nos tecidos dos hospedeiros intermediários ou pela ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos eliminados nas fezes de gatos (hospedeiros definitivos).

Geralmente a parasitose é assintomática, causando leves quadros patológicos, especialmente linfadenopatia. Porém, pode causar a forma aguda grave (toxoplasmose disseminada) em pacientes humanos imunocompetentes quando infectados com alguns isolados ou cepas de maior patogenicidade (BOSSI & BICAIRE, 2004).

Em humanos a toxoplasmose vem merecendo maior atenção em mulheres em gestação e indivíduos imunocomprometidos. Quando a infecção é adquirida durante a gestação, o parasito pode se alojar na placenta e desenvolver durante o resto da gestação. Em um grande número de casos, o parasito atravessa a placenta e pode infectar o feto. Esta passagem geralmente ocorre no terço final da gestação. Porém, quando a infecção ocorre nos dois primeiros terços da gestação as conseqüências são piores, podendo ocorrer aborto, natimortalidade, hidrocefalia (VILLENEUVE, 2003; VAZ, 2006).

Em animais de produção pode haver grandes prejuízos econômicos para criadores especialmente em pequenos ruminantes, pois a infecção por *T. gondii* pode afetar a gestação, com abortos e natimortos.

Uma das primeiras citações de ocorrência da toxoplasmose em caprinos foi realizada por Feldman & Miller (1956) examinando rebanhos do estado de Nova

York. A partir daí, inúmeros inquéritos epidemiológicos e sorológicos foram realizados em diversos países, inclusive em diversas regiões do Brasil. Valendo-se de diferentes provas sorológicas em diferentes espécies animais, foram encontradas prevalências que variam de 10% a 92,4% (AMARAL *et al.*, 1978; ARAUJO *et al.*, 1998; DUBEY, 1985; CHIARI, 1981; CHIARI *et al.*, 1987; MACHADO & LIMA, 1987; PATTON *et al.*, 1990; SELLA *et al.*, 1994; PITA-GONDIM *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2003; MACIEL & ARAUJO, 2004).

A toxoplasmose tem sido identificada como uma das maiores causas de problemas reprodutivos em ovinos e caprinos na Grã-Bretanha, Noruega, Austrália, Nova Zelândia, EUA e Uruguai, assim como em outros países (BLEWETT & WATSON, 1984; DUBEY & BEATTIE, 1988; SKJERVE *et al.*, 1998; FREYRE *et al.*, 1999; BORDE *et al.*, 2006).

A toxoplasmose aguda adquirida em caprinos surge de uma a três semanas após a contaminação por oocistos. Os animais desenvolvem febre, anorexia, dispnéia, enterite e encefalite. As cabras que sobrevivem desenvolvem anticorpos e passam a ter os cistos com bradizoítos na musculatura, caracterizando a fase crônica. Entretanto, fêmeas gestantes podem abortar. A infecção pode resultar em reabsorção embrionária, abortos em diferentes fases gestacionais, mumificação fetal ou no nascimento de filhotes fracos (DUBEY, 1980; BLEWETT, 1983).

O diagnóstico clínico é praticamente impossível, devendo ser confirmado por reações sorológicas e, se possível, pela demonstração e isolamento do parasita (PARK *et al.*, 1993). O diagnóstico parasitológico visa demonstrar a presença de taquizoítos no organismo, e é feito pela procura por parasitos em material de biópsia ou isolamento através da inoculação de material suspeito em animais de laboratório (REY, 1991).

Diversas provas sorológicas foram preconizadas para o diagnóstico da toxoplasmose, entre elas estão: reação de neutralização, reação de Sabin-Feldman (RSF), reação de fixação de complemento, reação de hemaglutinação indireta, reação de imunofluorescência indireta (RIFI), reação imunoenzimática (ELISA). Análises sorológicas, usando RIFI e ELISA, têm sido amplamente empregadas para detectar rebanhos caprinos e ovinos contaminados por *T. gondii* (VAN DER PUIJE *et al.*, 2000). A reação de imunofluorescência indireta é considerado o mais sensível e seguro dos métodos de diagnóstico, podendo ser usado tanto na fase aguda (pesquisa de IgM) quanto na fase crônica da toxoplasmose (pesquisa de IgG).

O teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) tem a vantagem, no entanto, pela objetividade, automação e quantificação. Apresenta maior sensibilidade sobre os testes RIFI e RSF, porém pode apresentar resultados falsos positivos (VERONESI, 2002). No entanto, as duas metodologias podem ser complementares e auxiliar num maior número de animais diagnosticados.

A fonte de infecção mais comum entre os caprinos se dá pela contaminação do solo, dos alimentos e da água pelas fezes do gato (hospedeiro definitivo) com oocistos. A infecção pode também ser via transplacentária. Araujo *et al.* (1998) relatam que o índice de positividade é maior nas propriedades onde foi observada a presença de gatos.

É fato de grande preocupação a transmissão do *T. gondii* através do leite “in natura” de caprinos e seus derivados, bem como da carne e seus subprodutos, quando consumidos por seres humanos ou por outras espécies (DUBEY, 1980). O consumo de leite de cabra mal pasteurizado, muito tem interferido na saúde pública, contribuindo para que a toxoplasmose se torne uma das mais difundidas zoonoses, considerando que cabras portadoras de infecção aguda podem eliminar taquizoítos pelo leite (SKINNER *et al.*, 1990; VITOR *et al.*, 1991). A transmissão através da carne e seus subprodutos contendo cistos do parasito pode ser uma fonte importante de contaminação.

Poucos são os dados disponíveis na literatura sobre a importância desta espécie animal na manutenção do ciclo do *T. gondii* no estado do Paraná. Assim, se questiona qual a prevalência de anticorpos anti *T. gondii* na espécie caprina?

Visando responder a esta questão foi realizado o presente trabalho.

Objetivo geral: realizar um inquérito soro epidemiológico de *Toxoplasma gondii* em caprinos de propriedades situadas em áreas rurais e peri-urbanas do Paraná.

Objetivos específicos:

1. Produzir antígeno de *Toxoplasma gondii*, íntegro para RIFI e solúvel para ELISA;
2. Padronizar o método de enzimaímunoensaio (ELISA) para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos;
3. Padronizar o método de imunofluorescência (RIFI) para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos;
4. Relacionar as condições de manejo dos rebanhos aos resultados dos testes sorológicos obtidos.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 – SISTEMÁTICA

Segundo Levine *et al.* (1980), o parasito possui a seguinte posição sistemática:

Reino PROTISTA

Subreino PROTOZOA

Filo APICOMPLEXA Levine, 1970

Classe SPOROZOEIA Leuckart, 1879

Subclasse COCCIDIA Leuckart, 1879

Ordem EUCOCCIDIIDA Léger & Duboscq, 1910

Subordem EIMERIINA Léger, 1911

Família SARCOCYSTIDAE

Gênero *Toxoplasma* Nicolle e Manceaux, 1908

Espécie *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909

### 2.2 – O PARASITO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita coccídeo que tem gatos como hospedeiros definitivos e animais de sangue quente como hospedeiros intermediários (FRENKEL *et al.*, 1970). A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, tendo importância médica e veterinária por sua infecção primária causar aborto e doença congênita em várias espécies de hospedeiros intermediários (DUBEY, 1981; TENTER *et al.*, 2000).

Nicolle e Manceaux (1908) encontraram o protozoário em tecido de um roedor, o *Ctenodactylus gundi*, que estava sendo usado para pesquisas em *Leishmania* no Instituto Pasteur da Tunísia. Inicialmente acreditavam que o parasita era um piroplasma, depois *Leishmania*, mas logo perceberam que haviam descoberto um novo organismo, e o nomearam *T. gondii*, baseado na morfologia (*toxos* = arco, *plasma* = forma) e hospedeiro.

Splendore (1908) descobriu o mesmo parasito em um coelho no Brasil, também o identificando erroneamente com *Leishmania*, mas não o denominou (DUBEY, 2008).

Existem três estádios infectantes de *T. gondii*: os taquizoítos (em grupos ou clones), os bradizoítos (em cistos teciduais), e os esporozoítos (em oocistos). Estes estádios estão interligados em um complexo ciclo de vida (FIGURA 1).

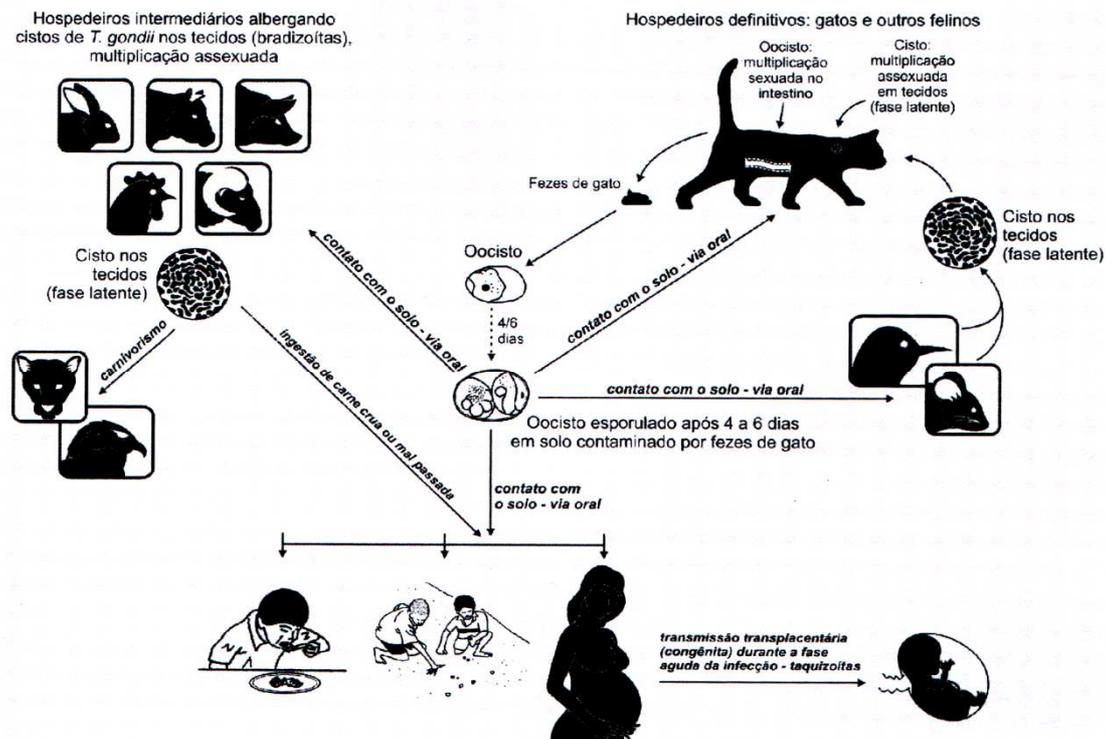


FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO *Toxoplasma gondii*

FONTE: Coura (2005)

### 2.2.1 – Taquizoíto

O termo taquizoíto (*tachos* = rápido) foi criado por Frenkel (1973) para descrever um estágio que se multiplica rapidamente em qualquer célula do hospedeiro intermediário e células que não sejam do epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos. Tem forma de lua crescente e medem aproximadamente 2 a 6  $\mu\text{m}$ . Consiste de várias organelas e corpúsculos de inclusão, e o núcleo é central.

Taquizoítos entram na célula do hospedeiro por penetração ativa ou por fagocitose. Dentro da célula, se torna oval e é cercado por um vacúolo parasitóforo. Eles se multiplicam assexuadamente na célula hospedeira por repetidas endodogênias, uma forma especializada de reprodução onde duas células filhas são formadas a partir de uma célula mãe, consumindo-a (DUBEY *et al.*, 1998).

Com o surgimento da resposta imune adaptativa do hospedeiro, duas a três semanas após a primoinfecção, a fase de multiplicação rápida do parasito vai se

extinguindo e, conseqüentemente, a fase aguda da infecção. O parasito passa a se multiplicar mais lentamente, passando para outro estágio, o bradizoíto (COURA, 2005).

### 2.2.2 – Bradizoítos e cistos teciduais

O termo bradizoíto (*bradi* = lento) também foi criado por Frenkel em 1973, descrevendo um organismo de multiplicação lenta em cistos teciduais. Bradizoítos também são chamados de cistozoítos.

Cistos teciduais crescem enquanto os bradizoítos se dividem por endodiogenia. Os cistos variam de tamanho; cistos jovens podem ser menores que 5µm de diâmetro e conter apenas dois bradizoítos, enquanto que os mais velhos contêm centenas de organismos. Cistos no cérebro são geralmente esferoidais e raramente alcançam diâmetro de 70µm, enquanto que cistos intramusculares são mais alongados e podem chegar a mais de 200µm de comprimento. Embora esses cistos possam se desenvolver em órgãos viscerais, como pulmões, fígado e rins, ele é mais prevalente em tecido muscular e nervoso, incluindo cérebro, olhos e músculo cardíaco e esquelético. Cistos teciduais intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir por toda a vida do hospedeiro sem provocar resposta inflamatória (DUBEY *et al.*, 1998).

Os bradizoítos diferem pouco dos taquizoítos, com o núcleo localizado na porção posterior. Eles são menos suscetíveis à destruição por enzimas proteolíticas que os taquizoítos e o período pré-patente em gatos alimentados com bradizoítos é menor que em gatos infectados com taquizoítos (HILL *et al.*, 2005).

Cistos teciduais são importantes no ciclo de vida do *T. gondii*, pois hospedeiros carnívoros infectam-se pela ingestão de carne contaminada (DUBEY, 2008).

### 2.2.3 – Estágios enteroepiteliais

Após a ingestão de cistos pelos gatos, a parede cística é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado. Os bradizoítos liberados penetram nas células do epitélio do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento de várias gerações de ciclos assexuado e sexuado de *T. gondii*. O parasito se multiplica abundantemente nas células do epitélio intestinal dos gatos (ciclo enteroepitelial) em estágios conhecidos como esquizontes. Organismos liberados

dos esquizontes formam gametas masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas). Os microgametas usam seus flagelos para nadar e penetrar e fertilizar os macrogametas, para formar o zigoto. Após a fertilização, a parede do oocisto é formada ao redor do parasito. Células epiteliais infectadas rompem-se e os oocistos caem na luz intestinal (HILL *et al.*, 2005).

#### 2.2.4 – Oocistos

É a forma de resistência que possui uma parede dupla bastante resistente às condições do ambiente, podendo aí permanecer por até 18 meses. Gatos eliminam oocistos após ingerir qualquer um dos três estágios infectantes, taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. O período pré-patente e a frequência de oocistos eliminados pelos felídeos variam de acordo com o estágio de *T. gondii* ingerido, sendo de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos, mais de 18 dias após ingerir oocistos e acima de 13 dias após a ingestão de taquizoítos. Menos de 30% dos gatos eliminam oocistos após ingerir taquizoítos ou oocistos, enquanto que quase todos os gatos eliminam oocistos após a ingestão de cistos teciduais (HILL *et al.*, 2005).

Oocistos não esporulados são subesféricos a esféricos e tem de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A esporulação ocorre fora do corpo do gato, 1 a 5 dias após a excreção, dependendo de aeração e temperatura. Oocistos esporulados são subesféricos a elipsóides e medem de 11 a 13  $\mu\text{m}$ . Cada oocisto contém dois esporocistos e cada esporocisto contém quatro esporozoítos (DUBEY *et al.*, 1998).

Constituem importante forma de transmissão da toxoplasmose, principalmente para animais herbívoros, roedores, aves e grupos humanos vegetarianos, ao ingerirem alimentos provenientes de solo contaminado com fezes de gato. Animais carnívoros e onívoros também podem se infectar oralmente por oocistos, através de água contaminada ou alimentos em contato com o solo, em locais onde circulam gatos.

Oocistos ingeridos liberam esporozoítos, que penetram nas células da mucosa intestinal, passando a seguir para outro estágio, o de taquizoítos. Inicia-se assim o ciclo assexuado do parasito, levando a uma infecção sistêmica, onde ocorre o parasitismo em vários tecidos do hospedeiro (COURA, 2005).

### 2.3 – TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA

A infecção por *T. gondii* pode ser adquirida por via congênita ou pós-natal. A infecção congênita em humanos foi descrita pela primeira vez por Wolf *et al.* (1939), e mais tarde descobriu-se que pode afetar várias espécies animais, principalmente ovelhas, cabras e roedores (DUBEY, 2008). Ela ocorre quando uma fêmea se infecta durante a gestação. Enquanto a mãe raramente tem sintomas de infecção, ela tem uma parasitemia temporária. Lesões focais desenvolvem-se na placenta e o feto pode tornar-se infectado (HILL & DUBEY, 2002).

A infecção adquirida pós-natal pode ser localizada ou generalizada. Esta pode ocorrer por carnivorismo, através da ingestão de cistos em carne crua ou malcozida, como sugerido por Weinman e Chandler (1954), ou pela via fecal-oral, através da ingestão de alimentos e água contaminados com fezes de gato contendo oocistos, fato descoberto por Hutchison em 1965. Isso que explica a existência da infecção em vegetarianos e herbívoros (DUBEY, 2008). Outras formas de se adquirir a infecção, porém raras, são pela ingestão de leite cru (geralmente de cabras) contaminado com taquizoítos, ou por transplante de órgãos (HILL & DUBEY, 2002).

Gatos têm grande importância na epidemiologia da toxoplasmose, porque, quando infectados pela primeira vez, eliminam milhões de oocistos que persistem viáveis no solo por mais de um ano, na dependência das condições de umidade e temperatura (FRENKEL *et al.*, 1975). A taxa de infecção em gatos é determinada pela taxa de infecção na população local de aves e roedores, pois os gatos supostamente se infectam ao alimentarem-se desses animais. Quanto mais oocistos no ambiente, mais as presas dos felinos tornam-se infectadas, que por sua vez aumentam a taxa de infecção em gatos (HILL *et al.*, 2005).

Oocistos têm sido isolados do solo em áreas de ocorrência da doença. Em fazendas, alimentos armazenados sem os devidos cuidados são de grande risco para populações animais. Cinquenta gramas de fezes felinas podem conter mais de 10 milhões de oocistos. Em uma situação hipotética, se isto fosse espalhado sobre 10 toneladas de alimento concentrado para animais, cada quilograma desse alimento conteria de 5 a 25 doses infectantes para ovelhas (McCOLGAN *et al.*, 1988).

O número de animais positivos em uma população varia muito devido a vários fatores, como idade dos animais, sua alimentação e condições que eles vivem. Souza, em 2003, realizou um inquérito em cães da cidade de São Paulo e região

rural do norte do Paraná e constatou prevalência de 5,2% em animais urbanos domiciliados, 31,6% em animais urbanos de rua e 34,3% em cães da área rural. Nos EUA, a soroprevalência da infecção do *T. gondii* em suínos, cuja carne é vendida em cidades, é muito baixa, chegando a 0,58%, enquanto em pequenas fazendas as prevalências podem atingir 93% (DUBEY *et al.*, 2002).

Hábitos culturais podem influenciar na aquisição da infecção por *T. gondii*. Na França, por exemplo, a taxa de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* é muito alta em humanos. Cerca de 84% das mulheres grávidas de Paris possuem anticorpos anti-*T. gondii*, enquanto que apenas 32% em Nova York e 22% em Londres têm tais anticorpos (DUBEY & BEATTIE, 1988). Essa alta incidência parece estar relacionada em parte ao fato de os franceses possuírem o hábito de consumirem produtos cárneos crus ou malcozidos. Em contraste, as altas prevalências de infecção por *T. gondii* nas Américas Central e do Sul é devido ao alto nível de contaminação ambiental com oocistos (HILL *et al.*, 2005). Em certas áreas do Brasil, aproximadamente 60% das crianças com 6 a 8 anos de idade possuem anticorpos anti-*T. gondii*, devido à ingestão de oocistos do ambiente altamente contaminado (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Surtos epidêmicos de toxoplasmose têm sido relatados com frequência em diversas regiões, quase sempre relacionados à presença de gatos ou ingestão de carnes mal cozidas.

Entre novembro de 2001 e janeiro de 2002, o Brasil registrou o maior surto de toxoplasmose do mundo, ocorrido no município de Santa Isabel do Ivaí – Paraná. Um total de 462 pessoas apresentou sorologia sugestiva para toxoplasmose (IgM reagente). Dentre os acometidos, 7 eram gestantes e destas 6 tiveram seus filhos infectados, ocorrendo uma anomalia congênita grave e um aborto espontâneo. A investigação epidemiológica concluiu que a fonte de contaminação era um dos reservatórios de água da cidade que estava contaminado por fezes de um gato que estava eliminando oocistos de toxoplasma (BRASIL, 2002).

Em fevereiro de 2006 ocorreu outro surto de toxoplasmose, no município de Goiânia – Goiás, onde foram confirmados 11 casos da doença por resultados laboratoriais. Essas pessoas participaram de uma festa de confraternização em um restaurante da cidade. O alimento suspeito foi comprado de uma casa de carnes de Goiânia, e esse mesmo estabelecimento vendeu alimento para uma festa em

Anápolis-GO, onde também houve um surto de toxoplasmose no mesmo período (Ministério de Saúde, 2006).

Outro surto relatado foi devido à ingestão de leite de cabra não pasteurizado e nem fervido, onde três membros de uma mesma família apresentaram sintomas de toxoplasmose aguda confirmados por exame laboratorial. Foram detectados anticorpos anti-*Toxoplasma* nos caprinos e taquizoítos foram isolados, por inoculação em camundongos, do leite de um destes animais (CHIARI e NEVES, 1984).

#### 2.4 – INFECÇÕES POR *Toxoplasma gondii* EM CAPRINOS NO MUNDO E NO BRASIL

Feldman & Miller (1956) foram os primeiros a relatar toxoplasmose em caprinos. Neste trabalho, eles verificaram prevalência de 43% de anticorpos anti-*T. gondii* em dois grupos de caprinos na área central de Nova Iorque, EUA.

A partir daí, a doença tem sido identificada como uma das maiores causas de problemas reprodutivos em ovinos e caprinos na Grã-Bretanha, Noruega, Austrália, Nova Zelândia, EUA, assim como em diversos outros países (BLEWETT & WATSON 1984, DUBEY & BEATTIE 1988, SKJERVE *et al.*, 1998, BORDE *et al.*, 2006). Estudo conduzido no Uruguai apontou a toxoplasmose como importante problema nos ovinos, promovendo prejuízos anuais de US\$1,4 a 4,7 milhões (FREYRE *et al.*, 1999). Munday & Mason (1979) foram os primeiros a descrever a toxoplasmose como importante causa de prejuízos reprodutivos em caprinos e, apesar de menos documentada nesta espécie, aparentemente os danos são maiores, acometendo clinicamente também animais adultos (DUBEY, 1987).

Na década de 90 na Espanha, demonstrou-se que 63,31% dos caprinos apresentaram reação positiva para *T. gondii*, usando-se o teste ELISA (RODRIGUEZ-PONCE *et al.*, 1995). Em 1996, Hashemi-Fesharki relatou uma taxa de prevalência de 19,3% no Irã. Já Nieto & Melendez relataram prevalência de 5,9% no estado de Lara, Venezuela, em 1998.

Na África, em Uganda, foram encontrados 31% de caprinos positivos de um total de 784 testados por ELISA (BISSON *et al.*, 2000). E em Gana, a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* foi determinada por Van der Puije *et al.* em 2000 e 26,8% de positividade do total de 526 caprinos foi encontrada pela mesma técnica.

Entre os anos de 1999 e 2002, na ilha de Sardenha, Itália, foram coletadas 2445 amostras de soros caprinos e 100 restos de aborto (88 fetos e 12 placentas) de 94 fazendas. Os soros foram testados por RIFI para IgG e IgM, diluição de 1:200 e 1:20 respectivamente. Foram encontrados soros positivos em 12,3% para IgG e 5,6% para IgM. Já das amostras de aborto, de 356 amostras (tecidos muscular, hepático, abomaso, baço, cérebro e placenta) analisadas por PCR, 6,4% deram resultados positivos (MASALA *et al.*, 2003).

Em 2005, Jittapalapong e colaboradores relataram prevalência de 27,9% de caprinos com sorologia positiva para *Toxoplasma* pelo teste de aglutinação em látex, de um total de 631 animais testados da província de Satun, Tailândia.

Na Malásia, em 2008, Chandrawathani *et al.* relataram uma soroprevalência de 35,5% de 200 caprinos testados pelo método de RIFI. Já no estado de Borno, Nigéria, Kamani *et al.* (2009) encontraram uma soroprevalência de 4,6% de 372 soros caprinos testados pelo método ELISA.

No Brasil, as taxas de infecção apontadas para rebanhos caprinos são também variáveis, esta variabilidade se deve principalmente aos testes sorológicos utilizados, à região e à idade dos animais estudados (SILVA *et al.*, 2003). Para poder melhor dimensionar as prevalências da toxoplasmose caprina no Brasil, tabulou-se os dados por região e por ano (TABELA 1). Na tabela 2 e 3 estão dados sobre toxoplasmose em outros animais domésticos em diversas regiões do mundo.

TABELA 1 – TOXOPLASMOSE EM CAPRINOS NO BRASIL, ORDENADO POR ESTADO E POR ANO

<b>Autor, ano</b>	<b>Região</b>	<b>Total de animais testados</b>	<b>Percentuais positivos</b>	<b>Técnica usada (ponto de corte)</b>
Neto <i>et al.</i> , 2008	RN	366	30,6	RIFI (64)
Silva <i>et al.</i> , 2003	PE	213	40,4	RIFI (16)
Alves <i>et al.</i> , 1997	PB	631	0 a 26,8	RIFI
Faria <i>et al.</i> , 2007	PB	306	24,5	RIFI (64)
Cavalcante <i>et al.</i> , 2008	CE	2362	25,1	ELISA
Amaral <i>et al.</i> , 1978	BA	100	10	HAI
Pita-Gondin <i>et al.</i> , 1999	BA	439	28,93	Aglutinação em látex (64)
Uzêda <i>et al.</i> , 2004	BA	373	16,35	RIFI (16)
Machado e Lima, 1987	MG	372	36,8	RIFI (16)
Chiari <i>et al.</i> , 1987	MG	343	68	RIFI
Chiari <i>et al.</i> , 1987	MG - Belo Horizonte		92,4	RIFI
Figueiredo <i>et al.</i> , 2001	MG	174	19	HAI
Figueiredo <i>et al.</i> , 2001	MG	174	19,5	RIFI (64)
Figueiredo <i>et al.</i> , 2001	MG	174	19,5	ELISA
Carneiro, 2006	MG	767	43	ELISA
Carneiro, 2006	MG	767	46	RIFI (64)
Serra-Freire <i>et al.</i> , 1994	RJ		15,84	RIFI
Mainardi <i>et al.</i> , 2000	SP	442	14,47	RIFI (16)
Silva <i>et al.</i> , 2002	SP	100	8	RIFI
Silva <i>et al.</i> , 2002	SP	100	11	MAD
Meireles <i>et al.</i> , 2003	SP	200	17	ELISA
Figliuolo <i>et al.</i> , 2004	SP	394	28,68	RIFI (64)
Modolo <i>et al.</i> , 2008	SP	923	23,4	RIFI (16)
Sella <i>et al.</i> , 1994	PR	153	30,71	RIFI (64)
Maciel, 2004	RS	360	19,4	HAI
Maciel, 2004	RS	360	30	RIFI

TABELA 2 – TOXOPLASMOSE EM OUTROS ANIMAIS DE PRODUÇÃO E EM PRODUTOS CÁRNEOS, ORDENADO POR ESPÉCIE ANIMAL, REGIÃO GEOGRÁFICA E ANO

Autor, ano	Região	Total animais	% positivo	Técnica utilizada	Espécie
Van der Puije <i>et al.</i> , 2000	Gana	732	33,2	ELISA	Ovina
Masala <i>et al.</i> , 2003	Sardenha, Itália	7194	2048	RIFI (200)	Ovina
Kamani <i>et al.</i> , 2009	Nigéria	372	6,7	ELISA	Ovina
Pita-Gondin <i>et al.</i> , 1999	BA	240	18,75	Aglutinação em látex (64)	Ovina
Silva <i>et al.</i> , 2003	PE	173	35,3	RIFI (16)	Ovina
Langoni <i>et al.</i> , 1999	SP	352	55,1	RIFI	Ovina
Langoni <i>et al.</i> , 1999	SP	352	30,4	HAI	Ovina
Silva <i>et al.</i> , 2002	SP	100	23	RIFI	Ovina
Silva <i>et al.</i> , 2002	SP	100	27	MAD	Ovina
Carneiro, 2006	MG	711	31	ELISA	Ovina
Carneiro, 2006	MG	711	43	RIFI (64)	Ovina
Freire <i>et al.</i> , 1995	PR		47,8	RIFI (64)	Ovina
Garcia <i>et al.</i> , 1999	PR	228	51,8	RIFI (64)	Ovina
Ogawa <i>et al.</i> , 2003	PR	339	54,6	RIFI (64)	Ovina
Moura <i>et al.</i> , 2007	PR	157	7	RIFI (64)	Ovina
Thomaz-Soccol <i>et al.</i> , 2009	PR	167	25,75	ELISA	Ovina
Larson <i>et al.</i> , 1980	RS	100	39	RSF (16)	Ovina
Chandrawathani <i>et al.</i> , 2008	Malásia	100	0	RIFI (200)	Suína
Bonna <i>et al.</i> , 2006	RJ	38	65,8	RIFI	Suína
Garcia <i>et al.</i> , 1999	PR	267	24	RIFI (64)	Suína
Fialho & Araujo, 2002	RS	240	33,75	RIFI	Suína
Fialho & Araujo, 2002	RS	240	20	HAI	Suína
Tsutsui <i>et al.</i> , 2003	PR	521	15,35		Suína
Moura <i>et al.</i> , 2007	PR	117	8,54	RIFI (64)	Suína
Chandrawathani <i>et al.</i> , 2008	Malásia	126	8	RIFI (200)	Bovina
Pita-Gondin <i>et al.</i> , 1999	BA	194	1,03	Aglutinação em látex (64)	Bovina
Garcia <i>et al.</i> , 1999	PR	400	25,8	RIFI (64)	Bovina
Pita-Gondin <i>et al.</i> , 1999	BA	104	3,85	Aglutinação em látex (64)	Búfalos
Gazêta <i>et al.</i> , 1997	RJ	430	4,42	RIFI (16)	Eqüina
Garcia <i>et al.</i> , 1999	PR	173	12,1	RIFI (64)	Eqüina
Bonna <i>et al.</i> , 2006	RJ	316	47,8	RIFI	Aves
Garcia <i>et al.</i> , 2000	PR	155	10,3	RIFI (16)	Aves
Navarro <i>et al.</i> , 1992	PR		19		Carnes açougue
Dias <i>et al.</i> , 2005	PR	149	8,7	Bioensaio em camundongo	Lingüiça suína

TABELA 3 – TOXOPLASMOSE EM CÃES E GATOS, ORDENADO POR ESPÉCIE ANIMAL, REGIÃO GEOGRÁFICA E ANO

Autor, ano	Região	Total animais	% positivo	Técnica utilizada	Espécie
Chandrawathani <i>et al.</i> , 2008	Malásia	135	9,6	RIFI (200)	Canina
Silva <i>et al.</i> , 1997	MG	40	22,5	IHA	Canina
Silva <i>et al.</i> , 1997	MG	40	35	RIFI (64)	Canina
Silva <i>et al.</i> , 1997	MG	40	35	ELISA	Canina
Silva <i>et al.</i> , 1997	MG	40	30	PA-ELISA	Canina
Domingues <i>et al.</i> , 1998	SP	276	46,01	RIFI (40)	Canina
Domingues <i>et al.</i> , 1998	SP	276	62,5	ELISA	Canina
Higa <i>et al.</i> , 2000	SP	203	81,28	ELISA	Canina
Higa <i>et al.</i> , 2000	SP	203	35,96	RIFI	Canina
Silva <i>et al.</i> , 2002	SP	100	19	MAD	Canina
Silva <i>et al.</i> , 2002	SP	100	18	RIFI	Canina
Souza <i>et al.</i> , 2003	SP urbano domicílio	500	5,2	MAT (1:25)	Canina
Souza <i>et al.</i> , 2003	SP urbano rua	610	31,6	MAT (1:25)	Canina
Ortolani <i>et al.</i> , 2005	SP	29	82,8	RIFI (16)	Canina
Ortolani <i>et al.</i> , 2005	SP	61	57,4	RIFI (16)	Canina
Freire <i>et al.</i> , 1992	PR		77,3		Canina
Souza <i>et al.</i> , 2003	PR rural	134	34,3	MAT (1:25)	Canina
Chandrawathani <i>et al.</i> , 2008	Malásia	55	8	RIFI (200)	Felina
Silva <i>et al.</i> , 2002	SP	100	18	RIFI	Felina
Silva <i>et al.</i> , 2002	SP	100	19	MAD	Felina
Ortolani <i>et al.</i> , 2005	SP	3	33,33	RIFI (16)	Felina
Ortolani <i>et al.</i> , 2005	SP	25	56	RIFI (16)	Felina
Vargas, 2006	PR	145	17,2	RIFI (64)	Felina

## 2.5 – PATOGENIA/PATOLOGIA

Quadros clínico-patológicos diversos tem sido associados com a doença. Entretanto, perdas reprodutivas tais como morte embrionária, morte fetal, mumificação, aborto em diferentes idades gestacionais, natimortalidade e morte neonatal são os achados mais comuns. Esses quadros de aborto e mortalidade neonatal ocorrem quando pequenos ruminantes sofrem infecção primária durante a gravidez (DUBEY & BEATTIE, 1988).

Oocistos esporulados de *T. gondii*, ingeridos por animais gestantes suscetíveis, desencenam no trato digestivo e liberam esporozoítos para penetrarem no epitélio intestinal. Em cerca de quatro dias, organismos podem ser encontrados nos linfonodos mesentéricos, onde se multiplicam causando aumento desses linfonodos, algumas vezes com necrose focal. Pelo quinto dia, toxoplasmas são liberados para fazer a parasitemia, que pode durar até o 12º dia. Coincidindo com a

parasitemia, a fêmea apresenta febre de até 41°C. Muitos tecidos são infectados desta maneira. A parasitemia cessa com a resposta imune materna, e a infecção persiste com os bradizoítos em cistos teciduais.

Em fêmeas gestantes, o útero é um local imunologicamente privilegiado. No útero a resposta imunológica materna é suprimida, enquanto a habilidade do feto, com a placenta, em reconhecer e responder ao patógeno inicia durante a primeira metade da gestação e se desenvolve durante o restante da gravidez, assim os animais são imunocompetentes ao nascimento. Durante a parasitemia do *T. gondii* na mãe, os taquizoítos são capazes de parasitar o septo caruncular, o tecido materno do placentoma. Lá eles invadem células adjacentes nas vilosidades fetais, e daí o resto do feto, cerca de 5 a 10 dias do início da parasitemia. Entretanto, as conseqüências da infecção dependem do estágio da gestação em que começou (BUXTON, 1990).

Infecções no início da gestação são fatais devido à ausência de resposta imune fetal em inibir a multiplicação parasitária. Conseqüentemente, a reabsorção embrionária pode ser confundida com infertilidade. Infecção no meio da gestação também pode ser fatal e dar origem a fetos mumificados junto com irmãos que nascem vivos, mas fracos ou morrem no final da gestação. Infecção no final da gestação normalmente causa infecção fetal, mas devido à nesta fase a competência do sistema imune do feto estar bem avançada, o parasita vai resistir e o filhote vai nascer vivo, infectado e imune. Quando a infecção no placentoma é iniciada, a multiplicação parasitária causa múltiplos focos de necrose. Esses focos no tecido danificado se expandem ao longo da gestação até o aborto ou nascimento, quando podem ser vistos macroscopicamente como pontos brancos nos cotilédones da placenta eliminada, uma característica usada para auxiliar no diagnóstico (BUXTON, 1990).

Os sinais clínicos nas mães incluem principalmente anorexia, prostração, febre e mastite (SILVA FILHO *et al.*, 2008). Animais jovens, imunodeprimidos e com infecção sistêmica por *Toxoplasma gondii* geralmente desenvolvem pneumonia intersticial, hepatite necrosante focal, linfadenite, miocardite e meningoencefalite não supurativa. As alterações macroscópicas relatadas foram linfonodos mesentéricos pálidos e aumentados e pulmões com edema e áreas avermelhadas intercaladas com áreas claras. Na microscopia, as alterações do sistema nervoso central foram encefalite não supurativa multifocal com necrose, meningoencefalite não supurativa

multifocal moderada, associada à meningite não supurativa focalmente extensa e acentuada, gliose multifocal leve e mielite não supurativa multifocal moderada. Dois padrões de pneumonia foram relatados: pneumonia intersticial piogranulomatosa difusa moderada com presença de células gigantes e pneumonia intersticial mononuclear com área de necrose difusa moderada. Hepatite mononuclear peritoneal leve, miocardite mononuclear leve, nefrite intersticial mononuclear multifocal moderada e linfadenite granulomatosa multifocal acentuada (PESCADOR *et al.*, 2007).

## 2.6 – DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

O diagnóstico da toxoplasmose é feito por métodos biológicos, sorológicos, histológicos ou moleculares, ou por alguma combinação destes. Sinais clínicos da toxoplasmose não são específicos e não são suficientemente característicos para um diagnóstico definitivo. Na verdade, os sinais da toxoplasmose imitam sinais de várias outras doenças infecciosas.

*Toxoplasma gondii* pode ser isolado de pacientes através da inoculação, em animais de laboratório ou cultura de tecidos, de secreções, excreções, fluidos corporais, tecidos retirados por biopsia e tecidos com lesões macroscópicas, removidos *post-mortem*. Usando tais amostras, é possível não apenas isolar o *T. gondii*, como também achá-los microscopicamente, ou encontrar DNA toxoplásmico usando PCR (HILL & DUBEY, 2002).

Deteção de anticorpos anti-*T. gondii* em pacientes pode auxiliar no diagnóstico. Existem diversos exames sorológicos disponíveis para detectar anticorpos humorais; esses incluem reação de Sabin-Feldman ou teste do corante, hemaglutinação indireta (HAI), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta, teste de aglutinação em látex, ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de aglutinação por imunoabsorção (ISAGA) (HILL *et al.*, 2005). Destes, RIFI, ELISA e ISAGA foram modificados para detectar imunoglobulinas M (IgM), que aparecem logo no início da infecção, antes da IgG, e desaparecem antes da IgG, após a recuperação (REMYINGTON *et al.*, 1995).

Devido às limitações e dificuldades das técnicas parasitológicas, os métodos sorológicos são os mais comumente usados para o diagnóstico da toxoplasmose. Diferentes padrões de resposta de anticorpos caracterizam a fase aguda (perfil I), a fase de transição (perfil II) e a fase crônica da infecção (perfil III). O perfil I

caracteriza-se pela presença de anticorpos da classe IgM, IgA, IgE e IgG contra o parasita, por altos títulos de IgG ou rápida elevação de títulos ao se obter amostras pareadas com intervalos de duas semanas. Esses anticorpos IgG de fase aguda são em geral de baixa avidéz, característica que pode ser avaliada em ELISA com algumas modificações. No perfil de transição (perfil II), encontram-se altos títulos de anticorpos da classe IgG, com avidéz crescente, na ausência das classes IgA e IgE. Anticorpos IgM podem estar presentes em baixos títulos. Este perfil é gradativamente substituído em algumas semanas ou meses por aquele encontrado em infecções crônicas ou latentes (perfil III), que se mantém por décadas. Encontram-se aqui baixos títulos de anticorpos IgG de alta avidéz na ausência de anticorpos das demais classes (FERREIRA *et al.*, 2003).

**Reação de Neutralização de Sabin:** É executada na pele dorsal de coelhos. Soros com anticorpos específicos impedem o desenvolvimento de lesão provocada por inoculação intradérmica do parasita. A inoculação realizada somente com toxoplasmas determina uma zona eritematopapular ou papulonecrótica, enquanto que a existência no soro injetado de anticorpos toxoplásmicos neutralizantes impede o aparecimento desta lesão cutânea (teste positivo). Essa prova praticamente não é mais utilizada atualmente, pois não distingue toxoplasma doença de infecção sem evidência de atividade, porém serviu de base para o desenvolvimento do teste do corante (AMATO NETO *et al.*, 1995).

**Reação de Sabin-Feldman ou Teste do Corante:** nesse teste, os parasitas são postos em reação com soro contendo anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* mais proteínas do complemento, sofrendo lise e incorporando corantes, como o azul de metileno, empregados para evidenciar a reação. É um teste altamente sensível e específico, mas devido a sua complexidade de realização e o risco de exposição ao parasita, este teste tornou-se inviável em rotina laboratorial, exceto em laboratórios de pesquisa e referência (REMINGTON *et al.*, 1995).

**Reação de Fixação do Complemento:** é um método de diagnóstico trabalhoso e que sofre influxo de muitas variáveis, caindo para o desuso. Para sua execução são empregados antígenos diversos, preparados segundo diferentes modalidades (suspensão de cérebro de coelho, ovos embrionados, entre outros). Porém, a grande dificuldade na preparação e padronização desses antígenos representa entrave à utilização da técnica, que tem como fundamento a não

hemólise (reação positiva) ou hemólise (reação negativa) das hemácias de carneiro conjugadas a anticorpos preparados em coelhos, complexo denominado hemolisina frente ao soro humano para ligação ao complemento. A titulação precisa tanto da hemolisina quanto do complemento (oriundo de cobaias), outro fator delimitante para resultados confiáveis, assim como problemas de anticomplementariedade (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

**Reação de Hemaglutinação Indireta (HAI):** Excelente método de diagnóstico, devido à sua alta sensibilidade e simplicidade de execução. Entretanto, é inadequado para o diagnóstico precoce e, freqüentemente, não detecta toxoplasmose congênita em recém-nascidos. É um método adequado para levantamento epidemiológico (ANDRADE *et al.*, 2004).

A prova realizada em microplacas escavadas com orifícios em forma de “V” tem como princípio que: hemácias de aves sensibilizadas com extrato solúvel de taquizoítos de *T. gondii* formam suporte para ligação, possibilitando a formação de pontes moleculares na presença do anticorpo específico; a ausência destes anticorpos no soro impossibilita a formação das pontes antigênicas, facilitando a sedimentação das hemácias dando um resultado negativo (CAMARGO *et al.*, 1991).

**Reação da Imunofluorescência Indireta (RIFI):** é um método de fácil execução, boa sensibilidade e especificidade, sendo muito utilizado em laboratórios de rotina e permite a detecção de anticorpos classe IgM e IgG. Há a necessidade do uso de microscópios específicos, de alto custo, e exige um bom anticorpo, o isotiocionato de fluoresceína, que é adquirido por alto preço. Outra desvantagem dessa técnica é devido à subjetividade na avaliação da fluorescência emitida durante a leitura das lâminas, o que faz com que diagnosticistas pouco treinados possam interpretar os dados erroneamente.

A reação de imunofluorescência indireta é realizada fixando-se à lâmina antígeno constituído de taquizoítos, sobre este o soro a ser testado e, após incubação, um anticorpo fluorescente (conjugado) de especificidade dirigida para os epítomos do anticorpo ligado ao antígeno. Esse anticorpo fluorescente tem especificidade para a imunoglobulina que se quer pesquisar, permitindo detectar qual classe de anticorpo está circulante no organismo, determinando a fase em que se encontra a infecção (FRENKEL, 1988).

**Imunoensaio Enzimático (ELISA):** O Imunoensaio enzimático ou teste ELISA tem se tornado um dos testes mais usados atualmente, principalmente para

*screening* inicial de toxoplasmose em seres humanos. Tem a vantagem sobre a RIFI pela objetividade, automação e quantificação. Apresenta mais sensibilidade sobre os testes de RIFI e RSF, porém, pode apresentar resultado falso-positivo. É capaz de detectar anticorpos IgM, IgA, além de IgG de baixa avidéz. O uso do ELISA com antígenos recombinantes tem se mostrado útil para detecção da fase aguda da infecção (NEVES, 2005).

A reação indireta é desenvolvida em placas de plástico contendo séries de pocinhos onde os antígenos estão adsorvidos, sendo adicionados os soros a serem testados, anticorpos antiimunoglobulinas marcados com a enzima substrato e, por fim, um bloqueador que cesse o processo colorimétrico. Determinações podem ser feitas por leitura visual, mas o emprego da leitura espectrofotométrica fornece resultados mais precisos (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

Suas principais desvantagens são sua maior complexidade e os problemas para purificação e padronização dos diversos reagentes, além de um equipamento inicial de alto custo.

Outras provas sorológicas, como a de floculação, inibição de fluorescência, aglutinação e precipitação, não têm merecido uso amplo, devido a vários motivos e, sobretudo, como decorrência de pouca praticidade ou falta de segurança quanto aos resultados fornecidos (VERONESI, 2002).

É imprescindível mencionar que exames neurológicos como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética têm trazido valiosos recursos para o diagnóstico da neurotoxoplasmose, sobretudo em pacientes com AIDS, nos quais as provas sorológicas por vezes são inconclusivas (PASSOS *et al.*, 2000).

**Métodos moleculares:** nos últimos 15 anos, o diagnóstico de agentes infecciosos inclui o uso de tecnologia que envolve o uso de ácidos nucléicos. Avanços recentes no conhecimento do genoma do *T. gondii* tornaram possível a utilização da PCR (Polimerase Chain Reaction) para a detecção do parasito. Amostras de sangue testadas para se investigar parasitemia por ensaios de PCR, amplificando segmentos dos genes B1 e P30 de *T. gondii* mostraram o potencial da técnica para o diagnóstico não invasivo da toxoplasmose disseminada. Foi demonstrado que a sensibilidade e a especificidade da PCR amplificando o gene B1 de parasitos presentes em líquido amniótico foram de 100%, em contraste com a inoculação de sangue fetal ou líquido amniótico em camundongos e culturas. Assim,

a PCR revolucionou o diagnóstico pré-natal de toxoplasmose congênita, uma vez que limita o uso de métodos invasivos no feto (KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2005).

Diversos estudos demonstraram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de fluidos corporais diferentes, tais como sangue, líquido amniótico, liquor, humor aquoso, fluido de lavado bronco-alveolar e até urina. Por outro lado, a PCR só será positiva em casos de parasitemia, assim em casos de toxoplasmose cerebral, a PCR será de utilidade apenas quando houver disseminação ou passagem do parasito para o sangue, tal como ocorre na etapa aguda desta parasitose.

Numerosos ensaios têm sido desenvolvidos, mas nenhum foi suficientemente otimizado e validado com um número grande de indivíduos. O diagnóstico por PCR para toxoplasmose está longe de ser padronizado e ainda não se tem um consenso que defina as condições do método.

## 2.7 – CAPRINOCULTURA NO PARANÁ

Estima-se que no Brasil existam 7.107.608 caprinos (IBGE, 2006). No período de 1970 a 2006, o efetivo total de caprinos do país teve um aumento de 35% (TABELA 4). A região Nordeste é a detentora da maior parte dos caprinos, concentrando em torno de 93% do rebanho caprino brasileiro, a região Sul conta com 2% desse total (MARTINS, 2006).

Pelo censo agropecuário de 2006 do IBGE, no Paraná existem 7.639 estabelecimentos criadores de caprinos e um total de 125.252 cabeças (TABELA 4). A caprinocultura no estado está numa fase de reestruturação, com aumento do rebanho e com produção principalmente de animais de corte. Além das propriedades que visam a comercialização de matrizes e reprodutores de raças puras de corte, há criações com finalidade de produção de carne ou mista (carne e leite) (Cristina Sotomaior – comunicação pessoal), sendo que criações exclusivamente leiteiras são pouco comuns e a produção de leite de cabra está em declínio (TABELA 5).

TABELA 4 – EFETIVO DE CAPRINOS EM ESTABELECIMENTOS AGROPECUÁRIOS NO BRASIL, REGIÃO SUL E PARANÁ – SÉRIE HISTÓRICA

	Ano					
	1970	1975	1980	1985	1995	2006
<b>Brasil</b>	5.708.993	6.709.428	7.908.147	8.207.942	6.590.646	7.107.608
<b>Sul</b>	387.853	278.830	361.429	300.154	151.296	261.559
<b>Paraná</b>	254.880	169.985	233.337	170.105	66.692	125.252

FONTE: IBGE, 2006

TABELA 5 – PRODUÇÃO DE LEITE DE CABRA (MIL LITROS) EM ESTABELECIMENTOS AGROPECUÁRIOS NO BRASIL, REGIÃO SUL E PARANÁ – SÉRIE HISTÓRICA

	Ano				
	1975	1980	1985	1995	2005
<b>Brasil</b>	13.394	25.527	35.834	21.900	35.740
<b>Sul</b>	1.263	1.936	2.427	1.058	1.569
<b>Paraná</b>	976	1.453	2.027	346	358

FONTE: IBGE, 2006

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – ÁREA DE ESTUDO

A área estudada foi a Mesorregião Metropolitana de Curitiba (FIGURA 2), localizada no leste do estado do Paraná – Brasil, coordenadas aproximadas 25°25'40" S e 49°16'00" O.



FIGURA 2 – MAPA GEOPOLÍTICO DO PARANÁ INDICANDO A MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA

FONTE: [www.o-parana.com](http://www.o-parana.com)

#### 3.2 – AMOSTRAGEM DE SORO DE CAPRINOS PARA ESTUDO

O tamanho aproximado da amostra necessária para calcular a prevalência de uma doença em uma grande população (teoricamente infinita) pode ser determinado por precisão e nível de confiança definidos (THURSFIELD, 2004). Para definir a amostragem dos animais para a realização do presente estudo, utilizou-se para calcular a prevalência e frequência esperada da infecção a fórmula abaixo, relevante para um intervalo de confiança de 95%.

$$n = \frac{1,96^2 P_{\text{esp}} (1 - P_{\text{esp}})}{d^2}$$

onde: n = tamanho necessário da amostra

$P_{\text{esp}}$  = prevalência esperada

d = precisão absoluta desejada

Para a toxoplasmose caprina a prevalência esperada da infecção varia entre 10 a mais de 90% em diversas regiões do Mundo e do Brasil. Assim, para este trabalho, foi considerada uma prevalência esperada de 50%, para poder calcular a amostragem a ser coletada.

### 3.3 – COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue foi realizada por venopunção jugular (FIGURA 3) em tubos a vácuo sem anticoagulante, previamente identificados. As amostras foram centrifugadas a 428 g por 10 minutos e após separação do soro, colhido com pipeta Pasteur, foi transferido para tubos de 2ml e armazenados em freezer a temperatura de -20°C até o momento de realização dos testes sorológicos.

Na ocasião da coleta, foi aplicado um questionário epidemiológico para cada propriedade (ANEXO 1), contendo informações relevantes para o estudo, tais como: identificação da propriedade, localização, tipo de exploração, total de animais, alimentação dos animais, manejo sanitário, manejo reprodutivo, presença de gatos, tipo de instalação, finalidade da criação, sexo e idade dos animais.

Os animais foram separados por faixa etária em abaixo de um ano, entre um e três anos e acima de três anos. A verificação da idade foi feita conforme Ribeiro (1998).



FIGURA 3 – COLETA DE SANGUE DE CAPRINOS POR VENOPUNÇÃO JUGULAR

### 3.4 – OBTENÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* PARA PRODUÇÃO DE ANTÍGENO

Para a produção dos antígenos de *T. gondii* foi usada a cepa RH padrão do protozoário que foi gentilmente cedida pelo professor Itamar T. Navarro da Universidade Estadual de Londrina. O antígeno foi produzido *in vivo* em camundongos *Swiss webster* e *in vitro* em cultivo celular.

#### 3.4.1 – Cultivo *in vivo*

O cultivo de *T. gondii* em camundongos foi feito inoculando-se 0,2 ml de solução salina fisiológica contendo taquizoítos de *T. gondii*, via intraperitoneal em camundongos suíços albinos de 40 dias de idade. Após 48 horas da inoculação, os animais foram eutanasiados sob anestesia e foi feita lavagem da cavidade peritoneal, inoculado 2 a 3 ml de salina fisiológica estéril no camundongo eutanasiado, via intraperitoneal, aspirado o exsudato peritoneal e reservado. Em cada camundongo, o processo era repetido três vezes (FIGURA 4). Uma gota dessa solução era colocada entre lâmina e lamínula e observada em microscópio ótico no aumento de 400 x para verificar a infecção e a integridade dos taquizoítos (FIGURA 5). Parte dessa solução era usada para reinoculação em novos camundongos contendo as mesmas características descritas acima. Cada inoculação era feita em dois animais.

Os procedimentos utilizados no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (ANEXO 2).



FIGURA 4 – INOCULAÇÃO DE SOLUÇÃO DE TAQUIZOÍTOS EM CAMUNDONGOS E LAVAGEM PERITONEAL PARA OBTENÇÃO DE SOLUÇÃO CONTENDO TAQUIZOÍTOS

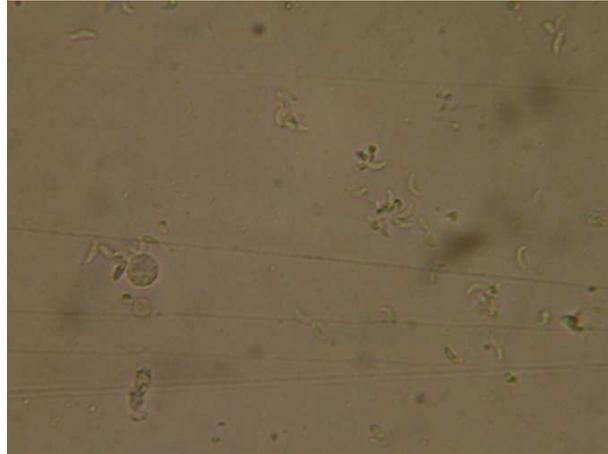


FIGURA 5 – TAQUIZOÍTOS OBTIDOS DE LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS APÓS 48 HORAS DE CULTIVO (AUMENTO DE 400X)

A suspensão de tachizoítos obtida pelo cultivo *in vivo* era passada por uma agulha hipodérmica (15x6) para ruptura dos macrófagos e liberação dos tachizoítos. Em seguida a suspensão era centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos e o sedimento ressuspenso em 1,0 ml de tampão fosfato (PBS) estéril (pH 7,2). Essa suspensão de tachizoítos foi usada para produção de antígeno íntegro e solúvel. Parte dessa solução foi congelada conforme descrito por Castro, 2001 e mantida em nitrogênio líquido, no crio banco de parasitos, para uso futuro (ANEXO 3).

### 3.4.2 – Cultivo *in vitro*

#### 3.4.2.1 – Cultivo celular

O cultivo celular para obtenção de tachizoítos foi feito com células vero, que são células de rim de primatas e apresentam características similares às células epiteliais, com forma poligonal e modo de crescimento aderente, formando uma camada contínua no frasco de cultivo, a monocamada ou tapete celular. A cultura dessas células pode ser usada para cultivo de parasitas intracelulares. O protocolo seguido foi aquele descrito por Dittrich (2002).

Antes da produção de tachizoítos de *Toxoplasma gondii* em células vero, foi realizado o cultivo das células vero em frasco de cultura. As células foram descongeladas rapidamente e inoculadas no frasco de cultura contendo meio de cultura. O meio de cultura era composto por uma solução de RPMI Medium 1640 (GIBCO™) contendo 2% de bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os frascos foram então deixados em estufa de gás carbônico a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até o crescimento das células e o estabelecimento da monocamada

(FIGURA 6). A avaliação, e crescimento ou contaminação, era realizada em microscópio invertido nos aumentos de 250 e 400 vezes.

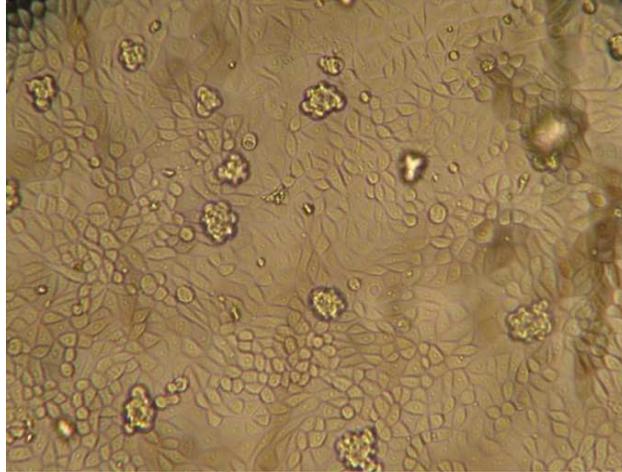


FIGURA 6 – MONOCAMADA DE CÉLULAS VERO ANTES DA INOCULAÇÃO DE TAQUIZOÍTAS

Após o estabelecimento da monocamada, foi feito o subcultivo, repassando as células formadas para outros frascos de cultivo (previamente esterilizados). O meio de cultura velho era descartado e a garrafa lavada com PBS (pH 7,2) para remover resquícios do soro fetal. Então era adicionada uma solução de tripsina a 0,25% em quantidade suficiente para cobrir a monocamada. Os frascos com tripsina eram postos em estufa a 37°C, por três minutos, onde a tripsina agia desprendendo a monocamada do frasco e separando as células. Após verificar em microscópio invertido que a monocamada se desprendia e as células estavam soltas, era adicionado 20 ml de meio de cultura estéril no frasco, e essa solução era dividida em 4 frascos novos que eram deixados em estufa de gás carbônico a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Este procedimento era realizado em fluxo laminar para evitar contaminação do cultivo. Além disso, foi usado antibiótico (gentamicina 5µl/ml) e antimicótico (fungizon 10µl/ml) para evitar contaminação. Parte da solução contendo células vero foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, em banco de células, para uso futuro (ANEXO 4).

#### 3.4.2.2 – Cultivo de *Toxoplasma gondii in vitro*

Nas garrafas de cultivo contendo a monocamada de células vero já estabelecida, após substituir o meio de cultura velho por meio novo, foram

adicionados 0,5 ml da solução contendo  $10^7$  taquizoítos produzida *in vivo* e deixada na estufa de gás carbônico a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Esses frascos eram observados diariamente, tanto macroscopicamente como microscopicamente, para verificar se houve crescimento de colônias de bactérias e verificar a destruição da monocamada de células vero provocada pelos taquizoítos. Quando mais de  $\frac{3}{4}$ , da monocamada estava destruída (FIGURA 7), o meio era removido para um tubo de falcon de 50 ml, a garrafa raspada com uma haste de borracha e lavada com PBS estéril, pH 7,2, e esse PBS colocado no mesmo tubo de falcon. Esse líquido era passado por uma agulha 15x6 para o rompimento das células vero inteiras, colocado entre lâmina e lamínula e observado em microscópio ótico para verificar a presença de taquizoítos. Então era centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento diluído em PBS e usado para produção de antígeno íntegro ou solúvel ou armazenado a 4°C por no máximo três dias.

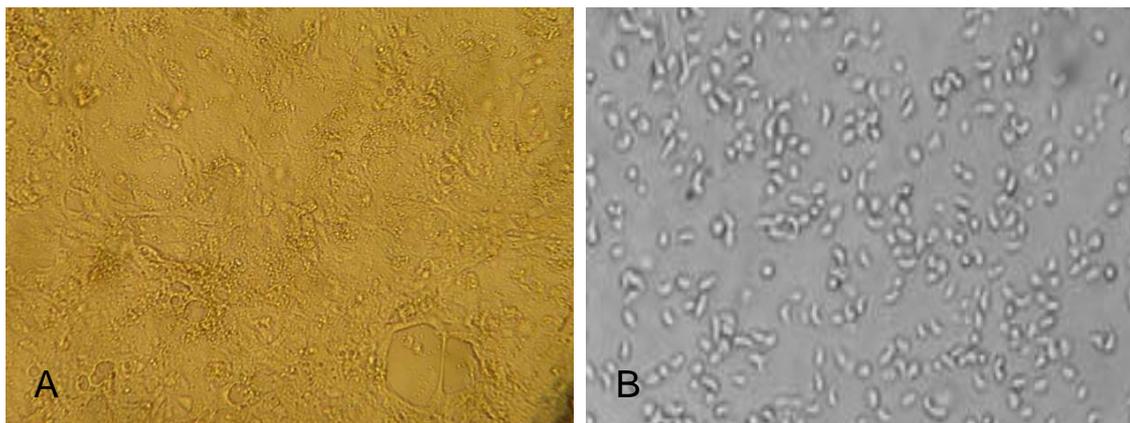


FIGURA 7 – (A) DESTRUIÇÃO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS VERO POR TAQUIZOÍTOS DE *T. gondii* (100x) E (B) TAQUIZOÍTOS EM AUMENTO DE 400x

### 3.5 – PRODUÇÃO DE ANTÍGENO ÍNTEGRO DE *Toxoplasma gondii* PARA RIFI

Para a produção do antígeno íntegro de *T. gondii*, foi adicionado, para cada 10 ml da solução de taquizoítos, 0,2 ml de formol de forma a obter uma solução final de formol a 2%. Essa solução, em um tubo com tampa, era incubada em estufa a 37°C por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos por inversão. Após essa solução era centrifugada a 428 g por dez minutos para retirada do formol, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em 10 ml de PBS pH 7,2. Este procedimento foi repetido por três vezes. Após a terceira centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 1 ml de PBS. Então era feita a contagem de

taquizoítos em câmara de Thoma para verificar a concentração de taquizoítos por ml de solução. Após a contagem era feita a diluição da solução em PBS pH 7,2 a fim de obter a melhor diluição. A sensibilização da lâmina com o antígeno foi feita colocando 20µl por spot na lâmina para imunofluorescência. As lâminas eram deixadas em estufa a 37°C para secar e após secas, eram cuidadosamente embaladas em papel ultrafino, acondicionadas em papel alumínio, identificadas e armazenadas a temperatura de -20°C para posterior utilização.

### 3.6 – PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE *Toxoplasma gondii* PARA ELISA

Para a produção de antígeno para o teste ELISA a suspensão de taquizoítos foi submetida a 11 ciclos de congelamento a -196°C em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C em banho Maria. Após este processo, a suspensão foi submetida à ruptura para obtenção de antígeno solúvel, por meio de ultra-som em sonicador marca Bandelin Sonoplus HD 2070, efetuando cinco séries de 30 segundos com intervalos de 1 minuto entre elas em potência de 50%. A suspensão era mantida em gelo durante todo o processo, e após isso, era observada em microscópio ótico em aumento de 400x para verificar a presença de taquizoítos íntegros na suspensão. Esse procedimento de ruptura era repetido até não se observar mais taquizoítos íntegros, ou o número de taquizoítos fosse o mínimo possível. Esse líquido então era centrifugado a 1188 g por 10 minutos, o sobrenadante passado por um filtro bacteriano (0,22µm de diâmetro) e era feita a dosagem protéica.

A dosagem protéica foi feita usando um espectrofotômetro Genova MK3, pelo método direto, com leitura em comprimentos de onda de 280 e 260 nm e baseado no cálculo:  $A_{280} \times 1,55 - A_{260} \times 0,76$ . Conforme consta no manual de operação do aparelho – modo Direct UV.

### 3.7 – MÉTODOS SOROLÓGICOS

#### 3.7.1 – Reação de imunofluorescência Indireta (RIFI)

Este método tem como finalidade a fixação dos anticorpos aos antígenos de membrana dos taquizoítos íntegros. A visualização dessa reação se dá pela adição de um conjugado fluorescente. Em microscopia com raios ultravioleta em fundo escuro, o *T. gondii* encontra-se impregnado de uma fluorescência cuja intensidade

depende da quantidade de anticorpos disponíveis no soro analisado. Os reagentes utilizados para esse teste estão descritos no anexo 5.

A reação de imunofluorescência indireta foi desenvolvida de acordo com o método descrito por Camargo (1964), com algumas modificações (FIGURA 8). Foram considerados positivos os soros de animais que apresentaram uma fluorescência de cor esverdeada, e negativos os não reagentes, quando não havia fluorescência e os parasitos eram vistos de uma cor avermelhada (FIGURA 9). A cada bateria de testes era feito pelo menos um soro controle positivo e um soro controle negativo que serviam como base para comparar os resultados.

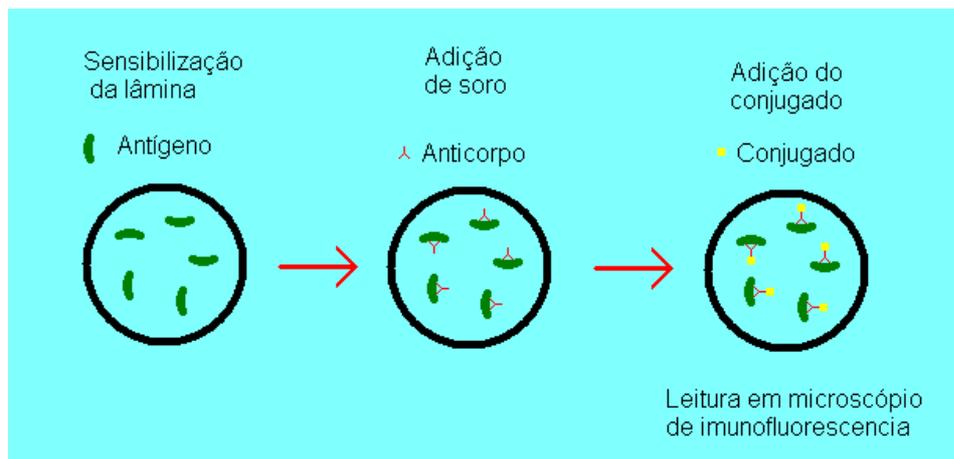


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS PARA REALIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

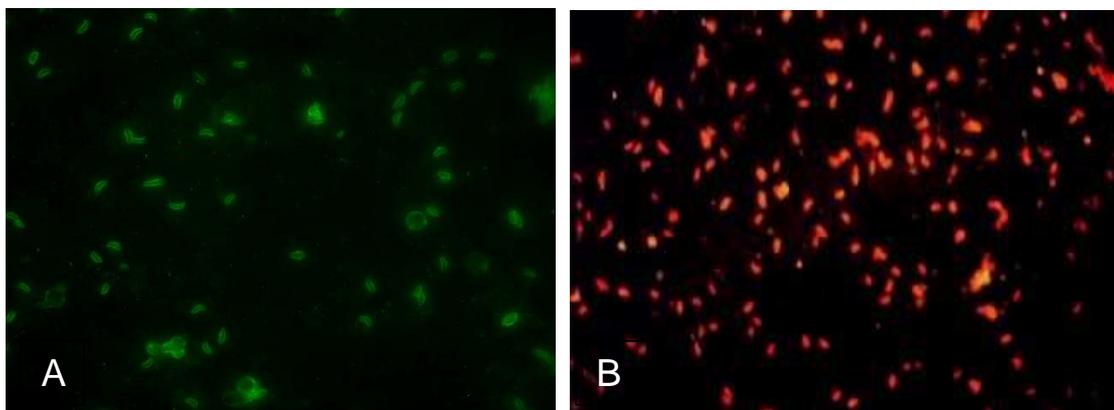


FIGURA 9 – (A) PADRÃO POSITIVO PARA RIFI 400X E (B) NEGATIVO 400X

Para realização do teste, lâminas fixadas com quantidades padrão do antígeno eram utilizadas. Foram testadas lâminas com diferentes concentrações de taquizoítos por  $\mu\text{l}$  (1600, 800, 400, 200, 100, 50 e 25) a fim de verificar qual a melhor concentração a ser utilizada. As lâminas eram retiradas do freezer e deixadas em estufa por dez minutos para secar. Os soros a serem testados eram diluídos em PBS pH 7,2, colocado 20 $\mu\text{l}$  em cada spot da lâmina. As lâminas foram postas em câmara úmida e deixadas em estufa 37°C por 30 minutos. Inicialmente foram usadas as diluições de 1:16 e 1:64 e, naqueles que eram reagentes em diluição 1:64, eram testados também nas diluições de 1:256, 1:1024 e 1:4096. Após o período de incubação as lâminas eram retiradas da câmara úmida e mergulhadas em PBS pH 7,2 por 10 minutos (procedimento repetido duas vezes), retiradas do PBS, lavadas com água destilada e deixadas na estufa para secar.

Então era feita a diluição do conjugado anti-IgG caprina (SIGMA F7367) na diluição de 1:200. O conjugado era diluído em solução de PBS contendo 1% de azul de Evans. Vinte microlitros de solução de conjugado eram postos em cada spot da lâmina e as lâminas incubadas por 30 minutos em estufa a 37°C. Após isso as lâminas eram novamente lavadas em PBS por 10 minutos por duas vezes, lavadas em água destilada e postas para secar.

Depois de secas as lâminas eram montadas com glicerina tamponada e lamínula e procedia-se a leitura. A leitura foi feita em microscópio de imunofluorescência, marca Olympus BX 41, utilizando aumento de 400 vezes. A maior diluição do soro na qual a fluorescência era detectada, em toda a periferia do taquizoíto de *T. gondii*, era determinante do título reagente para o método. As diluições de soro onde o protozoário não apresentava fluorescência, ou esta era localizada em apenas uma das extremidades do parasita, eram consideradas como não reagentes. Os soros só eram considerados como positivos para *T. gondii* quando reagentes na diluição de 1:64 ou acima, sendo que soros reagentes na diluição de 1:16 foram considerados negativos.

### 3.7.2 – Enzimaimunoensaio Indireto (ELISA)

Esse é um teste quantitativo, em que a reação antígeno-anticorpo é monitorada por medida de atividade de uma enzima. É uma reação de cor, onde a coloração é mais intensa quanto maior for a quantidade de anticorpos específicos existentes no soro testado. A reação é desenvolvida em placas contendo 96

pocinhos ou cavidades onde os antígenos são adsorvidos (FIGURA 10). Para que haja manifestação de cor, é necessário que ocorra uma série de eventos em seqüência (PEDRASSANI, 2001).



FIGURA 10 – PLACA DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO

A metodologia compreende quatro passos: sensibilização da placa com o antígeno, adição do soro numa diluição ótima, adição do conjugado para se ligar ao anticorpo pesquisado e a adição do substrato + cromógeno para revelar a reação antígeno/anticorpo/anti-anticorpo (FIGURA 11). Todos os reagentes usados para este teste estão descritos no anexo 6.

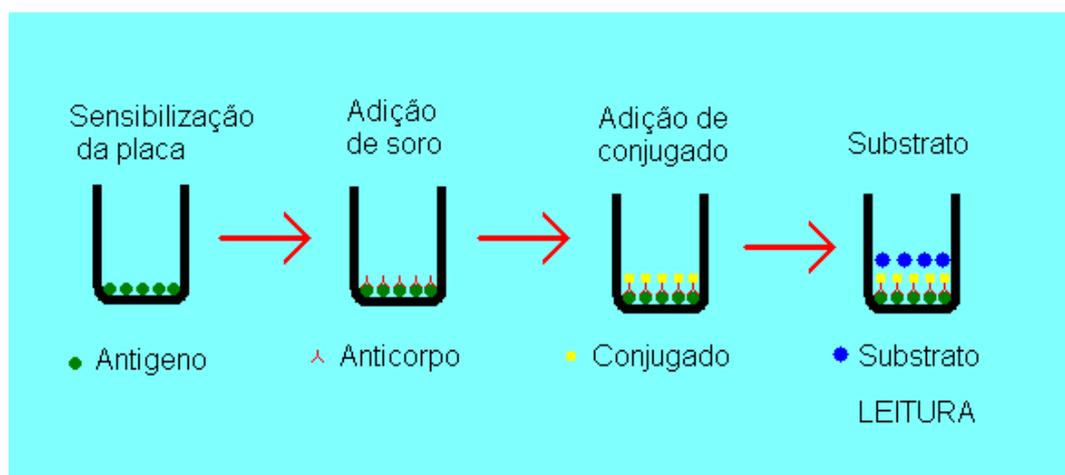


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS SEGUIDAS PARA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO (ELISA)

**Sensibilização da placa.** Este é o processo de fixação do antígeno na placa. A quantidade de antígeno por cavidade é baseada na concentração protéica do antígeno utilizado. É fixada a quantidade de antígeno por poço e a partir daí é feita a diluição do antígeno em solução de “coating buffer”. Para a padronização da concentração protéica de antígeno de *T. gondii* a ser usado, este foi avaliado em diferentes concentrações (1000 e 2000 ng de proteína do antígeno por cavidade) para que fosse estabelecida a concentração mais adequada para o desenvolvimento do ensaio indireto. Foram testados soros controles positivos e negativos frente a essas concentrações.

Usando um multipipetador, era adicionado 100µl da solução antigênica por cavidade, exceto na primeira coluna, pois esta é usada para zerar o leitor de placas (branco). Após a diluição da solução, as placas são armazenadas em geladeira “over night”. Nesta etapa e nas seguintes, as placas são protegidas durante o período de incubação por uma tampa plástica.

Foram utilizadas placas de microtitulação em “U”, de poliestireno, constituída de 96 cavidades (12 colunas com 08 pocinhos em cada).

**Primeira lavagem.** Após o período de incubação, a placa é lavada para remover o antígeno que não se fixou ao fundo. As placas são lavadas com solução de lavagem (0,05% Tween-salina). Preencher as cavidades com esta solução e remover logo em seguida. Este procedimento era repetido três vezes.

**Bloqueio da placa.** A utilização da solução de bloqueio tem por finalidade preencher com proteína os espaços não ocupados pelo antígeno durante o processo de sensibilização da placa. As placas são bloqueadas com 100 µl de solução de bloqueio (caseína 2% e 0,05% Tween diluídos em PBS) por cavidade e em seguida incubada em estufa a 37°C por 60 minutos.

**Segunda lavagem.** Tem por finalidade remover as proteínas da solução de bloqueio não fixadas na placa. O procedimento é semelhante ao da primeira lavagem.

**Diluição dos soros.** Esta etapa tem por finalidade promover a ligação do antígeno fixado nas placas com os anticorpos específicos para *Toxoplasma gondii* presentes nos soros dos animais testados.

Os soros foram diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% de Tween 20) e usados como fonte de primeiro anticorpo. Inicialmente, soros

controles positivos e negativos foram testados nas diluições de 1:100, 1:200 e 1:400 para padronização do teste.

A cada cavidade foi adicionado 100µl de soro diluído. Na primeira coluna (branco) não era adicionado nada. Depois de distribuídos os soros nas placas, estas eram incubadas em estufa a 37°C por 60 minutos. Com a finalidade de diminuir erros de diluição e pipetagem, as amostras sempre foram analisadas em duplicata.

**Terceira lavagem.** É feita como nas lavagens anteriores, mas o processo é repetido seis vezes. Tem a função de remover anticorpos não ligados aos antígenos fixados na placa, anticorpos não específicos para *T. gondii* e outras substâncias presentes no soro. Se estas substâncias não forem removidas adequadamente, podem alterar significativamente o resultado do teste.

**Diluição do conjugado.** O conjugado é o segundo anticorpo adicionado na placa. Consiste de imunoglobulina anti-IgG caprina, conjugada com a enzima peroxidase. O conjugado utilizado neste trabalho é anti-IgG caprina (SIGMA A5420).

Assim como no soro, o conjugado é diluído em tampão de incubação, sendo que várias diluições diferentes foram feitas buscando a melhor concentração (1:5.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000). São adicionado 100 µl por cavidade, exceto na primeira coluna (branco) e a placa incubada por 60 minutos em estufa a 37°C.

**Quarta lavagem.** É feita para remover o conjugado não ligado às moléculas de anticorpos. Essa operação é repetida seis vezes.

**Adição do substrato.** A atividade da enzima peroxidase é revelada pela adição de um substrato. O substrato usado foi o ortofenilenodiamino (OPD). É nessa substância que a enzima vai atuar resultando no desenvolvimento da cor. O catalisador usado para esta reação é o peróxido de hidrogênio e o veículo o tampão citrato. A solução de substrato é adicionada na quantidade de 100µl por cavidade e em seguida a placa é mantida em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 minutos para revelação.

**Parada da reação.** Para que a atividade enzimática seja uniforme, depois de passados 15 minutos de revelação a reação é interrompida pela adição de 50µl de ácido sulfúrico a 5% por cavidade. Assim, a enzima peroxidase é desnaturada deixando de agir sobre o substrato, podendo ser realizada a leitura.

**Leitura.** É realizada em um leitor de placas em comprimento de onda de 492nm. O leitor de placas utilizado foi da marca BioRad Model 550. O resultado é

dado em densidade ótica representando o valor de absorbância da amostra analisada.

**Cut-off.** Ao se padronizar um teste diagnóstico, é necessário estabelecer um limiar de reatividade dos soros, denominado Ponto de corte ou “Cut-off”. Abaixo deste limite estão os valores considerados negativos, e acima dele os valores positivos (GUIMARÃES *et al.*, 1987).

A escolha do ponto de corte, situação de discriminar os animais doentes dos saudáveis, depende dos objetivos a que o método se destina. Quando se deseja identificar todos os indivíduos portadores dos anticorpos pesquisados usa-se um ponto de corte com sensibilidade máxima e especificidade reduzida, ciente nesse caso da existência de falsos positivos. Se o objetivo for o diagnóstico clínico, o ponto de corte deve ter especificidade máxima mesmo que para isso tenha a sensibilidade reduzida (PEDRASSANI, 2001).

O estabelecimento do “cut-off” foi realizado a partir de análise de soros controle negativos. Os soros de oito animais previamente testados pelo método de imunofluorescência indireta e considerados não reagentes ao antígeno de *T. gondii* eram diluídos em tampão de incubação e postos nos pocinhos da última coluna de todas as placas testadas. O valor do “cut-off” correspondeu à média das densidades óticas dos soros controles negativos mais duas vezes o desvio padrão da média (MINOZZO, 1997).

#### 3.7.2.1 – Padronização do método ELISA

Para padronizar o método ELISA, foram testados dois soros controle positivos e dois soros controle negativos em diferentes concentrações protéicas do antígeno (1000 ng e 2000 ng por pocinho), diferentes diluições do conjugado (1:5.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000) e diferentes diluições dos soros (1:100, 1:200 e 1:400). A padronização foi feita avaliando em conjunto a melhor combinação entre diluição do soro, diluição de conjugado e concentração de antígeno, usando a menor quantidade de reativos caros (conjugado) ou difíceis de obter (antígeno e soro).

No estabelecimento do ponto de corte para o teste ELISA, foi considerada a finalidade para a qual o teste estava sendo realizado. Como foram feitos exames com a finalidade de estudos soropidemiológicos de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em caprinos, optou-se por uma alta sensibilidade. Assim, o cálculo do cut-

off foi feito pela média de oito soros controle negativos mais duas vezes o desvio padrão.

### 3.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi criado um banco de dados com base nos resultados dos questionários e nos resultados sorológicos. A análise dos dados foi realizada pelas seguintes etapas:

Prevalência da infecção pelo *T. gondii* para as duas técnicas sorológicas utilizadas;

Realização da tabulação cruzada entre os diferentes testes utilizados e determinação dos índices de sensibilidade relativa e especificidade relativa e os índices de concordância Kappa e estimativas dos valores preditivos positivo e negativo. O teste de RIFI foi utilizado como teste de referencia, com ponto de corte na diluição de 1:64;

Foram calculadas as freqüências de todas as variáveis;

Foram feitas comparações das freqüências entre infectados e não infectados, sexo e idade. Os dados foram analisados pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) seguido pelo teste z de resíduos padronizados para identificação das ocorrências significativamente diferentes ou pelo teste z para duas proporções para categorias mutuamente exclusivas (HABERMAN, 1973; PEREIRA, 1995; SAMPAIO 2007).

Os fatores de risco para toxoplasmose caprina foram analisados usando uma tabela de contingência 2 x 2 e calculado o risco relativo (RR) e o intervalo de confiança para cada fator (THRUSFIELD, 2004).

### 3.9 – COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS SOROLÓGICOS.

Os soros que tiveram resultados discordantes pelas técnicas de RIFI e ELISA foram re-testados por RIFI para certificar-se que a interpretação do teste foi feita corretamente.

Como o diagnóstico de positividade e negatividade foi estabelecido com base no resultado do método sorológico considerado padrão ouro para a toxoplasmose (Imunofluorescência indireta), e não no isolamento do parasito, os índices correspondentes aos valores de sensibilidade e especificidade foram denominados de copositividade e conegatividade respectivamente (GUIMARÃES *et al.*, 1987).

Para o cálculo dos coeficientes, para avaliação comparativa e epidemiológica dos testes diagnósticos, foram usadas fórmulas que seguiram o modelo da matriz para avaliação de um teste diagnóstico (QUADRO 1) (GUIMARÃES *et al.*, 1987; PEREIRA, 1995).

TESTE	RIFI reagente	RIFI não reagente	TOTAL
ELISA reagente	a	b	a + b
ELISA não reagente	c	d	c + d
<b>TOTAL</b>	a + c	b + d	<b>N</b>

QUADRO 1 – MATRIZ PARA CÁLCULO DE INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS  
 FONTE: Guimarães *et al.* (1987)

$N = \text{número total de examinados} = a+b+c+d$

Copositividade =  $a / a+c$

Conegatividade =  $d / b+d$

Valor preditivo positivo =  $a / a+b$

Valor preditivo negativo =  $d / c+d$

Índice de concordância =  $a+d / N$

Índice de discordância =  $b+c / N$

Os indicadores são expressos em porcentagem

### Indicador Kappa

O indicador Kappa é um indicador de concordância ajustada. Informa a proporção de concordâncias além da esperada pelo fator chance, e varia de menos 1 a mais 1 (QUADRO 2). Reflete a confiabilidade e reprodutividade do teste em questão.

#### Cálculo do Indicador Kappa (K):

- $K = P_o - P_e / 1 - P_e$

- $P_o = a+d / a+b+c+d$

- $P_e = \{(a+b)(a+c)\} + \{(c+d)(b+d)\} / (a+b+c+d)^2$

Onde:  $P_o$  = proporção de concordâncias observadas

$P_e$  = proporção de concordâncias esperadas

<b>Kappa</b>	<b>Concordância</b>
<0,00	Ruim
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

QUADRO 2 – INTERPRETAÇÃO DO VALOR DE KAPPA

FONTE: Pereira (1995)

### **Estimativa da prevalência corrigida pela validade do teste.**

A prevalência de resultados positivos obtidos por um teste diagnóstico em determinada população não é sinônimo da prevalência da doença nesta população. Isto só seria verdade com a utilização de um teste com 100% de sensibilidade e especificidade. Portanto, existe a necessidade de corrigir esta prevalência, de acordo com os níveis de sensibilidade e especificidade do método usado.

Fórmula empregada para correção da prevalência, quando usado um teste de diagnóstico imperfeito (PEREIRA, 1995):

$$P_c = P_o + E - 1 / S + E - 1$$

Onde:  $P_c$  = prevalência corrigida

$S$  = sensibilidade

$P_o$  = prevalência observada

$E$  = especificidade

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – COLETA DE SANGUE DE CAPRINOS

O tamanho da amostra ideal, em função do rebanho paranaense, foi de 384 animais, para um nível de confiança de 95% e uma precisão absoluta desejada de 5%. Trabalhou-se com soros de 406 animais, ou seja, 22 amostras a mais que a recomendada.

Os animais eram procedentes de 12 propriedades diferentes da Mesorregião Metropolitana de Curitiba, nos municípios de Guaratuba, Contenda, Campo Magro, Fazenda Rio Grande, São José dos Pinhais, Balsa Nova (São Luiz do Purunã), Rio Negro, Piraquara, Pinhais, Campo Largo, Quitandinha e Colombo (FIGURA 12). O número de animais por propriedade variou de 20 a 75, com uma média de 34 animais por propriedade.

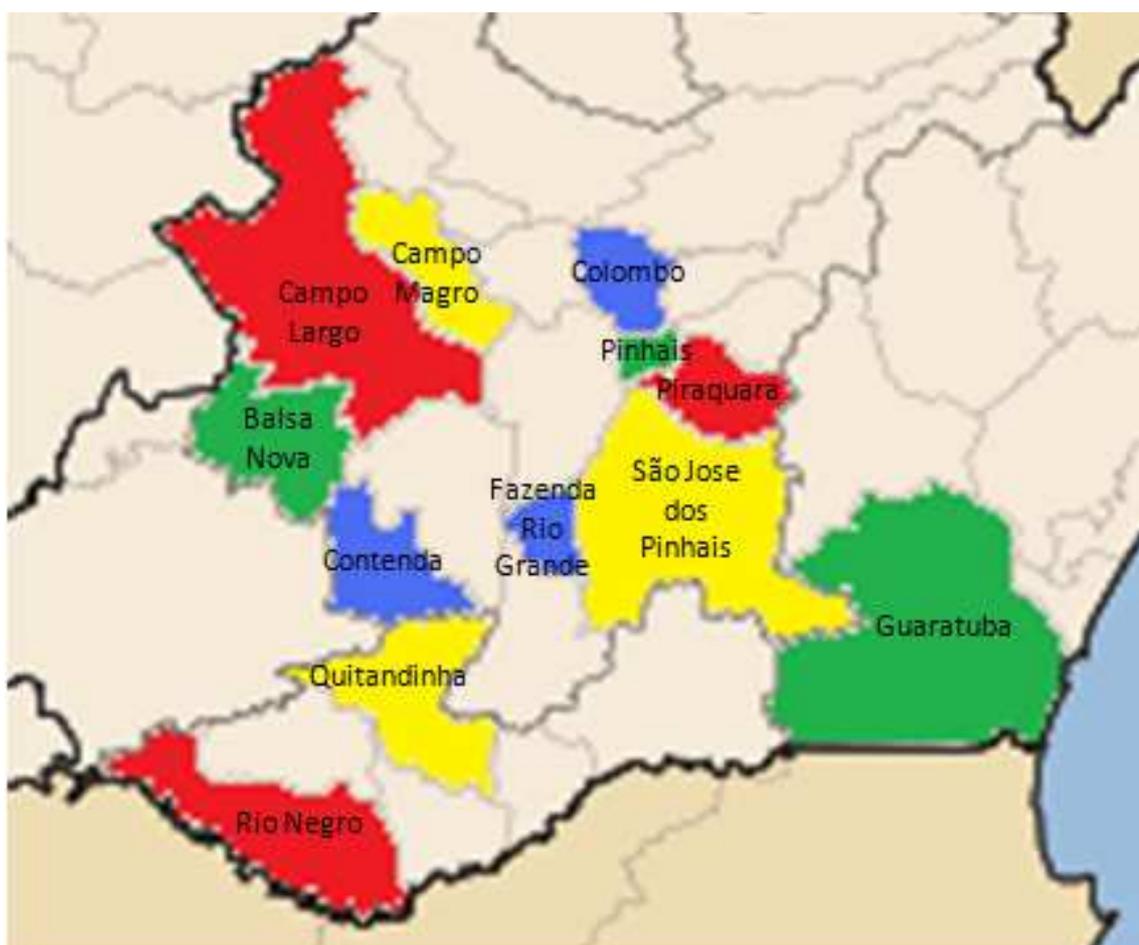


FIGURA 12 – MUNICÍPIOS DA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA PESQUISADOS PARA TOXOPLASMOSE CAPRINA

#### 4.2 – CARACTERÍSTICAS POPULACIONAIS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

Os 406 caprinos estudados foram divididos de acordo com sexo e idade, sendo 8,62% machos com menos de um ano, 4,19% machos com idade entre um e três anos, 4,19% machos com mais de três anos, 14,53% fêmeas com menos de um ano, 29,7% fêmeas entre um e três anos de idade e 38,42% de fêmeas com mais de três anos de idade (TABELA 6). Um animal (0,25%) não teve sexo e idade registrados.

TABELA 6 – NÚMERO DE ANIMAIS TESTADOS, SEPARADOS POR SEXO E IDADE

<b>Sexo/Idade</b>	<b>0 a 1 ano</b>	<b>1 a 3 anos</b>	<b>Mais de 3 anos</b>	<b>TOTAL (%)</b>
<b>Machos</b>	35	17	17	69 (17)
<b>Fêmeas</b>	59	121	156	336 (82,76)
<b>TOTAL (%)</b>	94 (23,15)	138 (33,99)	173 (42,61)	406 (100) *

\* um animal não teve sexo e idade registrados

#### 4.3 – PADRONIZAÇÃO DA RIFI

**Concentração do antígeno** – Após a contagem dos parasitos em câmara de Thoma, foram testadas várias concentrações de taquizoítos por  $\mu\text{l}$  (1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25), lembrando que era acrescentado 20 $\mu\text{l}$  de solução de taquizoítos por spot. A melhor concentração observada foram 200 taquizoítos por  $\mu\text{l}$  ou 4000 parasitos por spot. O que representava 100 a 150 parasitos por campo no aumento de 400 vezes, facilitando a leitura, permitindo visualizar o contorno do parasito fluorescente.

**Diluição dos soros** – Inicialmente foram usadas as diluições dos soros de 1:16 e 1:64. Naqueles animais cujos soros eram reagentes em diluição 1:64 foram testados também as diluições de 1:256, 1:1024 e 1:4096.

**Diluição do conjugado** – Após a avaliação, em triplicata, das diferentes diluições de conjugado, frente a diferentes diluições de soro, optou-se por trabalhar com a diluição de 1:200, que permitia diferenciar bem entre os soros positivo e negativo.

#### 4.4 – DOSAGEM PROTÉICA DO ANTÍGENO SOLÚVEL E PADRONIZAÇÃO DO ELISA

A quantidade de proteína obtida no antígeno solúvel para *T. gondii* produzido para este trabalho foi de 7,837mg/ml.

Na padronização do método ELISA, se obteve diferentes níveis de absorvância para os soros controle positivos (CP 1 e CP 2) e soros controle negativos (CN 1 e CN 2) em diferentes concentrações de antígeno e diluições de soro e conjugado conforme explicado no item 3.7.2.1. Na tabela 7 estão as médias dos valores de absorvância dos soros controle positivo e negativo com as possíveis combinações de antígeno, soro e conjugado avaliados em três placas distintas. Assim, a melhor combinação encontrada foi de 1000 ng de antígeno/well, soro diluído 1:100 e diluição do conjugado de 1:10.000.

TABELA 7 – VALORES DE ABSORBÂNCIA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENO E DILUIÇÕES DE SORO E CONJUGADO EM SOROS CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO PARA PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA ELISA

CP 1	CP 2	CN 1	CN 2	CP 1	CP 2	CN 1	CN 2	CP 1	CP 2	CN 1	conj.	ag.	
0,737	0,977	0,149	0,171	0,578	0,790	0,124	0,142	0,612	0,674	0,130	5000		
0,652	0,923	0,101	0,120	0,505	0,682	0,086	0,098	0,499	0,647	0,095	10000		
0,557	0,717	0,078	0,093	0,412	0,550	0,075	0,082	0,361	0,496	0,110	20000		
0,357	0,417	0,069	0,076	0,275	0,389	0,059	0,062	0,278	0,332	0,074	40000	1000 ng	
0,963	1,137	0,143	0,198	0,739	1,037	0,146	0,141	0,626	0,753	0,144	5000		
0,757	1,015	0,101	0,132	0,752	0,909	0,097	0,097	0,617	0,697	0,101	10000		
0,502	0,639	0,087	0,102	0,524	0,646	0,087	0,088	0,425	0,543	0,083	20000		
0,389	0,484	0,060	0,072	0,345	0,465	0,061	0,071	0,340	0,412	0,068	40000	2000 ng	
100				200				400				diluição soros	

##### 4.4.1 – Estabelecimento do “Cut-off” ou ponto de corte entre soro reagente e não reagente

Como os testes não foram feitos todos no mesmo dia, o valor de cut-off foi calculado por placa, sendo que em cada placa eram testados os soros das mesmas propriedades. Assim, em cada placa de poliestireno utilizada para a realização do teste de ELISA a ultima coluna era de soros controle negativos, oito soros controle negativos por cada placa, calculado conforme descrito no item 3.7.2.1. Os valores de absorvância dos soros usados para o estabelecimento do valor de cut-off estão demonstrados na tabela 8.

TABELA 8 – VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS CONTROLE NEGATIVOS E VALORES DE CUT-OFF POR PLACA/PROPRIEDADE

Propriedades / soros negativos	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 6
	1 e 2	3, 4 e 5	6	7 e 11	8 e 9	10 e 12
Valores de absorvância	0,106	0,116	0,095	0,098	0,158	0,125
	0,137	0,103	0,098	0,096	0,155	0,103
	0,123	0,121	0,105	0,126	0,139	0,076
	0,124	0,090	0,112	0,097	0,139	0,082
	0,145	0,104	0,113	0,137	0,124	0,112
	0,085	0,114	0,118	0,089	0,120	0,101
	0,071	0,103	0,123	0,080	0,161	0,091
	0,108	0,105	0,108	0,096	0,121	0,123
Valores de Cut-off	0,162	0,126	0,128	0,141	0,173	0,138

Legenda: "Cut-off" = média absorvâncias (8 soros negativos) + 2 vezes desvio padrão

Dessa forma, o método de enzimaímunoensaio padronizado no presente trabalho ficou assim estabelecido:

- **Concentração do antígeno:** 1000ng/cavidade;
- **Diluição do conjugado:** 1:10.000;
- **Diluição dos soros:** 1:100;
- **Valores de cut-off:** média de 0,145.

#### 4.5 – DETERMINAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE CAPRINA NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA – PARANÁ

Após a padronização das técnicas de RIFI e ELISA, foram analisados soros de 406 caprinos. Destes, 260 (64,04%) foram considerados negativos pela técnica de RIFI (< 1:64). Dos 146 (35,96%) soros positivos, 34 (8,37%) apresentaram título de 1:64, 66 (16,26%) de 1:256, 40 (9,85%) de 1:1024 e 6 (1,48%) com título igual ou superior a 1:4096. Para o teste de ELISA, o nível de absorvância variou de 0,045 a 1,560, sendo que os pontos de corte variaram entre 0,126 a 0,173. O número de soros negativos foi 246 (60,59%), enquanto que o de soros positivos foi 160 (39,41%).

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre sexo e idade dos animais positivos e negativos para toxoplasmose caprina ( $\chi^2 = 30,091$ ;

$p < 0,05$ ), e o teste de resíduos padronizados em z indicou proporcionalmente maior número de machos negativos em 0 a 1 ano, maior número de fêmeas positivas em mais de 3 anos, menor número de fêmeas positivas em 0 a 1 ano e menor número de machos negativos em mais de 3 anos (TABELA 9 e GRÁFICO 1).

TABELA 9 – RESULTADOS DA RIFI PARA TOXOPLASMOSE CAPRINA POR SEXO E IDADE DOS ANIMAIS

	machos			fêmeas			TOTAL
	0 a 1 ano	1 a 3 anos	> 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	> 3 anos	
RIFI positivo	3	5	9	12	42	75	146
RIFI negativo	32	12	8	47	79	81	259
TOTAL	35	17	17	59	121	156	405

$$\chi^2 = 30,091; p < 0,05$$

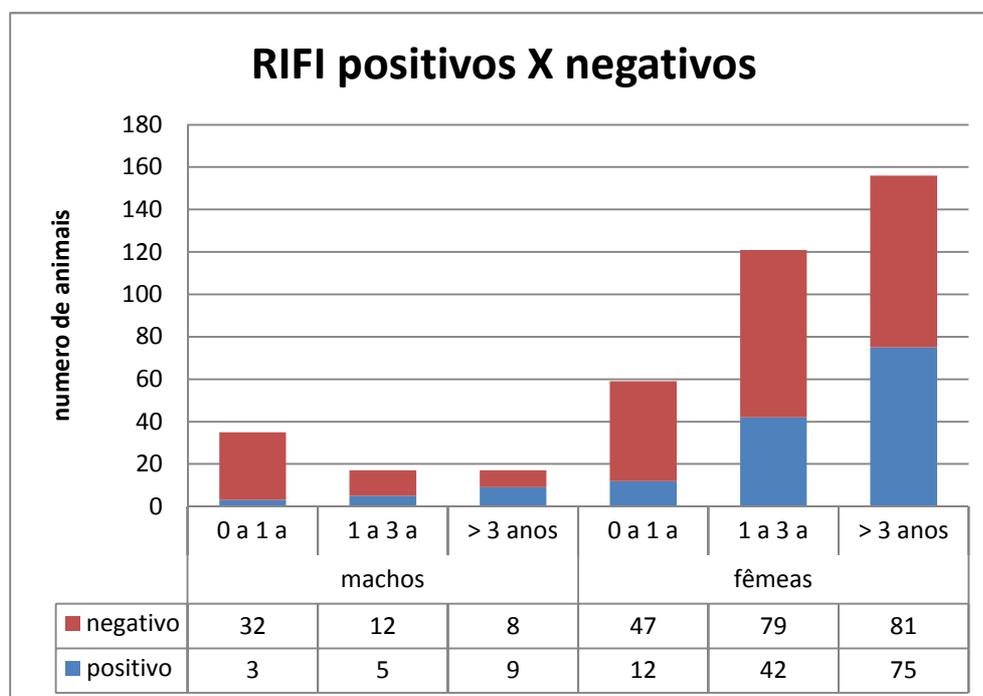


GRÁFICO 1 – DIFERENÇA ENTRE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS POR RIFI DE ACORDO COM SEXO E IDADE DOS ANIMAIS

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre sexo e idade dos animais positivos e negativos para toxoplasmose caprina ( $\chi^2 = 35,615$ ;  $p < 0,05$ ), e o teste de resíduos padronizados em z indicou proporcionalmente maior número de machos negativos em 0 a 1 ano, maior número de fêmeas positivas em mais de 3 anos, maior número de fêmeas negativas em 1 a 3 anos, menor número de fêmeas positivas em 0 a 1 ano, menor número de machos negativos em mais de 3

anos e menor número de fêmeas negativas em mais de 3 anos (TABELA 10 e GRÁFICO 2).

TABELA 10 – RESULTADOS DO TESTE ELISA PARA TOXOPLASMOSE CAPRINA POR SEXO E IDADE DOS ANIMAIS

	machos			fêmeas			TOTAL
	0 a 1 ano	1 a 3 anos	> 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	> 3 anos	
ELISA positivo	4	5	7	15	42	87	160
ELISA negativo	31	12	10	44	79	69	245
TOTAL	35	17	17	59	121	156	405

$\chi^2 = 35,615$ ;  $p < 0,05$

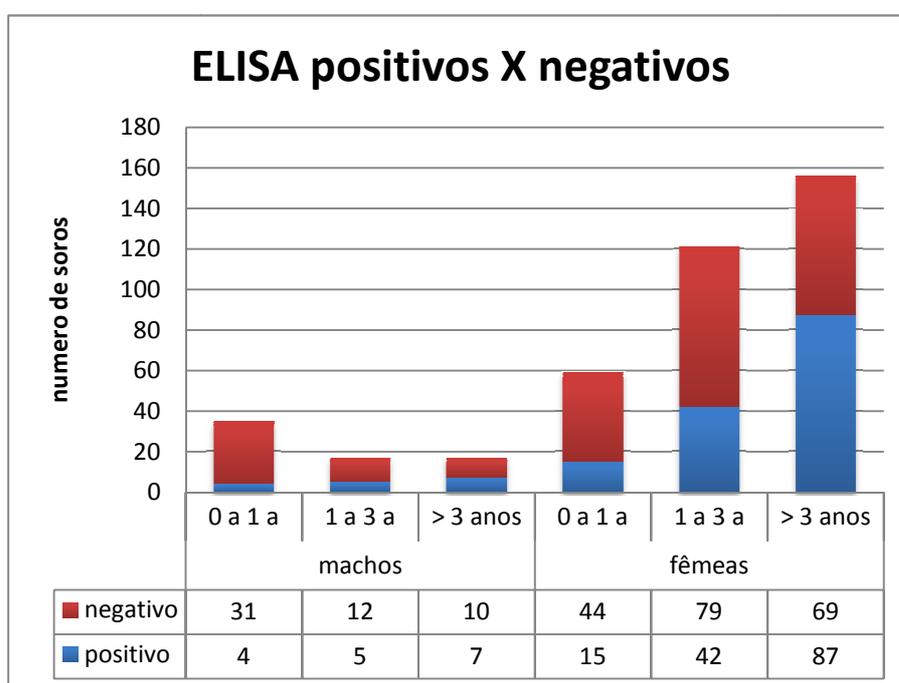


GRÁFICO 2 – DIFERENÇA ENTRE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS POR ELISA DE ACORDO COM IDADE E SEXO DOS ANIMAIS

Foi observado que 17 (24,64%) dos 69 machos e 129 (38,39%) das 336 fêmeas foram sororreagentes pelo método de RIFI (TABELAS 11 e 12). Na análise estatística houve diferença significativa, grau de liberdade de 95%, entre os sexos na ocorrência de reagentes ( $\chi^2=4,698$ ;  $p < 0,05$ ). Também no teste ELISA, 16 (23,19%) dos 69 machos e 144 (42,86%) das 336 fêmeas foram considerados positivos, havendo diferença significativa na análise estatística ( $\chi^2 = 9,266$ ;  $p < 0,05$ ). Em ambos os casos (RIFI e ELISA) o teste de resíduos indica que houve maior proporção de fêmeas positivas e de machos negativos.

TABELA 11 – ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES SEGUNDO O SEXO, ANALISADOS POR RIFI PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii*

	machos	fêmeas	TOTAL
positivo	17	129	146
negativo	52	207	259
TOTAL	69	336	405

$\chi^2 = 4,698; p < 0,05$

TABELA 12 – ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES SEGUNDO O SEXO, ANALISADOS POR ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii*

	machos	fêmeas	TOTAL
positivo	16	144	160
negativo	53	192	245
TOTAL	69	336	405

$\chi^2 = 9,266; p < 0,05$

De acordo com os dados obtidos, e conforme análise estatística foi observada diferenças significativas entre os soropositivos e a idade. Por RIFI, 15 (15,96%) dos 94 animais com menos de 1 ano, 47 (34,06%) dos 138 soros de animais com idade entre 1 e 3 anos e 84 (48,55%) dos 173 animais com mais de 3 anos foram considerados positivos ( $\chi^2 = 28,433; p < 0,05$ ). E pela técnica de ELISA, 19 (20,21%) dos 94; 47 (34,06%) dos 138 e 94 (54,34%) dos 173 animais com menos de um ano, 1 a 3 anos e mais de 3 anos respectivamente foram sororreagentes ( $\chi^2 = 32,29; p < 0,05$ ) (TABELAS 13 e 14). Tanto por RIFI quanto por ELISA o teste de resíduos indica que houve, proporcionalmente, maior número de negativos em 0 a 1 ano, maior número de positivos em mais de três anos, menor número de positivos em 0 a 1 ano e menor número de negativos em mais de 3 anos.

TABELA 13 – ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES SEGUNDO A IDADE, ANALISADOS POR RIFI PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii*

	0 a 1 ano	1 a 3 anos	> 3 anos	TOTAL
positivo	15	47	84	146
negativo	79	91	89	259
TOTAL	94	138	173	405

$\chi^2 = 28,433; p < 0,05$

TABELA 14 – ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES SEGUNDO A IDADE, ANALISADOS POR ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii*

	0 a 1 ano	1 a 3 anos	> 3 anos	TOTAL
positivo	19	47	94	160
negativo	75	91	79	245
TOTAL	94	138	173	405

$\chi^2 = 32,29; p < 0,05$

Analisando as faixas etárias uma a uma, é possível verificar que o número de animais sororreagentes aumenta com a idade. O teste z para duas proporções para categorias mutuamente exclusivas indicou que todas as comparações foram estatisticamente significativas, mas as diferenças entre as proporções foram muito mais acentuadas nos casos positivos que nos negativos (TABELA 15).

TABELA 15 – ANÁLISE ENTRE FAIXAS ETÁRIAS POR RIFI E ELISA (TESTE Z PARA DUAS PROPORÇÕES PARA CATEGORIAS MUTUAMENTE EXCLUSIVAS)

Ocorrência	Faixa etária	Frequência absoluta		Total	Frequência relativa		Teste de duas proporções			
		f1	f2		p1	p2	z	p	signific.	Obs.
RIFI (+)	1 x 2	15	47	146	0,1027	0,3219	-49,1413	0,0000	S	p1<p2
	2 x 3	47	84	146	0,3219	0,5753	-39,1211	0,0000	S	p1<p2
	1 x 3	15	84	146	0,1027	0,5753	-83,8905	0,0000	S	p1<p2
RIFI (-)	1 x 2	79	91	259	0,3050	0,3514	-14,8212	0,0000	S	p1<p2
	2 x 3	91	89	259	0,3514	0,3436	2,4007	0,0164	S	p1>p2
	1 x 3	79	89	259	0,3050	0,3436	-12,4242	0,0000	S	p1<p2
ELISA (+)	1 x 2	19	47	160	0,1188	0,2938	-43,6241	0,0000	S	p1<p2
	2 x 3	47	94	160	0,2938	0,5875	-50,1357	0,0000	S	p1<p2
	1 x 3	19	94	160	0,1188	0,5875	-89,3433	0,0000	S	p1<p2
ELISA (-)	1 x 2	75	91	245	0,3061	0,3714	-19,4513	0,0000	S	p1<p2
	2 x 3	91	79	245	0,3714	0,3224	14,4161	0,0000	S	p1>p2
	1 x 3	75	79	245	0,3061	0,3224	-5,0485	0,0000	S	p1<p2

Legenda: faixas etárias: 1 - 0 a 1 ano; 2 - 1 a 3 anos; 3 - > 3 anos; f1,f2 - frequência absoluta; p1,p2 - frequência relativa; Z - teste z para duas proporções para categorias mutuamente exclusivas; p - nível de significância para a hipótese de nulidade; S - Diferença entre as duas proporções estatisticamente significativas

#### 4.6 – RESULTADOS POR PROPRIEDADE

Nas 12 propriedades analisadas, a taxa de soropositividade variou de 11,43 a 80% quando os soros foram analisados pela técnica de IFI e de 14,29 a 80%, por ELISA (GRÁFICO 3).

- Propriedade 1, 26 soros coletados 19,23% positivos por RIFI e ELISA;
- Propriedade 2, 50 amostras, 20% positivos;
- Propriedade 3, 20 soros, 20% RIFI, 25% ELISA;
- Propriedade 4, 28 soros, 14,29%;
- Propriedade 5, 20 soros, 80% de animais positivos;
- Propriedade 6, 75 amostras, 61,33%;
- Propriedade 7, 36 soros, 33,33% RIFI e 38,89% por ELISA;
- Propriedade 8, 31 amostras, 29,03%;
- Propriedade 9, 35 soros coletados, 11,4% RIFI e 31,43% por ELISA;
- Propriedade 10, 31 amostras, 35,49% por RIFI e 45,16% por ELISA;
- Propriedade 11, 22 amostras, 40,91% de positivos;
- Propriedade 12, 32 soros coletados, 50% de positivos por RIFI e 53,13% por ELISA.

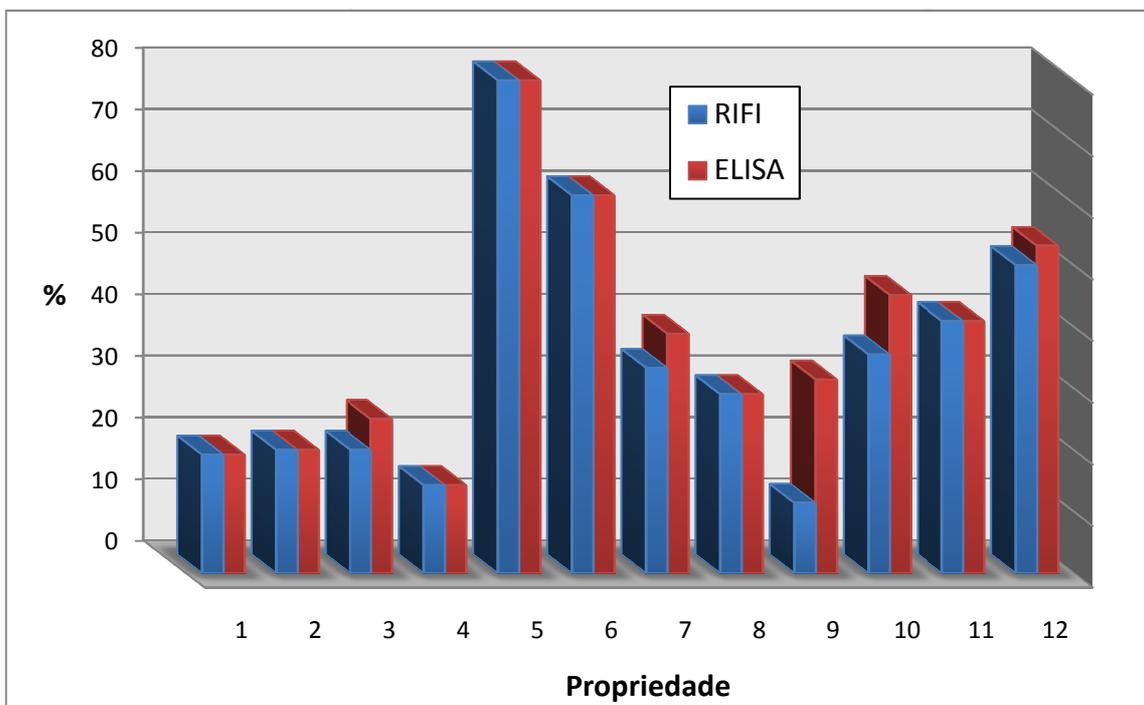


GRÁFICO 3 – SOROPREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE EM CAPRINOS NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA DO PARANÁ, POR PROPRIEDADE ESTUDADA

Pela RIFI, ocorreu uma maior proporção de casos positivos para toxoplasmose nas propriedades 5 e 6 e menor proporção de casos positivos em 2, 4 e 9 (GRÁFICO 3). Essas diferenças são estatisticamente significantes (teste z de resíduos padronizados,  $p < 0,05$ ). Para o ensaio imunoenzimático observou-se que ocorreu uma maior proporção de casos positivos para toxoplasmose nas propriedades 5 e 6 e menor proporção de casos positivos em 1, 2 e 4 (GRÁFICO 3). Essas diferenças são estatisticamente significantes (teste z de resíduos padronizados,  $p < 0,05$ ).

Os resultados dos testes de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático estão detalhados por animal no anexo 7. Os detalhes do cálculo do teste de resíduos padronizados em z estão no anexo 11 e 12.

#### 4.7 – COMPARAÇÃO DOS TESTES: RIFI X ELISA

Dos 406 soros avaliados, foi encontrado positividade em 35,96% dos soros analisados por RIFI e 39,41% por ELISA. Os resultados das análises foram agrupados de acordo com a concordância ou não entre os resultados obtidos em ambos os métodos (TABELA 16). Com o agrupamento desses resultados foi montada a matriz para o cálculo dos indicadores epidemiológicos para determinar a qualidade do método padronizado.

TABELA 16 – TABELA DE CONTINGÊNCIA E COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS SOROLÓGICOS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma*

		RIFI		Total
		positivo	negativo	
ELISA	positivo	144	16	160
	negativo	2	244	246
Total		146	260	406

O método ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, de acordo com os valores descritos na tabela 16, apresentou os seguintes índices:

Copositividade (sensibilidade) = 98,63%

Conegatividade (especificidade) = 93,85%

Valor preditivo positivo = 90%

Valor preditivo negativo = 99,19%

Índice de concordância = 95,57%

Índice de discordância = 4,43%

Indicador Kappa (K) = 0,91

Os dados de sorologia que foram discordantes entre RIFI e ELISA são apresentados no anexo 8.

Após utilização da fórmula de prevalência corrigida, levando em consideração a sensibilidade (copositividade) e a especificidade (conegatividade) do método Enzimaimunoensaio padronizado no presente trabalho, a prevalência estimada da toxoplasmose caprina na Mesorregião Metropolitana de Curitiba do Paraná foi de 35,95%.

#### 4.8 – ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO

Para análise dos fatores de risco, foram estudadas 12 propriedades criadoras de caprinos, as características e modo de criação dos animais, segundo dados recolhidos nos questionários epidemiológicos (TABELA 17).

TABELA 17 – CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES CRIADORAS DE CAPRINOS, CONTINUA

VARIAVEIS	n	%
<b>Localização (N=12)</b>		
rural	6	50
peri-urbana	6	50
<b>Atividade principal (N=12)</b>		
pecuária	8	66,7
mista (agricultura e pecuária)	3	25
outra atividade	1	8,3
<b>Presença de outros animais (N=12)*</b>		
bovinos	3	25
ovinos	9	75
suínos	2	16,7
eqüinos	7	58,3
aves	7	58,3
caninos	11	91,7
felinos	3	25
<b>Animais silvestres ou roedores (N=11)*</b>		
roedores	9	81,8
aves	6	54,6
outros mamíferos	5	45,5
<b>Atendimento por médico veterinário (N=12)</b>		
sim	11	91,7
não	1	8,3
<b>Problemas sanitários (N=10)*</b>		
verminoses	8	80
subnutrição	1	10
linfadenite caseosa	1	10
problemas de parto	1	10
coccidioses	1	10
podridão de casco	1	10
<b>Abortos (N=12)</b>		
sim	7	58,3
não	5	41,7
<b>Causa do aborto (N=5)*</b>		
não identificada	2	40
trauma	1	20
alta dose de medicamentos	1	20
carência de selênio	1	20
intoxicação	1	20
<b>Fase do aborto (N=3)*</b>		
início de gestação	2	66,7
meio da gestação	2	66,7
final de gestação	3	100
<b>Crias nascidas mortas (N=7)</b>		
sim	7	100
<b>diagnóstico precoce da gestação (N=8)</b>		
sim	4	50
não	4	50
<b>Nascimento de crias fracas (N=7)</b>		
sim	2	28,6
não	5	71,4

TABELA 17 – CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES CRIADORAS DE CAPRINOS, CONCLUSÃO

VARIAVEIS	n	%
<b>Desverminação (N=11)</b>		
coproparasitológico e famacha	4	36,4
famacha	6	54,5
ivomec a cada 6 meses	1	9,1
<b>Troca de medicamento regularmente (N=5)</b>		
sim	3	60
não	2	40
<b>Alimentação dos animais (N=12)*</b>		
pasto	11	91,7
verde no cocho	10	83,3
silagem	2	16,7
feno	6	50
concentrado comprado	3	25
concentrado feito na propriedade	6	50
sal comum	2	16,7
sal mineral	11	91,7
<b>Coccidiostático na ração (N=11)</b>		
sim	7	63,6
não	4	36,4
<b>Local de armazenagem dos alimentos (N=12)</b>		
aberto	4	33,3
fechado	8	66,7
<b>Acesso ao local de armazenamento (N=9)*</b>		
roedores	8	88,9
gatos	2	22,2
aves	1	11,1
<b>Alimentação dos gatos (N=3)</b>		
ração	1	33,3
caça	2	66,7
<b>Fonte de água (N=12)</b>		
poço convencional	6	50
rede pública	3	25
mista	3	25
<b>Armazenamento em caixa d'água (N=12)</b>		
sim	11	91,7
não	1	8,3
<b>Limpeza regular da caixa d'água (N=6)</b>		
sim	5	83,3
não	1	16,7
<b>Manejo dos animais (N=12)</b>		
semi-intensivo	11	91,7
intensivo	1	8,3
<b>Tipo de instalação (N=12)</b>		
piso ripado	6	50
chão batido	1	8,3
misto	5	41,7
<b>Finalidade da criação (N=12)</b>		
carne	8	66,7
mista	4	33,3

Legenda: N = número de unidades produtoras com respostas; n = número de unidades produtoras com as diferentes respostas; \* mais de uma opção marcada

A determinação dos fatores de risco foi realizada utilizando os resultados obtidos no teste ELISA e calculado o risco relativo das variáveis que teriam alguma influência na prevalência da infecção por *T. gondii* (TABELA 18).

TABELA 18 – DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA TOXOPLASMOSE EM CAPRINOS

VARIÁVEIS	% positivo	RR	IC - 95%	
<b>Presença gatos</b>				
<b>sim</b>	53,8	1,706209	1,344097	2,165879
<b>não</b>	31,6	RR considerado. O IC não passa pela unidade		
<b>Presença roedores</b>				
<b>sim</b>	42,2	1,84051	1,346457	2,515842
<b>não</b>	24,6	RR considerado. O IC não passa pela unidade		
<b>Acesso gatos ao alimento</b>				
<b>sim</b>	58,8	1,814915	1,423029	2,314722
<b>não</b>	32,4	RR considerado. O IC não passa pela unidade		
<b>Acesso ratos ao alimento</b>				
<b>sim</b>	42,8	1,275486	0,983881	1,653519
<b>não</b>	33,6	RR não considerado. O IC passa pela unidade		
<b>Alimentação dos gatos</b>				
<b>caça</b>	58,8	1,514019	1,024085	2,238341
<b>ração</b>	38,8	RR considerado. O IC não passa pela unidade		
<b>Localização</b>				
<b>peri-urbana</b>	45	1,257955	0,987763	1,602054
<b>rural</b>	35,8	RR não considerado. O IC passa pela unidade		
<b>Fonte de água</b>				
<b>poço convencional</b>	40	0,948623		
<b>rede pública</b>	42,2	Menor que a unidade		
<b>Instalação</b>				
<b>piso ripado</b>	36,5	1,257803	0,719165	2,199869
<b>chão batido</b>	29	RR não considerado. O IC passa pela unidade		
<b>Tipo de manejo</b>				
<b>semi-intensivo</b>	41,2	2,888889	1,381807	6,039686
<b>intensivo</b>	14,2	RR considerado. O IC não passa pela unidade		
<b>Finalidade da criação</b>				
<b>mista</b>	48,3	1,422861	1,118521	1,810008
<b>carne</b>	33,9	RR considerado. O IC não passa pela unidade		
<b>Sal mineral</b>				
<b>sim</b>	39,3	0,961227		
<b>não</b>	40,9	Menor que a unidade		
<b>Coccidiostático</b>				
<b>sim</b>	43,6	1,341816	1,014481	1,77477
<b>não</b>	32,5	RR considerado. O IC não passa pela unidade		

Legenda: RR = risco relativo; IC = intervalo de confiança

As características de cada propriedade e os resultados da sorologia por rebanho com os cálculos para os fatores de risco (RR) encontram-se detalhados nos anexos 9 e 10 respectivamente.

Os fatores de risco analisados por este trabalho evidenciaram que a presença de gatos e de roedores, o acesso de gatos ao alimento dos caprinos, alimentação dos gatos, tipo de manejo semi intensivo, finalidade de criação mista e fornecimento de coccidiostático aos animais tem risco relativo considerado, enquanto que o acesso de ratos ao alimento dos caprinos, localização da propriedade, fonte de água, tipo de instalação e fornecimento de sal mineral aos animais não tiveram risco relativo considerado.

Portanto deduz-se que a presença de gatos e de roedores, o acesso de gatos ao alimento dos caprinos, gatos que caçam, tipo de manejo semi-intensivo, finalidade de criação mista e fornecimento de coccidiostático aos animais são importantes na epidemiologia da toxoplasmose caprina na Mesorregião Metropolitana de Curitiba do Paraná.

## 5 – DISCUSSÃO

Na toxoplasmose animal, como na espécie caprina, há graves perdas econômicas quando a doença afeta o rebanho, especialmente em fase gestacional. Portanto, é fundamental conhecer a epidemiologia para poder prevenir eventuais perdas, tratar animais em fase aguda da doença e planejar e executar medidas de controle. A infecção, tanto no homem como em animais, pode apresentar quadros parecidos com várias infecções além, da grande maioria, ser assintomática (FIGUEIREDO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002) o que dificulta usar o exame clínico como alternativa de avaliação. Os métodos diretos, como o isolamento do parasito, são difíceis de serem realizados, de alto custo e necessitam de longo tempo para fornecer resultados. Métodos moleculares, como PCR, só acusam a infecção na fase aguda, apresentando baixa sensibilidade e estão longe de serem usados na rotina (KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2005; TSUTSUI *et al.*, 2007).

Desta forma é fundamental escolher um método de diagnóstico que seja sensível, específico e que tenha baixo custo e que possa ser empregado num grande número de animais. Os métodos sorológicos, apesar de indiretos, vêm se apresentando como alternativa especialmente em estudos soropidemiológicos (CHIARI, 1981). Dentre os métodos usados na toxoplasmose animal, a RIFI e ELISA são as técnicas mais utilizadas (FIGUEIREDO *et al.*, 2001). Corcuera *et al.* (1981), concluíram que a especificidade e a sensibilidade variam com cada técnica, obtendo-se melhores resultados com RIFI, ELISA e HAI, e aconselharam que se devesse utilizar, no mínimo, duas técnicas dessas três. Também chegaram a esta conclusão Silva *et al.*, 1997, Camargo *et al.*, 1998 e Fialho & Araújo, 2002, de associar duas técnicas quando o objetivo for o diagnóstico e podendo ser utilizada apenas uma para screening.

Vários autores ressaltam a importância da RIFI como teste sorológico para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*. Trata-se de uma reação sensível, específica e reprodutível, merecendo destaque por já ter sido demonstrada na detecção de toxoplasmose em humanos, caprinos, ovinos, caninos, felinos, bovinos entre outros animais (CHIARI *et al.*, 1987; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; FIALHO & ARAÚJO, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Todavia, tem como desvantagens a subjetividade na leitura e a necessidade de equipamentos de alto custo.

A técnica ELISA é uma opção para testes sorológicos por ser prática, rápida, sensível e de leitura automatizada, sendo ideal para levantamentos epidemiológicos (FIGUEIREDO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002). Além disso, é capaz de detectar anticorpos IgM e IgG de baixa, média e alta avidéz (CAMARGO *et al.*, 1991). Apresenta maior sensibilidade que a RIFI. Porém, pode apresentar resultados falso-positivos (DOMINGUES *et al.*, 1998).

Neste estudo, na RIFI foram considerados como positivos os soros que apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:64. Esta diluição aumenta a especificidade da reação, diminuindo assim a presença de possíveis resultados falso-positivos (SELLA *et al.*, 1994; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; FIGLIUOLO *et al.*, 2004; CARNEIRO, 2006; FARIA *et al.*, 2007; NETO *et al.*, 2008). Muitos autores utilizam a diluição 1:16 como ponto de corte (MACHADO e LIMA, 1987; MAINARDI *et al.*, 2000; MEIRELES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; UZÊDA *et al.*, 2004; MODOLO *et al.*, 2008) o que pode levar a possíveis reações cruzadas e superestimar a prevalência da doença.

A copositividade de 98,63% e conegatividade de 93,85% obtidos na reação de ensaio imunoenzimático, utilizando como referência a RIFI na diluição de 1:64, são maiores que as descritas por Carneiro (2006) que obteve 85,2% de sensibilidade e 93% de especificidade em estudo realizado com rebanhos caprinos no estado de Minas Gerais. Van de Puije *et al.* (2000), também utilizando ELISA e RIFI como referência na diluição de 1:64, observaram 92% de sensibilidade e 91% de especificidade em estudo realizado em rebanhos caprinos em Gana, África. Pedrassani (2001) obteve índice de copositividade de 90,43% e conegatividade de 93% na padronização do método ELISA para pesquisa de IgG anti-*T. gondii* em caninos, tendo RIFI em diluição de 1:40 como referência, estes dois últimos estudos corroboram os resultados aqui apresentados.

A concordância entre os resultados do ELISA e RIFI foi considerada ótima com valor obtido para o indicador Kappa (K) de 0,91. Este valor é semelhante ao encontrado por Pedrassani (2001) que foi igual a 0,86, e superior ao de 0,79 obtido por Carneiro em 2006, indicando que o método padronizado no presente trabalho apresentou maior proporção de concordâncias entre os resultados obtidos nos dois métodos.

Provavelmente as diferenças entre as duas técnicas sejam devido ao uso de antígenos distintos: íntegro na Imunofluorescência Indireta e solúvel no

Enzimaimunoensaio, pelo tipo de leitura das reações, e diferenças entre os reagentes e conjugados fluorescentes e enzimáticos (PEDRASSANI, 2001; CARNEIRO, 2006).

Nesse estudo foram pesquisados anticorpos da classe IgG, que são observados na fase crônica da infecção. No caso das propriedades 1 e 4, onde foi relatado aborto em algumas fêmeas que apresentaram sorologia negativa, é possível que esses animais estivessem na fase aguda da infecção. Nesse caso, se a coleta de sangue fosse feita alguns meses mais tarde, o resultado da sorologia seria positivo. Todavia, não foi realizada pesquisa de IgM por ser um estudo epidemiológico e não visava o diagnóstico da doença aguda.

A prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* encontrada para caprinos neste estudo variou de 35,96% e 39,41% para RIFI e ELISA respectivamente. A prevalência corrigida de acordo com os índices de copositividade e conegatividade do método ELISA foi de 35,95%. Interessante observar que houve uma variabilidade de soroprevalência dependendo da propriedade, com a menor apresentando 14,29 e a maior de 80% de positividade.

Quando comparada a taxa média de soropositividade para *T. gondii* em caprinos encontrada neste trabalho foi superior aos valores encontrados no Rio Grande do Sul – 30% (MACIEL, 2004), na Paraíba – 24,5% (FARIA *et al.*, 2007), no Ceará – 25,1% (CAVALCANTE *et al.*, 2008), em São Paulo – 23,4% (MODOLO *et al.*, 2008) e na Nigéria – 4,6% (KAMANI *et al.*, 2009). E inferior aos constatados em Minas Gerais – 68% (CHIARI *et al.*, 1987) e 43% (CARNEIRO, 2006) e nas Ilhas Canárias, Espanha – 63,31% (RODRIGUES-PONCE *et al.*, 1995). E encontram-se mais próximos dos resultados obtidos, para esta espécie animal em Minas Gerais – 36,8% (MACHADO & LIMA, 1987), no Pernambuco – 40,4% (SILVA *et al.*, 2003) e na Malásia – 35,5% (CHANDRAWATHANI *et al.*, 2008).

No Paraná, em Londrina, de 153 amostras de sangue de caprinos de oito propriedades leiteiras, 30,71% foram sororreagentes, com títulos iguais ou superiores a 1:64 (SELLA *et al.*, 1994), percentual que referenda nossos dados. Ainda no Paraná, no município de Guarapuava, surto de aborto ocorreu em um rebanho caprino entre junho e julho de 2005. A propriedade possuía 304 animais e 271 (89,1%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, pesquisados por RIFI, título 1:64. A propriedade tinha 136 fêmeas prenhes sendo que 61 abortaram, e dessas 59

apresentaram títulos positivos para *T. gondii* (SILVA FILHO *et al.*, 2008). Esta propriedade é atípica por se tratar de uma propriedade com surto epidêmico.

Entre os fatores de risco há aqueles referentes aos animais individualmente, como sexo, idade e raça. Todavia, deve-se levar em consideração fatores que dizem respeito ao tipo de exploração e manejo dos rebanhos, e até fatores climáticos (BISSON *et al.*, 2000; VAN DER PUIJE *et al.*, 2000; UZÊDA *et al.*, 2004; JITTAPALAPONG *et al.*, 2005; CAVALCANTE *et al.*, 2008; NETO *et al.*, 2008).

Os fatores climáticos não foram avaliados neste estudo. Porém, as propriedades estudadas ficavam em municípios próximos e tinham climas muito similares com exceção da propriedade localizada no município de Guaratuba, litoral do Paraná. Condições climáticas, particularmente o índice de chuvas e temperatura, são consideradas na prevalência da infecção por *T. gondii*, uma vez que os oocistos resistem por período maior em condições de alta umidade e temperaturas entre 15 a 25°C. A cobertura vegetal e o tipo do solo também afetam o micro clima onde estão os oocistos (BISSON *et al.*, 2000). Rodrigues-Ponce *et al.* (1995) relatam que áreas com temperaturas baixas possuem menores taxas de prevalência para toxoplasmose. Além disso, o vento apresenta-se como um importante fator de risco para disseminar oocistos, a principal fonte de contaminação para herbívoros.

Quanto a faixa etária, em nosso estudo, os animais foram divididos em três faixas: de 0 a 1 ano, entre 1 e 3 anos e acima de 3 anos, sendo que os índices de positividade foram de 20,21%, 34,06% e 54,33% respectivamente, de acordo com a técnica ELISA. Alguns estudos demonstram que animais mais velhos possuem maior taxa de positividade, pois estão há mais tempo expostos aos oocistos de *T. gondii* presentes no ambiente. Machado & Lima (1987) e Jittapalapong *et al.* (2005) encontraram maior prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em animais com idade igual ou superior a um ano. Sella *et al.* (1994), Van der Puije *et al.* (2000), Uzêda *et al.* (2004), e Cavalcante *et al.* (2008), também encontraram maior prevalência da toxoplasmose em caprinos adultos, confirmando que eles possuem maior possibilidade de se infectarem no ambiente. Neste estudo é possível verificar o número de soropositivos aumenta com a idade dos animais.

A associação entre a positividade dos animais e o sexo também foi avaliada verificando-se que 23,19% dos machos e 42,86% das fêmeas foram reagentes para *T. gondii*. Esse dado corrobora os encontrados por Van der Puije *et al.* (2000),

Uzêda *et al.* (2004) e Jittapalapong *et al.* (2005), que também observaram influência da variável sexo em estudos realizados em Gana, Bahia e Tailândia, respectivamente. Uzêda *et al.* (2004) discutem que fêmeas apresentam maior positividade que machos devido a uma possível imunossupressão relacionada a eventos de gestação e lactação. Esses autores relatam que fêmeas em lactação tiveram maior percentual de positividade (22,8%), seguido por fêmeas gestantes (20,8%) e fêmeas secas (17%). Já Sella *et al.* (1994), em Londrina-PR, relataram percentual de positividade de 32,02% para fêmeas lactantes, 22,87% para fêmeas gestantes e 9,8% para fêmeas secas, o que não foi considerado estatisticamente significativo. A diferença encontrada neste estudo para uma maior positividade entre as fêmeas pode ser explicada pelo fato de ter sido coletado entre os machos, um maior número de animais com menos de um ano de idade. Enquanto que do total de fêmeas, apenas 17,6% tem menos de um ano, entre os machos 50,7% tem idade inferior a um ano. Isso é um reflexo do perfil das propriedades estudadas, onde a exploração é voltada para carne e os machos são abatidos antes de completarem um ano. Os machos com mais de um ano de idade são reprodutores, e o número de fêmeas é portanto, muito superior que o número de machos.

Os fatores de risco identificados para toxoplasmose caprina nesse estudo, além da idade e sexo dos animais, foram a presença de gatos e roedores, acesso de gatos ao alimento dos caprinos, alimentação dos gatos, tipo de manejo, finalidade da criação e coccidiostático na ração dos caprinos. É sabido que a presença de gatos domésticos é um fator relevante na transmissão e infecção por *T. gondii* devido à eliminação de oocistos nas fezes, contaminando o ambiente. Felídeos têm um papel importante na toxoplasmose humana, mas caprinos podem formar um elo desta cadeia de transmissão veiculando cistos ou taquizoítos na carne ou leite (CHIARI *et al.*, 1987; RODRIGUEZ-PONCE *et al.*, 1995; JITTAPALAPONG *et al.*, 2005).

O acesso de gatos ao local de armazenamento dos alimentos também é um fator significativo na prevalência da infecção. Outro fator importante está relacionado à alimentação dos gatos, pois a prevalência da toxoplasmose caprina era maior nas propriedades onde os gatos caçavam, quando comparado com a propriedade onde os gatos eram tratados com ração. A prevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* em gatos depende da disponibilidade de presas onde os felinos vivem e de seu estilo de vida. Gatos errantes, que supostamente caçam, infectam-se mais que gatos de estimação, que são supostamente tratados com ração (VARGAS, 2006).

Todavia, estes dados são importantes pois mostram que poderá haver redução da contaminação quando correta alimentação é dada aos felídeos.

Essa associação positiva entre presença de gatos e alta taxa de anticorpos anti-*T. gondii* pode ser verificada no caso da propriedade 6, onde não havia gato na ocasião da coleta, mas foi relatado que algum tempo antes todos os gatos foram eliminados. Os proprietários relataram que haviam mais de 30 felídeos na propriedade, e que estavam causando problemas por subirem nos cochos dos animais e atacarem filhotes recém nascidos. Esta propriedade foi uma das que apresentaram maior taxa de soropositividade para toxoplasmose (61,33%), e praticamente todas as fêmeas abortaram por causa não identificada.

Foi encontrada uma maior prevalência de animais reagentes para toxoplasmose em propriedades localizadas em áreas peri-urbanas. Bisson *et al.* (2000) e Kamani *et al.* (2009) relatam que o número de caprinos soropositivos é maior em ambientes urbanos quando comparados com ambiente rural. Para outras espécies animais também há referências a este fator de risco. Thomaz-Soccol *et al.* (2009) em estudo em ovinos de Curitiba-PR encontraram maior percentual de animais com anticorpos anti-*T. gondii* em animais de área urbana em comparação com área Peri-urbana. Isso pode ser explicado devido ao fato de que a densidade e dinâmica populacional dos hospedeiros definitivos e intermediários variam entre os ambientes urbano e rural. Tanto gatos quanto roedores beneficiam-se da urbanização (maior acesso ao alimento), resultando numa maior disponibilidade de hospedeiros para o parasito.

A exploração extensiva mantém os animais mais dispersos e se torna um fator limitante na transmissão de vários agentes infecciosos (Machado & Lima, 1987). Esses autores discutem que a presença de oocistos de *T. gondii* nas pastagens e sua disseminação pela água devem ser os principais mecanismos de contaminação do ambiente. Chiari (1981), Silva *et al.* (2003) e Kamani *et al.* (2009) também verificam que o confinamento do rebanho pode ser um fator predisponente a aquisição da toxoplasmose. Por outro lado, Figueiredo *et al.* (2001) e Neto *et al.* (2008) escreveram que sistemas de manejo extensivo/semi-intensivo são fatores de risco associados a presença de anticorpos anti-*T. gondii*. Caprinos criados nesses tipos de sistemas têm maiores chances de contato com oocistos excretados por felídeos selvagens e domésticos, que esporulam e contaminam água e alimentos. Nesse trabalho, foi encontrado um menor índice de caprinos positivos em sistema de

manejo intensivo, porém apenas uma propriedade com tal sistema foi pesquisada, enquanto que todas as outras tinham sistema de manejo semi-intensivo.

Maiores soroprevalências também são observadas entre caprinos leiteiros quando comparados com animais criados para abate. Nas propriedades leiteiras, os animais se mantêm mais concentrados e em maior contato com alimentos e água possivelmente contaminados por oocistos. A criação de caprinos para corte é normalmente extensiva, diminuindo assim a chance de contaminação (SILVA *et al.*, 2003; JITTAPALAPONG *et al.*, 2005; CARNEIRO, 2006). É importante lembrar que em propriedades leiteiras a média da idade dos animais é maior e, conseqüentemente, suas chances de contato com oocistos também aumentam. Neste trabalho não foram estudadas propriedades exclusivamente leiteiras, mas a soropositividade foi maior em propriedades de exploração mista (carne e leite), que foi considerado um fator de risco.

Outro fator que não foi identificado aqui, talvez devido ao baixo número de propriedades com resposta negativa, foi a suplementação da alimentação dos animais com sal mineral. A falta de suplementação mineral é geralmente identificada como um fator de risco, e pode estar relacionado a queda das defesas orgânicas, animais suplementados apresentam uma maior imunocompetência se comparados aqueles que não recebem sal mineral (NETO *et al.*, 2008).

Conhecer a soroprevalência de toxoplasmose em um rebanho caprino é a primeira etapa para definir as medidas de controle que os órgãos de vigilância devem tomar. Como aqui mostrado, o grupo de risco são fêmeas pois em algumas propriedades mais de 80% da população não possui título de anticorpos. Como abortos e danos fetais acontecem apenas na fase aguda da infecção, fêmeas com infecção crônica já não são mais motivos de preocupação por parte do criador, visto que elas já podem ser consideradas imunizadas contra a doença. Com relação aos animais soronegativos, é preciso tomar alguns cuidados com a alimentação e água fornecida a eles, principalmente durante o período de cobertura e época de gestação, quando podem ocorrer problemas gestacionais.

Como herbívoros se infectam principalmente através da ingestão de oocistos, o recomendado seria a eliminação dos gatos da propriedade, ou tratá-los com ração, pois como demonstrado em nossos resultados propriedades cujos gatos eram alimentados com ração, a soroprevalência era menor. Porém, isso não resolve o

problema, visto que gatos da vizinhança ou felídeos selvagens também podem eliminar oocistos. Além disso, muitas vezes os criadores mantêm gatos para o controle de roedores e pragas, sendo difícil convencê-los a eliminar esses animais. Também é importante lembrar que gatos cronicamente infectados dificilmente irão re-excretar oocistos, não apresentando risco neste caso. Os maiores cuidados deveriam se direcionar a gatos jovens. Estas orientações devem ser repassadas aos produtores, pois o conhecimento dos riscos ajudará na tomada de medidas para redução da infecção no período gestacional. Pois a melhor maneira de controlar a infecção é protegendo os alimentos do contato com gatos e fornecer água de fonte confiável aos animais.

No caso de um surto de aborto, medidas rápidas devem ser tomadas para identificar a fonte do problema e, se causado por toxoplasmose, o tratamento das fêmeas com sulfadiazine e trimetopim via intramuscular faz cessar os abortos (SILVA FILHO *et al.*, 2008). É importante lembrar que o tratamento só tem efeito na fase aguda da infecção, sendo ineficiente na fase crônica.

A vacinação de animais vem sendo realizada em alguns países e visam a redução de dano fetal, redução do número de cistos teciduais e prevenir a formação de oocistos em gatos. A prevenção da formação de oocistos é a chave para controlar a dispersão do *T. gondii* (DUBEY, 1996). A vacina T-263, aplicada por via oral, composta por bradizoítos vivos de uma cepa mutante oocisto-negativa, tem sido efetiva em prevenir a eliminação de oocistos por gatos (FRENKEL *et al.*, 1991). Entretanto, a duração da imunidade induzida pela vacina ainda não foi determinada e não está comercialmente disponível (KIJLSTRA & JONGERT, 2008). Além disso, apesar do criador vacinar seus próprios gatos, isso não vai prevenir a contaminação por gatos errantes, da vizinhança e de felídeos selvagens.

Os objetivos da vacinação em animais de produção são reduzir os abortos em cabras e ovelhas devido a infecção transplacentária e reduzir o risco da exposição humana devido a ingestão de carne contaminada. Outra vacina comercial (Ovilis® Toxovax, Intervet) está disponível em alguns países e é produzida a partir de uma cepa mutante (S48) que não persiste em tecidos. É usada em países onde abortos associados a este parasito são freqüentes. Essa vacina reduz o dano fetal, entretanto não elimina a transmissão vertical quando a infecção ocorre durante a prenhez. Da perspectiva de segurança alimentar, a vacinação pode ser empregada

para reduzir ou prevenir a formação de cistos teciduais na carne (DUBEY, 1996; KIJLSTRA & JONGERT, 2008).

Pequenos ruminantes como caprinos são importante fonte de proteína (carne e leite) em muitos locais e podem servir de fonte de infecção para humanos. Felizmente, cistos teciduais de *T. gondii* não são resistentes ao ambiente e podem ser destruídos por calor, congelamento, processos de cura da carne ou outros meios de tratamento. Também não é recomendado o consumo de leite de cabras cru, pois apesar de dificilmente taquizoítos sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal, já houve relato de casos de contaminação de humanos por leite de cabras.

Eliminar a infecção de uma propriedade é tarefa difícil, praticamente impossível, visto que não há tratamento para toxoplasmose crônica. Além disso, o *T. gondii* está presente em todas as regiões do globo, com mais de 90% de caprinos infectados em algumas regiões, e uma propriedade totalmente livre da infecção, se não tomados os devidos cuidados, facilmente apresentaria problemas. Assim, o melhor a se fazer contra a toxoplasmose é adotar medidas para minimizar seus efeitos.

## 6 – CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1. O cultivo de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* pode ser feito tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o que permite a obtenção de antígeno de boa qualidade para a técnica de imunofluorescência indireta.
2. O método de cultivo *in vivo* é mais fácil na obtenção de taquizoítos. Porém, o método *in vitro*, se realizado em condições ótimas e livre de contaminação, é igualmente eficiente e não necessita do sacrifício de camundongos a cada dois dias.
3. Os métodos ELISA e RIFI (IgG) padronizados são eficientes para o diagnóstico da toxoplasmose caprina.
4. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que os métodos de RIFI e ELISA são equivalentes e que a correlação entre os resultados obtidos com esses métodos é alta e positiva (0,91).
5. O método ELISA é indicado para processos de triagem sorológica e em estudos soroepidemiológicos, enquanto que a RIFI deve ser indicada principalmente como método de diagnóstico individual em caprinos com suspeita de toxoplasmose.
6. A frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* na população de caprinos da Mesorregião Metropolitana de Curitiba do Paraná foi de 35,96% no método de Imunofluorescência Indireta.
7. A frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* na população de caprinos da Mesorregião Metropolitana de Curitiba do Paraná foi de 39,41% pelo método de Enzimaimunoensaio indireto.
8. Após a correção das frequências de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, de acordo com a copositividade e conegatividade do método ELISA usado para a sorologia, observou-se uma prevalência estimada de toxoplasmose em caprinos na Mesorregião Metropolitana de Curitiba do Paraná de 35,95%.
9. A soroprevalência de toxoplasmose em caprinos variou de 11,4 a 80% para RIFI e de 14,29 a 80% para ELISA conforme a propriedade estudada.

10. Na população caprina estudada, a prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* observada foi maior em fêmeas e apresentou um perfil crescente de sororreagentes com o avançar da idade dos animais.
11. Os principais fatores de risco para a toxoplasmose caprina identificados nesse estudo são a presença de gatos junto do rebanho, o acesso de gatos ao alimento dos caprinos, tipo de alimentação dos gatos, tipo de manejo dos caprinos e finalidade da criação.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; NAVARRO, I. T.; BARBOSA, C. S. Avaliação de aglutininas anti-*Toxoplasma* em soros de caprinos de cinco centros de criação do nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 2: 75-77. 1997.
- AMARAL, V.; SANTOS, S. M.; REBOUÇAS, M. M. Sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de caprinos e ovinos procedentes, respectivamente, dos estados da Bahia e Rio Grande do Sul, BR. **O Biológico**, 44: 331-340. 1978.
- AMATO NETO, V., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S. D. **Toxoplasmose**. 4ª ed. São Paulo: Sarvier. 1995.
- ANDRADE, G. M. Q., CARVALHO, A. L., CARVALHO, I. R., NOGUEIRA, M. G. S., ARAÚJO, F. A. P. **Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em soros de caprinos da região da grande Porto Alegre/RS**. Arquivos da Faculdade de Veterinária Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 12: 25-34. 2004.
- ARAÚJO, F. R.; SARTI, E. C.; BALBUENA, C. B.; CARVALHO, C. M. E.; RAMOS, J. K. Levantamento sorológico para *Toxoplasma gondii* em caprinos na microrregião de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Ensaio**, Campo Grande-MS. 2: 141-148. 1998.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; WILKEN de ABREU, A. M.; AZEVEDO-SILVA, J.; ÔREFICE, F. Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. **International Journal for Parasitology**. 31: 133-136. 2001.
- BISSON, A.; MALEY, S.; RUBAIRE-AKIIKI, C. M.; WASTLING, J. M. The seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic goats in Uganda. **Acta Tropica**. 76: 33-38. 2000.
- BLEWETT, D. A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. I. The interpretation of data for the prevalence of antibody in sheep and other host species. **British Veterinary Journal**. 139: 537-545. 1983.
- BLEWETT, D. A. & WATSON, W. A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. III. Observations on outbreaks of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. **British Veterinary Journal**. 140: 54-63. 1984.
- BONNA, I. C. F.; FIGUEIREDO, F. B.; COSTA, T.; VICENTE, R. T.; SANTIAGO, C. A. D.; NICOLAU, J. L.; NEVES, L. B.; MILLAR, P. R.; SOBREIRO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Estudo soropidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos para abate, em região rural do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 13 (3): 186-189. 2006.

- BORDE, G.; LOWHAR G.; ADESIYUN, A. *Toxoplasma gondii* and *Chlamydophila abortus* in caprine abortions in Tobago: a sero-epidemiological study. **Journal of Veterinary Medicine B.** 53 (4): 188-194. 2006.
- BOSSI, P. & BRICAIRE, F. Severe acute disseminated toxoplasmosis. **The Lancet**, 363: 1965-76, 2004.
- BRASIL: FUNASA. Boletim Eletrônico Epidemiológico: Surto de Toxoplasmose no Município de Santa Isabel do Ivaí – Paraná. 2 (3). 2002. Disponível em: [http://www.funasa.gov.br/pub/boletim\\_eletronico\\_epi/boletim\\_eletronico\\_epi\\_0302.pdf](http://www.funasa.gov.br/pub/boletim_eletronico_epi/boletim_eletronico_epi_0302.pdf)
- BUXTON, D. Ovine toxoplasmosis: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine.** 83: 509-511. 1990.
- CAMARGO, A. C.; SILVA, A. C. S.; MARROCOS, H. H. S.; ROSENAIL, J.; OLIVEIRA, L. M. A.; FALCÃO, R. R. Estudo comparativo entre diferentes métodos para diagnóstico da toxoplasmose humana. **NewsLab.** 28: 121-128. 1998.
- CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** 6 (3): 117-118. 1964.
- CAMARGO, M. E., SILVA, S. M., LESER, P. G., GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** 33: 213-218. 1991.
- CARNEIRO, A. C. A. V. Soro-epidemiologia da Toxoplasmose Caprina e Ovina no Estado de Minas Gerais. **Dissertação (Mestrado).** Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.
- CASTRO, E. A.; Aspectos Epidemiológicos e Parasitológicos da Leishmaniose Tegumentar em Duas Regiões no Estado do Paraná e o Papel do Cão na Manutenção do Ciclo de *Leishmania*. **Dissertação (Doutorado).** Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.
- CAVALCANTE, A. C. R.; CARNEIRO, M.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; VITOR, R. W. A. Risk factors for infection by *Toxoplasma gondii* in herds of goats in Ceará, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** 60 (1): 36-41. 2008.
- CHANDRAWATHANI, P.; NURULAINI, R.; ZANIN, C. M.; PREMAALATHA, B.; ADNAN, M.; JAMNAH, O.; KHOR, S. K.; KHADIJAH, S.; LAI, S. Z.; SHAIK, M. A. B.; SEAH, T. C.; ZATIL, S. A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs, goats, cattle, dogs and cats in peninsular Malaysia. **Tropical Biomedicine.** 25 (3): 257-258. 2008.

- CHIARI, C. A. Soroepidemiologia da toxoplasmose caprina. **Dissertação (Doutorado)**. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1981.
- CHIARI, C. A.; LIMA, W. S.; LIMA, J. D.; ANTUNES, C. M. F. Soro-epidemiologia da toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 39: 587-609. 1987.
- CHIARI, C. A.; NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 79: 337-340. 1984.
- CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. In: AMATO NETO, V.; MARCHI, C. R. **Toxoplasmose**. Ed. Atheneu, São Paulo. 1999.
- CORCUERA, M. T.; LOZADA, J.; LOPEZ, R. F. Estudio comparativo de las distintas técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la toxoplasmosis. **Revista de la Sanidad e Higiene Publica**. 55: 1045-1059. 1981.
- COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias – v.1**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.
- DIAS, R. A. F.; NAVARRO, I. T.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, M. V.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 47 (4): 185-189. 2005.
- DITTRICH, R. L. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em eqüinos no estado do Paraná, Brasil. **Dissertação (Doutorado)**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2002.
- DOMINGUES, L. M.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI COSTA, M.; CARVALHO, C. S.; COSTA, A. J.; MALHEIROS, E. B. Canine toxoplasmosis: a comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and the indirect immunofluorescence reaction (IIF). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 7 (2): 79-85. 1998.
- DUBEY, J. P. Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from goats. **American Journal of Veterinary Research**. 3 (41): 427-429. 1980.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma* induced abortion in dairy goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**. 178: 671-674. 1981.
- DUBEY, J. P. Serologic prevalence of toxoplasmosis in cattle, sheep, goats, pigs, bison and elk in Montana. **Journal of American Veterinary Medical Association**. 186: 969-970. 1985.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. 17 (6): 1389-1404. 1987.

- DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**. 64: 65-70. 1996.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**. 126 (1-2): 57-72. 2004.
- DUBEY, J. P. The History of *Toxoplasma gondii* – The First 100 Years. **Journal Eukaryotic Microbiology**, 55 (6): 467-475. 2008.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of Animals and Man. **Boca Raton**. Florida. 1988.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of Tissues Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**. 11 (2): 267-299. 1998.
- DUBEY, J. P.; GAMBLE, H. R.; HILL, D.; SREEKUMAR, C.; ROMAND, S.; THUILLIEZ, P. High prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. **Journal of Parasitology**. 88: 1234-1238. 2002.
- FARIA, E. B.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, M. L. C. R.; AZEVEDO, S. S. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**. 149: 126-129. 2007.
- FELDMAN, H. & MILLER, L. Serological study of toxoplasmosis prevalence. **American Journal Hygiene**, 64: 320-335. 1956.
- FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S. **Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana**. Barueri, SP: Manole, 2003.
- FIALHO, C. G.; ARAUJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos na região da grande Porto Alegre-RS, Brasil. **Ciência Rural**. 33 (5): 893-897. 2002.
- FIGLIUOLO, L. P.; RODRIGUES A. A. R.; VIANA, R. B.; AGUIAR, D. M.; KASAI, N.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats from São Paulo state, Brazil. **Small Ruminant Residence**. 55: 29-32. 2004.
- FIGUEIREDO, J. F.; SILVA, D. A. O.; CABRAL, D. D.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Goats by the Indirect Haemagglutination, Immunofluorescence and Immunoenzymatic Tests in the Region of Uberlândia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 96 (5): 687-692. 2001.
- FREIRE, R. L.; GIRALDI, N.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T. Levantamento soroepidemiológico da toxoplasmose em ovinos da região de Londrina-PR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 47 (4): 609-612. 1995.

- FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; VIANA, C. L. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina-Paraná. **SEMINA: Ciências Agrárias**, 13: 18-20. 1992.
- FRENKEL, J. K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology Today**. 4 (10): 273-278. 1988.
- FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in and around us. **BioScience**. 23: 343-352. 1973.
- FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**. 167: 893-896. 1970.
- FRENKEL, J. K.; PFEFFERKORN, E. R.; SMITH, D. D.; FISHBACK, J. L. prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **American Journal Veterinary Research**. 52: 759-763. 1991.
- FRENKEL, J. K.; RUIZ, A. A.; CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma gondii* in Kansas and Costa Rica. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**. 24: 439-443. 1975.
- FREYRE, A.; BONINO, J.; FALCON, J.; CASTELLS, D.; CORREA, D.; CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Veterinary Parasitology**. 81: 85-88. 1999.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; MARANA, E. R. M. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**. 30 (1): 123-127. 2000.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**. 29 (1): 91-97. 1999.
- GAZÊTA, G. S.; DUTRA, A. E. A.; NORBERG, A. N.; SERRA-FREIRE, N. M.; SOUZA, W. J. S.; AMORIM, M.; LOPES, L. M. S. Freqüência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de eqüinos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 6 (2): 87-91. 1997.
- GUIMARÃES, M. C.; COUTINHO, S. G.; ANTUNES, C. M. F. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro. 20 (1): 55-58. 1987.
- HABERMAN, S. J. The analysis of residuals in cross-classified tables. **Biometrics**. 29: 205-220. 1973.
- HASHEMI-FESHARKI, R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. **Veterinary Parasitology**. 61: 1-3. 1996.

- HIGA, A. C. MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; DOMINGUES, L. M.; MALHEIROS, E. B. Evaluation of cross-reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antigens in dogs sera. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 9 (2): 91-95. 2000.
- HILL, D. E.; SREEKUMAR, C.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**. 6 (1): 41-61. 2005.
- HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**. 8: 634-640. 2002.
- HUTCHISON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**. 206: 961-962. 1965.
- IBGE. Censo agropecuário 2006. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>
- JITTAPALAPONG, S.; SANGVARANOND, A.; PINYOPANUWAT, N.; CHIMNOI, W.; KHACHEARAM, W.; KOIZUMI, S.; MARUYAMA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. **Veterinary Parasitology**. 127: 17-22. 2005.
- KAMANI, J.; MANI, A. U.; EGWU, G. O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep and goats in Borno state, Nigeria. **Tropical Animal Health Production**. 2009.
- KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**. 38: 1359-1370. 2008.
- KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 41 (4): 229-235. 2005.
- LANGONI, H.; SILVA, A. V.; ROSA, C.; MARINHO, M.; LISTONI, F. J. P. Inquérito soropidemiológico para a toxoplasmose em ovinos no estado de São Paulo, Brasil. **O Biológico**. São Paulo. 61 (1): 35-39. 1999.
- LARSON, C. E.; JAMRA, L. M. F.; GUIMARÃES, E. C. Prevalência da toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo. 4 (14): 582-588. 1980.
- LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A Newly Revised Classification of the Protozoa. **Journal Protozoology**. 27 (1): 37-58. 1980.
- MACHADO, T. M. M. & LIMA, J. D. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos criados sob diferentes formas de exploração no estado de Minas

Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 39: 255-264. 1987.

MACIEL, K. P. Inquérito sorológico para detecção de anticorpos de *Toxoplasma gondii* em caprinos (*Capra hircus*) criados nos municípios de Gravataí e Viamão, região da Grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004.

MACIEL, K. P.; ARAÚJO, F. A. P. Inquérito sorológico para detecção de anticorpos de *Toxoplasma gondii* em caprinos (*Capra hircus*) criados nos municípios de Gravataí e Viamão, região da Grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Ciência Agroveterinária**. Lages, 3 (2): 121-125. 2004.

MAINARDI, R. S.; STACCHISSINI, A. V. M.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; MODOLO, J. R. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 9 (2): 97-99. 2000.

MARTINS, E. C.; GARAGORRY, F. L.; FILHO, H. C. Evolução da Caprinocultura Brasileira no Período de 1975 a 2003. **Comunicado Técnico 66**. EMBRAPA. Sobral-CE. Dezembro 2006. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br/cot66.pdf>

MASALA, G.; PORCU, R.; MADAU, L.; TANDA, A.; IBBA, B.; SATTA, G.; TOLA, S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. **Veterinary Parasitology**. 117: 15-21. 2003.

MCCOLGAN, C.; BUXTON, D. BLEWETT, D. A. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. **Veterinary Record** 123: 467-70. 1988.

MEIRELES, L. R.; GALISTEO JUNIOR, A. J.; ANDRADE JUNIOR, F. serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. 40: 267: 271. 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica. **Surto de Toxoplasmose no Município de Goiânia-GO**, Fevereiro de 2006. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_toxo\\_corrigida.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_toxo_corrigida.pdf)

MINOZZO, J. C. Teníase/cisticercose Teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) para o diagnóstico da cisticercose bovina. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1997.

MODOLO, J. R.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; BARROZO, L. V.; LEITE, B. L. S.; GENNARI, S. M.; STACCHISSINI, A. V. M. Avaliação da ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, em soros de caprinos do estado de São Paulo, e associação com variáveis epidemiológicas, problemas reprodutivos e riscos à saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 28 (12): 606-610. 2008.

MOURA, A. B.; OSAKI, S. C.; ZULPO, D. L.; MANARA, E. R. M. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 16 (1): 54-56. 2007.

MUNDAY, B. L.; MANSON, R. W. Toxoplasmosis as a cause of perinatal death in goats. **Australian Veterinary Journal**. 55: 485-487. 1979.

NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii*, isolamento em carnes e cérebro de suínos. **SEMINA: Ciências Agrárias**, 13: 10-15. 1992.

NETO, J. O. A.; AZEVEDO, S.S.; GENNARI, S. M.; FUNADA, M. R.; PENA, H. F. J.; ARAUJO, A. R. C. P.; BATISTA, C. S. A.; SILVA, M. L. C. R.; GOMES, A. A. B.; PIATTI, R. M.; ALVES, C. J. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**. 156: 329-332. 2008.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, p. 163-172. 2005.

NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **C. R. Seances Acad. Sci**. 148: 369-372. 1909.

NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**. 147: 763-766. 1908.

NIETO, S. O.; MELENDEZ, R. D. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in goats from arid zones of Venezuela. **Journal Parasitology**. 84: 190-191. 1998.

OGAWA, L.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; OLIVEIRA, R. C. DE; VIDOTTO, O. Occurrence de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos da região de Londrina no estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**. 24 (1): 57-62. 2003.

ORTOLANI, E. S.; GENNARI, S. M.; PINHEIRO, S. R.; RODRIGUES, A. A. R.; CHIEBAO, D. P.; SOARES, R. M. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em populações animais das aldeias indígenas Krucutu e Morro da Saudade, no município de São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. 12 (1/2): 25-28. 2005.

PARK, B. K.; MOON, H. R.; YU, J. R.; KOOK, J.; CHAI, J. Y.; LEE, S. H. Comparative Susceibility of different cells lines of culture of *Toxoplasma gondii* in vitro. **Korean Journal of Parasitology**. 31 (3): 215-222. 1993.

PASSOS, L. N., FILHO, O. F. A., ANDRADE JR, H. F. Toxoplasma Encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. 42 (3): 141-145. 2000.

- PATTON, S.; JOHNSON, S. S.; PUCKETT, K. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in nine populations of dairy goats: compared titers using modified direct agglutination and indirect hemagglutination. **The Journal of Parasitology**, 76: 74-77. 1990.
- PEDRASSANI, D. Prevalência de títulos de anticorpos imunoglobulinas G anti-*Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 em cães. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.
- PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
- PESCADOR, C. A.; OLIVEIRA, E. C.; PEDROSO, P. M. O.; BANDARRA, P. M.; OKUDA, L. H.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 27 (4): 167-171. Porto Alegre. 2007.
- PITA-GONDIM, L. F. P.; BARBOSA JR., H. V.; RIBEIRO FILHO, C. H. A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 82: 273-276. 1999.
- REMYINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O.; eds. **Infectious disease of the fetus and newborn infant**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1995.
- REY, L. **Parasitologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991.
- RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. São Paulo. Nobel. 1998.
- RODRIGUEZ-PONCE, E.; MOLINA, J. M.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S. Seroprevalence of goat toxoplasmosis on Grand Canary Islands. **Preventive Veterinary Medicine**. 24: 229-234. 1995.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ. 2007.
- SELLA, M. Z.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. I.; SHIDA, P. N. Epidemiologia da toxoplasmose caprina: Levantamento sorológico do *Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros na micro região de Londrina, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 3 (1): 13-16. 1994.
- SERRA-FREIRE, N. M.; NORBERG, A. M.; GAZÊTA, G. S. Toxoplasmose caprina no Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitologia al Dia**, 18: 77-81. 1994.
- SILVA FILHO, M. F.; ERZINGER, E.; CUNHA, I. A. L.; BUGNI, F. M.; HAMADA, F. M.; MARANA, E. R. M.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. *Toxoplasma gondii*: abortion outbreak in a goatherd from Southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina. 29 (4): 887-894. 2008.

- SILVA, A. V.; CUNHA, L. P.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, 33 (1): 115-119. 2003.
- SILVA, A. V.; CUTOLO, A. A.; LANGONI, H. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo. 69 (1): 7-11. 2002.
- SILVA, D. A. O.; CABRAL, D. D.; BERNARDINA, B. L. D.; SOUZA, M. A.; MINEO, J. R. Detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in dogs. A comparative study of immunoenzymatic, immunofluorescent and haemagglutination titers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. 92 (6): 785-789, 1997.
- SKINNER, L. J.; TIMPERLEY, A. C.; WIGHTMAN, D.; CHATTERTON, J. M. W.; HO-YEN, D. O. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. 22 (3): 359-361. 1990.
- SKJERVE, E.; WALDELAND, H.; NESBAKKEN, T.; KAPPERUND, G. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. **Preventive Medicine Veterinary**. 35: 219-227. 1998.
- SOUZA, S. L. P. DE; GENNARI, S. M.; YAI, L. E. O.; D'AURIA, S. R. N.; CARDOSO, S. M. S.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; DUBEY, J. P. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* no soro de cães de áreas urbanas e rurais do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 12 (1): 1-3. 2003.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti Il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pela. **Revista da Sociedade Científica de São Paulo**. 3: 109-112. 1908.
- SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**. 137 (1):1-11. 2010.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**. 30: 1217-1258. 2000.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; GAZDA, T. L.; GARCIA, G.; RICHARTZ, R. R. T. B.; DITTRICH, R. L. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos das áreas urbanas e periurbanas de Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 18 (1): 69-70. 2009.
- THURSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2ª. Ed. São Paulo: Roca, 2004.
- TSUTSUI, V. S.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; VIEIRA, D. P.; MARANA, E. R. M.; PRUDÊNCIO, L. B.; NAVARRO, I. T. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally

infected pigs. **Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e Zootecnia**. 59 (1): 30-34. 2007.

TSUTSUI, V. S.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, L. R.; FREITAS, J. C.; PRUDENCIO, L. B.; DELBEM, A. C. B.; MARANA, E. R. M. Serumepidemiology and associated factors on swine transmission of *Toxoplasma gondii* at northern Paraná – Brazil. **Archives of Veterinary Science**. 8 (2): 27-34. 2003.

UZÊDA, R. S.; FERNANDES, S. Y.; JESUS, E. E. V.; PINHEIRO, A. M.; AYRES, M. C. C.; SPINOLA, S.; BARBOSA JUNIOR, H. V.; ALMEIDA, M. A. O. Fatores Relacionados a Presença de Anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em Caprinos Leiteiros do Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 5 (1): 1-8. 2004.

VAN DER PUIJE, W. N.; BOSOMPEN, K. M.; CANACOO, E. A.; WASTLING, J. M.; AKANMORI, B. D. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. **Acta Tropica**. 76: 21-26. 2000.

VARGAS, C. S. G. Títulos de Anticorpo da Classe IgG ANTI- *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1908) e de Oocistos em Fezes de Gatos de Rua (*Felis catus* – LINNAEUS, 1758) em Curitiba, Paraná. **Dissertação (Mestrado)**. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

VAZ, R. S. Diagnóstico sorológico, isolamento e caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* (Nicole & Manceaux, 1909) em mulheres gestantes atendidas pelo serviço público na cidade de Curitiba. 2006. **Tese (Doutorado)** Curso de pós Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná.

VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. 2ª. Ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2002.

VILLENEUVE, A. Les zoonoses parasitaires. L´infection chez les animaux et chez les hommes . **Les Presses de L´Université de Montreal**, Québec, 2003.

VITOR, R. W. A.; PINTO, J. B.; CHIARI, C. A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 43 (2): 147-154. 1991.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents reciprocal oral infection and potential human hazard. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 87: 211-216. 1954.

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. **Science**. 89: 226-227. 1939.

## ANEXOS

## ANEXO 1

## QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PARA TOXOPLASMOSE CAPRINA

Propriedade: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_

Localização: ( ) urbana ( ) peri-urbana ( ) rural

Área total da propriedade (hectares ou alqueires): \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Atividade principal: ( ) pecuária ( ) agricultura ( ) mista ( ) outra

**Rebanho caprino (colocar o número de animais por faixa etária):**

Caprino	0-12 meses (0-1 ano)	12-36 meses (1-3 anos)	Mais de 36 meses (+ 3 anos)
Machos			
Fêmeas			

**Outros animais (colocar o total de animais de cada espécie):**

Bovinos:	
Ovinos:	
Suínos:	
Eqüinos:	
Aves:	
Caninos:	
Felinos	Machos adultos:
	Fêmeas adultas:
	Filhotes:

**Animais silvestres e pragas:**

( ) roedores ( ) aves

( ) outros (especificar): \_\_\_\_\_

**Manejo sanitário:**

Há acompanhamento sanitário do rebanho por um médico veterinário?

( ) sim ( ) não

Existe registro por escrito do histórico dos animais?

( ) sim, detalhar na ficha de coleta ( ) não

Quais os principais problemas sanitários? \_\_\_\_\_

Já houve casos de aborto na propriedade? ( ) sim ( ) não

Qual a causa? \_\_\_\_\_

O aborto foi no: ( ) início da gestação ( ) meio ( ) final da gestação?

Já houve casos de animais nascidos mortos? ( ) sim ( ) não  
 É feito diagnóstico de gestação das fêmeas? ( ) sim ( ) não  
 Já houve casos em que o peso dos animais nascidos estava muito abaixo do normal? ( ) sim ( ) não

Como é o esquema de desverminação? \_\_\_\_\_  
 frequência em meses \_\_\_\_\_  
 muda de medicamento regularmente? ( ) sim ( ) não ( ) não sabe  
 Quais vacinas são aplicadas? \_\_\_\_\_

**Alimentação (pode marcar mais de uma opção):**

( ) pasto ( ) verde no cocho ( ) silagem ( ) feno  
 ( ) concentrado comprado ( ) concentrado feito na propriedade  
 ( ) sal comum ( ) sal mineral  
 ( ) outros (especificar): \_\_\_\_\_  
 O concentrado contém coccidiostático? ( ) sim ( ) não ( ) não sabe

**Como é o local de armazenamento dos alimentos?**

( ) aberto ( ) fechado  
 Tem acesso de: gatos? ( ) sim ( ) não  
 roedores? ( ) sim ( ) não  
 aves? ( ) sim ( ) não

Como é a alimentação dos gatos?

( ) ração ( ) restos de comida ( ) caça ( ) outros \_\_\_\_\_

**Qual a origem da água dos animais?**

( ) rede pública ( ) poço convencional ( ) mina ( ) represa ( )  
 açude pluvial ( ) córrego ( ) outros \_\_\_\_\_

A água é armazenada em caixa de água? ( ) sim ( ) não

A caixa de água é limpa regularmente? ( ) sim ( ) não

A fonte de abastecimento de água está próxima a:

( ) curral ( ) esgoto ( ) privada ( ) canil ( ) nenhum destes

**Manejo:** ( ) confinado o tempo todo ( ) confinado a noite e solto durante o dia  
 ( ) no pasto o tempo todo

**Instalação:** ( ) piso ripado ( ) chão batido ( ) chão batido + cama  
 ( ) cimento + cama ( ) sem instalação

Há quanto tempo existe a criação de caprinos (anos)? \_\_\_\_\_

Os animais são: ( ) da região ( ) de fora

Quantas pessoas moram na propriedade? \_\_\_\_\_

Quem maneja os animais? ( ) família ( ) funcionário

**Qual a finalidade da criação?** ( ) carne ( ) leite ( ) mista

Ocorre abate de animais na propriedade? ( ) sim ( ) não



## ANEXO 2

## CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)



Nº 427

## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

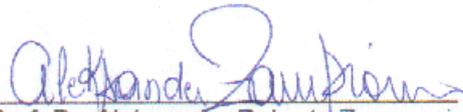
**PROCESSO:** 23075.104847/2009-31

**APROVADO:** 01/12/2009 – R.O. 11/2009

**TÍTULO:** Levantamento soroepidemiológico para toxoplasmose caprina na região de Curitiba, Paraná, Brasil

**AUTORES:** Vanete Thomaz Soccol, Guilherme Garcia

**DEPARTAMENTO:** Patologia Básica

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
Coordenador do CEEA

**ANEXO 3****MÉTODO DE CONGELAMENTO DAS CEPAS DE *T. GONDII***

Tem a finalidade de manter taquizoítos para usos futuros.

1. obter tubos ricos em toxoplasma;
2. centrifugar a 2500 rpm, 4°C, 15 minutos;
3. tirar o sobrenadante e reservar;
4. acrescentar ao sedimento 1,5ml de glicerina a 10% e 0,5ml do sobrenadante reservado;
5. verificar a motilidade dos taquizoítos;
6. distribuir em tubos de criopreservação Nunc (0,7ml/tubo) e identificar;
7. deixar por 1 hora em geladeira 4°C;
8. congelar em nitrogênio líquido (CASTRO, 2001).

## ANEXO 4

### MÉTODO DE CONGELAMENTO DAS CÉLULAS VERO

Tem a finalidade de manter células vero para usos futuros.

1. tripsinizar as garrafas contendo monocamada de células vero;
2. passar esse líquido para tubos falcon de 15ml;
3. centrifugar a 2000 rpm, 6°C, por 10 minutos;
4. descartar o sobrenadante;
5. ressuspender o pellet em 900µl de soro fetal bobino e 100µl de DMSO;
6. passar para tubos Nunc, 0,7 a 1,0ml/tubo, identificar;
7. deixar na geladeira a 4°C por uma hora;
8. congelar em nitrogênio líquido (DITTRICH, 2002).

**ANEXO 5****SOLUÇÕES NECESSÁRIAS PARA A REALIZAÇÃO DA RIFI****Tampão fosfato PBS pH 7,2**

- 8,77g cloreto de sódio (NaCl) PA 0,15M
- 1,92g fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 0,39g fosfato de sódio monobásico anidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) PA 0,0028M
- 1000ml água destilada (q.s.p.)

Dissolver na água destilada e acertar o pH em 7,2.

**Solução de azul de Evans.****Glicerina tamponada a 90%.**

## ANEXO 6

### SOLUÇÕES USADAS PARA O TESTE ELISA

#### Lista de reativos

- Ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ );
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ );
- Caseína;
- Carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ );
- Bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ );
- Fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4$ );
- Cloreto de sódio ( $NaCl$ );
- Hidróxido de sódio ( $NaOH$ );
- Ortofenilenodiamino(OPD): pastilhas de 2mg;
- Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ );
- Tween 20.

#### Solução Tampão carbonato 0,005M (coating buffer)

- Solução A: 1,1g  $Na_2CO_3$  para 200 ml de água deionizada.
- Solução B: 4,2g de  $NaHCO_3$  para 1litro de água deionizada.
- Adicionar A em B acertando o pH para 9,6.

#### Solução de lavagem:

- 9g de  $NaCl$ ;
- 0,5 ml de Tween 20;
- Água destilada q.s.p. 1 litro.

Adicionar Tween 20após dissolver o  $NaCl$ .

#### Solução de bloqueio da placa:

- Caseína 2% em PBS – 2g de caseína para 100ml de PBS pH 7,4;
- 0,05% de Tween 20.

#### Tampão fosfato PBS pH 7,4

- 8,77g cloreto de sódio ( $NaCl$ ) PA 0,15M

- 1,92g fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 0,39g fosfato de sódio monobásico anidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) PA 0,0028M
- 1000ml água destilada (q.s.p.)

Dissolver na água destilada e acertar o pH em 7,4.

#### **Tampão de incubação:**

- 0,25% caseína;
- 0,05% de Tween 20;
- Diluição em PBS.

#### **Tampão de citrato pH 5,0**

- 7,1g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 5,19g de ácido cítrico
- Água destilada q.s.p. 1 litro.

#### **Solução substrato – OPD 2 mg**

- Orto-fenilo-diamino (OPD) – 2mg;
- 2 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- 13ml de tampão citrato pH 5,0.

A solução substrato deve ser preparada no momento do uso. Para isso deve-se pipetar o tampão citrato, adicionar OPD e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O recipiente deve ser deixado ao abrigo da luz até a dissolução do OPD. A seguir procede-se a distribuição na placa.

#### **Solução de parada da reação**

- 1ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;
- 19ml de  $\text{H}_2\text{O}$  (destilada).

## ANEXO 7

## RESULTADOS DOS TESTES POR ANIMAL

## AMOSTRA

## RESULTADO

## PROPRIEDADE 1 – Guaratuba

	RIFI	ELISA		Sexo	Idade	
1- 023	16	0,140	Cut off	neg	F	> 3 anos
1- 109	16	0,148	0,162	neg	F	1 a 3 anos
1- 122	256	0,423		pos	F	> 3 anos
1- 129	16	0,095		neg	F	> 3 anos
1- 135	NEG	0,061		neg	F	> 3 anos
1- 166	256	0,548		pos	F	1 a 3 anos
1- 167	16	0,106		neg	F	> 3 anos
1- 170	NEG	0,101		neg	F	> 3 anos
1- 174	NEG	0,101		neg	F	1 a 3 anos
1- 205	NEG	0,094		neg	F	> 3 anos
1- 206	NEG	0,103		neg	F	1 a 3 anos
1- 220	16	0,108		neg	F	1 a 3 anos
1- 238	NEG	0,102		neg	F	> 3 anos
1- 245	1024	1,018		pos	F	1 a 3 anos
1- 246	16	0,125		neg	F	> 3 anos
1- 248	256	0,800		pos	F	> 3 anos
1- 318	16	0,109		neg	F	1 a 3 anos
1- 395	16	0,129		neg	F	1 a 3 anos
1- 426	16	0,131		neg	F	1 a 3 anos
1- 428	16	0,123		neg	F	1 a 3 anos
1- 440	NEG	0,080		neg	F	1 a 3 anos
1- 442	NEG	0,114		neg	F	1 a 3 anos
1- 449	16	0,100		neg	F	1 a 3 anos
1- 450	16	0,135		neg	F	> 3 anos
1- 452	NEG	0,130		neg	F	1 a 3 anos
1- 74	1024	1,088		pos	F	1 a 3 anos

## PROPRIEDADE 2 – Contenda

	RIFI	ELISA		sexo	idade	
2- 01	NEG	0,108	Cut off	neg	F	1 a 3 anos
2- 02	16	0,102	0,162	neg	F	1 a 3 anos
2- 03	16	0,071		neg	F	1 a 3 anos
2- 04	NEG	0,071		neg	F	1 a 3 anos
2- 05	256	0,711		pos	F	> 3 anos
2- 06	1024	0,857		pos	F	1 a 3 anos
2- 07	NEG	0,135		neg	F	> 3 anos
2- 08	NEG	0,090		neg	F	> 3 anos
2- 09	NEG	0,075		neg	F	1 a 3 anos
2- 10	16	0,085		neg	F	1 a 3 anos
2- 11	NEG	0,079		neg	F	1 a 3 anos
2- 12	16	0,061		neg	F	1 a 3 anos
2- 13	NEG	0,086		neg	F	1 a 3 anos
2- 14	16	0,086		neg	F	1 a 3 anos
2- 15	NEG	0,053		neg	F	1 a 3 anos

2- 16	16	0,066	neg	F	1 a 3 anos
2- 17	16	0,073	neg	F	1 a 3 anos
2- 18	16	0,098	neg	F	1 a 3 anos
2- 19	1024	0,501	pos	F	1 a 3 anos
2- 20	16	0,064	neg	F	> 3 anos
2- 21	16	0,088	neg	F	1 a 3 anos
2- 22	NEG	0,091	neg	F	> 3 anos
2- 23	16	0,055	neg	F	> 3 anos
2- 24	NEG	0,055	neg	F	> 3 anos
2- 25	NEG	0,081	neg	F	1 a 3 anos
2- 26	16	0,123	neg	F	1 a 3 anos
2- 27	NEG	0,059	neg	F	> 3 anos
2- 28	NEG	0,079	neg	F	> 3 anos
2- 29	16	0,128	neg	F	> 3 anos
2- 30	16	0,129	neg	F	> 3 anos
2- 31	NEG	0,057	neg	F	> 3 anos
2- 32	256	0,379	pos	F	> 3 anos
2- 33	16	0,114	neg	F	> 3 anos
2- 34	1024	0,664	pos	F	> 3 anos
2- 35	1024	0,806	pos	F	> 3 anos
2- 36	NEG	0,068	neg	F	1 a 3 anos
2- 37	NEG	0,141	neg	F	> 3 anos
2- 38	NEG	0,125	neg	F	1 a 3 anos
2- 39	16	0,077	neg	F	1 a 3 anos
2- 40	64	0,386	pos	F	> 3 anos
2- 41	16	0,148	neg	F	> 3 anos
2- 42	1024	0,776	pos	F	> 3 anos
2- 43	NEG	0,098	neg	F	1 a 3 anos
2- 44	16	0,160	neg	F	> 3 anos
2- 45	16	0,125	neg	F	> 3 anos
2- 46	1024	0,775	pos	F	1 a 3 anos
2- 47	NEG	0,068	neg	F	1 a 3 anos
2- 48	16	0,131	neg	F	> 3 anos
2- 49	64	0,203	pos	F	1 a 3 anos
2- 50	16	0,154	neg	M	> 3 anos

**PROPRIEDADE 3 – Campo Magro**

	<b>RIFI</b>	<b>ELISA</b>		<b>sexo</b>	<b>idade</b>	
3- 01	256	0,317	Cut off	pos	F	> 3 anos
3- 02	16	0,066	0,126	neg	F	1 a 3 anos
3- 03	16	0,091		neg	F	1 a 3 anos
3- 04	16	0,068		neg	F	1 a 3 anos
3- 05	16	0,081		neg	F	> 3 anos
3- 06	64	0,259		pos	F	> 3 anos
3- 07	16	0,080		neg	M	1 a 3 anos
3- 08	16	0,087		neg	M	1 a 3 anos
3- 09	16	0,175		pos	F	> 3 anos
3- 10	64	0,131		pos	F	> 3 anos
3- 11	NEG	0,094		neg	F	1 a 3 anos
3- 12	16	0,081		neg	F	> 3 anos
3- 13	NEG	0,090		neg	F	> 3 anos

3- 14	16	0,078	neg	F	1 a 3 anos
3- 15	16	0,092	neg	F	1 a 3 anos
3- 16	NEG	0,085	neg	F	1 a 3 anos
3- 17	256	0,446	pos	F	> 3 anos
3- 18	16	0,081	neg	F	1 a 3 anos
3- 19	NEG	0,093	neg	F	> 3 anos
3- 20	NEG	0,077	neg	F	> 3 anos

**PROPRIEDADE 4 – Fazenda Rio Grande**

	RIFI	ELISA		sexo	idade	
4- 0007	NEG	0,059	Cut off	neg	M	1 a 3 anos
4- 0028	NEG	0,069	0,126	neg	F	> 3 anos
4- 0048	256	0,315		pos	F	> 3 anos
4- 01	NEG	0,066		neg	F	> 3 anos
4- 02	NEG	0,062		neg	F	1 a 3 anos
4- 04	NEG	0,060		neg	F	> 3 anos
4- 05	16	0,065		neg	M	0 a 1 ano
4- 08	16	0,063		neg	F	0 a 1 ano
4- 10	16	0,079		neg	F	0 a 1 ano
4- 101	NEG	0,070		neg	F	> 3 anos
4- 104	NEG	0,076		neg	F	> 3 anos
4- 106	16	0,069		neg	F	> 3 anos
4- 12	NEG	0,065		neg	M	0 a 1 ano
4- 13	NEG	0,055		neg	F	0 a 1 ano
4- 14	256	0,270		pos	F	1 a 3 anos
4- 177	16	0,085		neg	F	> 3 anos
4- 23	NEG	0,083		neg	F	> 3 anos
4- 285	256	0,311		pos	F	> 3 anos
4- 289	NEG	0,077		neg	F	> 3 anos
4- 292	NEG	0,114		neg	F	> 3 anos
4- 298	16	0,087		neg	F	> 3 anos
4- 32	16	0,071		neg	F	> 3 anos
4- 37	NEG	0,086		neg	F	1 a 3 anos
4- 6	NEG	0,064		neg	M	0 a 1 ano
4- 96	256	0,245		pos	F	> 3 anos
4- BITO	16	0,073		neg	M	> 3 anos
4- BOB	NEG	0,072		neg	M	1 a 3 anos
4- S/N	16	0,084		neg		

aborto

**PROPRIEDADE 5 – São José dos Pinhais**

	RIFI	ELISA		sexo	idade	
5- 214	256	0,487	Cut off	pos	F	> 3 anos
5- 263	256	0,469	0,126	pos	F	> 3 anos
5- 27	64	0,289		pos	F	> 3 anos
5- 306	256	0,486		pos	F	> 3 anos
5- 324	1024	0,518		pos	F	> 3 anos
5- 325	256	0,489		pos	F	> 3 anos
5- 416	1024	0,522		pos	F	1 a 3 anos
5- 419	1024	0,629		pos	F	1 a 3 anos
5- 422	1024	0,669		pos	F	1 a 3 anos
5- 501	16	0,124		neg	F	1 a 3 anos
5- 504	256	0,574		pos	F	1 a 3 anos

5- 505	256	0,551	pos	F	1 a 3 anos
5- 506	NEG	0,109	neg	F	1 a 3 anos
5- 507	64	0,470	pos	F	1 a 3 anos
5- 510	256	0,506	pos	F	1 a 3 anos
5- 512	16	0,122	neg	F	1 a 3 anos
5- 515	64	0,386	pos	F	1 a 3 anos
5- 517	256	0,467	pos	F	1 a 3 anos
5- 518	NEG	0,123	neg	F	1 a 3 anos
5- 523	256	0,418	pos	F	1 a 3 anos

**PROPRIEDADE 6 – Balsa Nova**

	RIFI	ELISA		sexo	idade	
6- 01	256	0,308	Cut off	pos	M	> 3 anos
6- 01C	256	0,408	0,128	pos	M	> 3 anos
6- 02	256	0,289		pos	M	> 3 anos
6- 06	256	0,350		pos	M	> 3 anos
6- 08	256	0,306		pos	F	1 a 3 anos
6- 09	256	0,413		pos	F	1 a 3 anos
6- 10	256	0,332		pos	F	> 3 anos
6- 1000	256	0,409		pos	F	> 3 anos
6- 1003	256	0,291		pos	F	1 a 3 anos
6- 1007	256	0,399		pos	F	1 a 3 anos
6- 1008	256	0,428		pos	F	1 a 3 anos
6- 11	256	0,369		pos	F	0 a 1 ano
6- 13	64	0,381		pos	M	> 3 anos
6- 14	NEG	0,074		neg	M	> 3 anos
6- 1592	1024	0,366		pos	F	1 a 3 anos
6- 1596	256	0,312		pos	F	1 a 3 anos
6- 1597	NEG	0,082		neg	F	1 a 3 anos
6- 1598	NEG	0,080		neg	F	1 a 3 anos
6- 16	256	0,347		pos	F	1 a 3 anos
6- 1602	NEG	0,082		neg	F	1 a 3 anos
6- 1604	NEG	0,077		neg	M	1 a 3 anos
6- 1608	NEG	0,068		neg	M	1 a 3 anos
6- 1611	256	0,434		pos	M	1 a 3 anos
6- 1616	NEG	0,065		neg	M	1 a 3 anos
6- 1617	NEG	0,088		neg	M	1 a 3 anos
6- 1630	1024	0,528		pos	M	1 a 3 anos
6- 1639	16	0,083		neg	M	1 a 3 anos
6- 1640	1024	0,463		pos	M	1 a 3 anos
6- 1645	NEG	0,090		neg	M	1 a 3 anos
6- 1652	16	0,075		neg	M	1 a 3 anos
6- 20	256	0,369		pos	F	> 3 anos
6- 21	256	0,289		pos	F	1 a 3 anos
6- 25	NEG	0,080		neg	F	0 a 1 ano
6- 28	1024	0,421		pos	F	> 3 anos
6- 30	256	0,465		pos	F	> 3 anos
6- 3030	NEG	0,071		neg	M	0 a 1 ano
6- 3039	NEG	0,095		neg	M	0 a 1 ano
6- 3040	NEG	0,077		neg	M	0 a 1 ano
6- 3041	NEG	0,088		neg	M	0 a 1 ano

6- 3042	NEG	0,075	neg	M	0 a 1 ano
6- 3043	NEG	0,094	neg	M	0 a 1 ano
6- 3044	NEG	0,086	neg	M	0 a 1 ano
6- 3050	NEG	0,095	neg	M	0 a 1 ano
6- 3055	NEG	0,072	neg	M	0 a 1 ano
6- 3057	NEG	0,095	neg	M	0 a 1 ano
6- 3060	NEG	0,077	neg	F	0 a 1 ano
6- 3063	256	0,278	pos	M	0 a 1 ano
6- 3070	64	0,443	pos	M	0 a 1 ano
6- 3074	NEG	0,089	neg	M	0 a 1 ano
6- 3075	NEG	0,077	neg	M	0 a 1 ano
6- 3083	NEG	0,080	neg	M	0 a 1 ano
6- 3084#1	16	0,075	neg	F	0 a 1 ano
6- 3084#2	NEG	0,093	neg	F	0 a 1 ano
6- 31	256	0,524	pos	F	1 a 3 anos
6- 32	1024	0,591	pos	F	0 a 1 ano
6- 33	64	0,165	pos	F	> 3 anos
6- 34	1024	0,826	pos	F	0 a 1 ano
6- 36	1024	0,648	pos	F	0 a 1 ano
6- 37	1024	0,857	pos	F	0 a 1 ano
6- 40	64	0,423	pos	F	> 3 anos
6- 400	256	0,582	pos	F	> 3 anos
6- 41	64	0,321	pos	F	> 3 anos
6- 426	64	0,434	pos	F	> 3 anos
6- 429	1024	0,611	pos	F	0 a 1 ano
6- 46	4096	0,799	pos	F	> 3 anos
6- 460	16	0,128	neg	F	1 a 3 anos
6- 463	1024	0,712	pos	F	1 a 3 anos
6- 47	256	0,524	pos	F	> 3 anos
6- 56	256	0,591	pos	F	> 3 anos
6- 62	256	0,518	pos	F	1 a 3 anos
6- 64	64	0,352	pos	F	1 a 3 anos
6- 65	256	0,658	pos	F	> 3 anos
6- 82	256	0,539	pos	M	> 3 anos
6- 97	4096	0,707	pos	F	1 a 3 anos
6- s/n	4096	0,757	pos	M	0 a 1 ano

**PROPRIEDADE 7 – Rio Negro**

	RIFI	ELISA		sexo	idade	
7- 013	NEG	0,077	Cut off	neg	M	> 3 anos
7- 014	256	0,766	0,141	pos	M	> 3 anos
7- 019	NEG	0,165		pos	F	> 3 anos
7- 08	64	0,590		pos	F	> 3 anos
7- 1	16	0,075		neg	F	0 a 1 ano
7- 10	NEG	0,094		neg	F	0 a 1 ano
7- 11	64	0,156		pos	F	1 a 3 anos
7- 12	16	0,102		neg	F	1 a 3 anos
7- 13	64	0,546		pos	F	1 a 3 anos
7- 14	NEG	0,045		neg	M	0 a 1 ano
7- 15	NEG	0,047		neg	M	0 a 1 ano
7- 16	64	0,432		pos	F	> 3 anos

7- 17	1024	0,942	pos	F	> 3 anos
7- 18	16	0,106	neg	F	> 3 anos
7- 19	256	1,016	pos	F	> 3 anos
7- 2	64	0,501	pos	F	0 a 1 ano
7- 20	1024	0,878	pos	F	> 3 anos
7- 2030	256	0,614	pos	F	> 3 anos
7- 212	1024	0,923	pos	F	1 a 3 anos
7- 231	NEG	0,118	neg	F	> 3 anos
7- 287	16	0,137	neg	F	1 a 3 anos
7- 3	NEG	0,079	neg	F	0 a 1 ano
7- 36	NEG	0,121	neg	F	1 a 3 anos
7- 4	NEG	0,083	neg	F	0 a 1 ano
7- 40	16	0,118	neg	F	> 3 anos
7- 48	NEG	0,113	neg	F	> 3 anos
7- 5	NEG	0,078	neg	F	0 a 1 ano
7- 6	16	0,075	neg	F	0 a 1 ano
7- 660	NEG	0,128	neg	F	> 3 anos
7- 7	NEG	0,092	neg	F	0 a 1 ano
7- 7004	16	0,113	neg	F	1 a 3 anos
7- 7017	16	0,087	neg	F	1 a 3 anos
7- 750	NEG	0,113	neg	M	> 3 anos
7- 8	NEG	0,153	pos	F	0 a 1 ano
7- 9	64	0,150	pos	F	0 a 1 ano
7- 901	NEG	0,089	neg	F	> 3 anos

**PROPRIEDADE 8 – Piraquara**

	RIFI	ELISA		sexo	idade	
8- 03	16	0,113	Cut off	neg	F	0 a 1 ano
8- 06	NEG	0,121	0,173	neg	F	0 a 1 ano
8- 091	1024	0,841		pos	F	> 3 anos
8- 100	NEG	0,126		neg	F	> 3 anos
8- 102	NEG	0,106		neg	F	1 a 3 anos
8- 12	NEG	0,097		neg	F	0 a 1 ano
8- 187	64	0,147		neg	M	> 3 anos
8- 251	256	1,138		pos	F	> 3 anos
8- 252	16	0,222		pos	F	> 3 anos
8- 253	NEG	0,138		neg	F	1 a 3 anos
8- 254	NEG	0,129		neg	F	> 3 anos
8- 255	16	0,130		neg	F	1 a 3 anos
8- 257	NEG	0,113		neg	F	> 3 anos
8- 259	NEG	0,113		neg	F	> 3 anos
8- 26	NEG	0,124		neg	F	> 3 anos
8- 260	16	0,139		neg	F	> 3 anos
8- 261	1024	1,159		pos	F	1 a 3 anos
8- 262	1024	1,298		pos	F	1 a 3 anos
8- 27	NEG	0,129		neg	F	> 3 anos
8- 33	1024	1,010		pos	F	1 a 3 anos
8- 34	NEG	0,126		neg	F	1 a 3 anos
8- 35	16	0,140		neg	F	1 a 3 anos
8- Babi	256	0,966		pos	F	> 3 anos
8- Cle	16	0,149		neg	F	0 a 1 ano

8- Cris	256	0,935	pos	F	> 3 anos
8- Fer	64	0,534	pos	F	> 3 anos
8- Mel	NEG	0,142	neg	F	0 a 1 ano
8- s/brinco	16	0,163	neg	F	0 a 1 ano
8- Sa	16	0,135	neg	F	1 a 3 anos
8- So	NEG	0,140	neg	F	1 a 3 anos
8- vale 2	NEG	0,124	neg	F	1 a 3 anos

**PROPRIIDADE 9 – Pinhais**

	RIFI	ELISA		sexo	idade	
9- 036	NEG	0,127	Cut off	neg	F	1 a 3 anos
9- 06004	16	0,136	0,173	neg	F	> 3 anos
9- 06005	NEG	0,260		pos	F	> 3 anos
9- 06007	16	0,276		pos	F	> 3 anos
9- 06009	16	0,150		neg	F	> 3 anos
9- 06011	16	0,155		neg	F	> 3 anos
9- 06013	NEG	0,134		neg	F	> 3 anos
9- 06016	1024	1,097		pos	F	> 3 anos
9- 06020	16	0,289		pos	F	> 3 anos
9- 06021	NEG	0,205		pos	F	> 3 anos
9- 06022	16	0,315		pos	F	> 3 anos
9- 06024	16	0,154		neg	F	> 3 anos
9- 06025	64	0,276		pos	F	> 3 anos
9- 07014	64	0,179		pos	M	1 a 3 anos
9- 08006	16	0,152		neg	F	0 a 1 ano
9- 08008	16	0,138		neg	F	0 a 1 ano
9- 08011	16	0,161		neg	F	0 a 1 ano
9- 08012	16	0,188		pos	F	0 a 1 ano
9- 08018	16	0,132		neg	F	0 a 1 ano
9- 08020	16	0,156		neg	F	0 a 1 ano
9- 08023	16	0,128		neg	F	0 a 1 ano
9- 08024	16	0,131		neg	F	0 a 1 ano
9- 08028	16	0,150		neg	F	0 a 1 ano
9- 08030	16	0,148		neg	F	0 a 1 ano
9- 08033	16	0,133		neg	F	0 a 1 ano
9- 08037	16	0,138		neg	F	0 a 1 ano
9- 08041	16	0,141		neg	M	0 a 1 ano
9- 08043	NEG	0,119		neg	M	0 a 1 ano
9- 08045	16	0,146		neg	F	0 a 1 ano
9- 08046	16	0,167		neg	F	0 a 1 ano
9- 08047	NEG	0,137		neg	F	0 a 1 ano
9- 173	64	0,182		pos	F	> 3 anos
9- 177	16	0,206		pos	F	> 3 anos
9- Beto	16	0,144		neg	M	> 3 anos
9- E002	16	0,166		neg	F	1 a 3 anos

**PROPRIIDADE 10 – Campo Largo**

	RIFI	ELISA		sexo	idade	
10- 03	16	0,131	Cut off	neg	F	> 3 anos
10- 04	256	0,623	0,138	pos	F	> 3 anos
10- 05	16	0,308		pos	F	> 3 anos
10- 06	NEG	0,095		neg	F	> 3 anos

10- 06024	1024	1,233	pos	F	> 3 anos
10- 1003	256	1,108	pos	F	> 3 anos
10- 1004	NEG	0,096	neg	F	> 3 anos
10- 1010	1024	1,399	pos	F	> 3 anos
10- 1012	NEG	0,095	neg	F	> 3 anos
10- 1013	NEG	0,160	pos	F	> 3 anos
10- 1014	256	1,175	pos	F	> 3 anos
10- 1015	NEG	0,134	neg	F	1 a 3 anos
10- 1018	4096	1,560	pos	F	> 3 anos
10- 1020	1024	1,246	pos	F	> 3 anos
10- 1021	16	0,167	pos	F	> 3 anos
10- 1022	1024	1,290	pos	F	> 3 anos
10- 1024	NEG	0,082	neg	F	1 a 3 anos
10- 1026	256	0,664	pos	F	1 a 3 anos
10- 1027	1024	1,035	pos	F	> 3 anos
10- 1037	256	0,690	pos	F	> 3 anos
10- 16	NEG	0,114	neg	F	> 3 anos
10- 25	NEG	0,100	neg	F	1 a 3 anos
10- 26	16	0,121	neg	F	1 a 3 anos
10- 34	NEG	0,108	neg	F	1 a 3 anos
10- 36	NEG	0,103	neg	F	1 a 3 anos
10- 43	NEG	0,136	neg	F	1 a 3 anos
10- 49	NEG	0,091	neg	F	1 a 3 anos
10- 60	NEG	0,097	neg	M	0 a 1 ano
10- 73	NEG	0,082	neg	M	0 a 1 ano
10- bodão	NEG	0,093	neg	M	> 3 anos
10- s/n	NEG	0,123	neg	M	0 a 1 ano

**PROPRIEDADE 11 – Quitandinha**

	RIFI	ELISA		sexo	idade	
11- 104	256	0,581	Cut off	pos	F	> 3 anos
11- 107	64	0,373	0,141	pos	F	> 3 anos
11- 129	NEG	0,094		neg	M	0 a 1 ano
11- 135	NEG	0,138		neg	F	0 a 1 ano
11- 145	NEG	0,084		neg	M	0 a 1 ano
11- 147	16	0,095		neg	F	0 a 1 ano
11- 148	64	0,403		pos	F	0 a 1 ano
11- 151	NEG	0,089		neg	F	0 a 1 ano
11- 152	16	0,102		neg	F	0 a 1 ano
11- 153	NEG	0,110		neg	F	0 a 1 ano
11- 154	64	0,162		pos	F	0 a 1 ano
11- 155	64	0,177		pos	F	0 a 1 ano
11- 156	16	0,107		neg	M	0 a 1 ano
11- 157	NEG	0,088		neg	F	0 a 1 ano
11- 158	NEG	0,121		neg	M	0 a 1 ano
11- 159	NEG	0,099		neg	F	0 a 1 ano
11- 260	256	0,824		pos	F	> 3 anos
11- 275	256	0,706		pos	F	> 3 anos
11- 6005	1024	1,300		pos	F	1 a 3 anos
11- 6012	64	0,376		pos	F	1 a 3 anos
11- 7015	NEG	0,106		neg	M	> 3 anos

11- s/n	NEG	0,091	neg	F	1 a 3 anos
---------	-----	-------	-----	---	------------

**PROPRIEDADE 12 - Colombo**

	<b>RIFI</b>	<b>ELISA</b>		<b>sexo</b>	<b>idade</b>	
12- 0082	64	0,156	Cut off	pos	F	> 3 anos
12- 01	16	0,069	0,138	neg	M	0 a 1 ano
12- 02	NEG	0,067		neg	M	0 a 1 ano
12- 03	16	0,071		neg	M	0 a 1 ano
12- 04266	256	0,846		pos	F	> 3 anos
12- 06007	NEG	0,101		neg	F	> 3 anos
12- 07022	NEG	0,093		neg	F	1 a 3 anos
12- 07027	16	0,115		neg	M	1 a 3 anos
12- 07033	4096	1,125		pos	F	1 a 3 anos
12- 07034	16	0,102		neg	F	1 a 3 anos
12- 09039	64	0,139		pos	F	0 a 1 ano
12- 09040	NEG	0,088		neg	F	0 a 1 ano
12- 09041	NEG	0,089		neg	F	0 a 1 ano
12- 133	NEG	0,107		neg	F	0 a 1 ano
12- 15	256	0,782		pos	M	1 a 3 anos
12- 17	NEG	0,142		neg	F	> 3 anos
12- 3008	64	0,108		neg	M	> 3 anos
12- 350	NEG	0,096		neg	M	0 a 1 ano
12- 48	NEG	0,118		neg	F	> 3 anos
12- 50	16	0,101		neg	F	1 a 3 anos
12- A01	1024	1,031		pos	F	> 3 anos
12- A02	1024	1,254		pos	F	> 3 anos
12- A07	256	0,912		pos	F	> 3 anos
12- A10	4096	1,470		pos	F	> 3 anos
12- A11	1024	1,321		pos	F	> 3 anos
12- B25	256	0,754		pos	F	> 3 anos
12- B27	64	0,565		pos	F	> 3 anos
12- B28	256	0,617		pos	F	> 3 anos
12- B30	1024	1,072		pos	F	> 3 anos
12- B34	256	0,869		pos	F	> 3 anos
12- f1a	16	0,156		pos	F	0 a 1 ano
12- m1a	16	0,223		pos	M	0 a 1 ano

## ANEXO 8

## RESULTADOS DISCORDANTES ENTRE RIFI E ELISA

<b>Animal</b>	<b>RIFI</b>	<b>ELISA</b>		<b>sexo</b>	<b>idade</b>
3- 09	16	0,175	pos	F	> 3 anos
7- 019	NEG	0,165	pos	F	> 3 anos
7- 8	NEG	0,153	pos	F	0 a 1 ano
8- 187	64	0,147	neg	M	> 3 anos
8- 252	16	0,222	pos	F	> 3 anos
9- 06005	NEG	0,260	pos	F	> 3 anos
9- 06007	16	0,276	pos	F	> 3 anos
9- 06020	16	0,289	pos	F	> 3 anos
9- 06021	NEG	0,205	pos	F	> 3 anos
9- 06022	16	0,315	pos	F	> 3 anos
9- 08012	16	0,188	pos	F	0 a 1 ano
9- 177	16	0,206	pos	F	> 3 anos
10- 05	16	0,308	pos	F	> 3 anos
10- 1013	NEG	0,160	pos	F	> 3 anos
10- 1021	16	0,167	pos	F	> 3 anos
12- 3008	64	0,108	neg	M	> 3 anos
12- f1a	16	0,156	pos	F	0 a 1 ano
12- m1a	16	0,223	pos	M	0 a 1 ano

## ANEXO 9

## RESULTADOS POR PROPRIEDADE

**PROPRIEDADE 1**                    **Município:** Guaratuba    26 animais coletados  
**Localização:** rural            **Atividade principal:** pecuária  
**Rebanho caprino:** 113  
**Outros animais:** bovinos (40), eqüinos (7), caninos (6).  
**Felídeos:** não  
**Animais silvestres e pragas:** roedores  
**Acompanhamento por médico veterinário:** sim  
**Principais problemas sanitários:** verminoses, subnutrição  
**Abortos:** sim, no meio e no final da gestação, causa não identificada, e alguns natimortos.  
É feito o diagnóstico de gestação das fêmeas e já ocorreram casos de nascimento de crias com peso muito abaixo do normal.  
**Verminoses:** controle por exames coproparasitológico e Famacha. Mudam de medicamento quando necessário.  
**Vacinas aplicadas:** Sintoxan-T, salmonelose e pasteurelose.  
**Alimentação:** pasto, verde no cocho, concentrado feito na propriedade.  
**Sal:** mineral  
**Coccidiostático:** sim  
**Armazenamento dos alimentos:** local fechado, com acesso de roedores.  
**Água dos animais:** poço convencional e açude pluvial, armazenada em caixa d'água.  
**Manejo:** semi-intensivo (confinado a noite e solto durante o dia).  
**Instalações:** piso ripado e chão batido  
**Finalidade da criação:** carne    **Abate:** de 8 meses a 1 ano e meio, na propriedade

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG				5	4	9	
	1:16				7	5	12	
	1:64							
	1:256				1	2	3	
	1:1024				2		2	
	1:4096							
	<b>TOTAL</b>				15	11	26	
ELISA	Neg				12	9	21	
	Pos				3	2	5	
	<b>TOTAL</b>				15	11	26	

**PROPRIEDADE 2**                      **Município:** Contenda                      50 animais  
**Localização:** rural                      **Atividade principal:** pecuária  
**Rebanho caprino:** 142  
**Outros animais:** aves (20), caninos (3).  
**Felídeos:** não  
**Animais silvestres e pragas:** não  
**Acompanhamento por médico veterinário:** sim  
**Principais problemas sanitários:** verminoses, linfadenite caseosa  
**Abortos:** sim, trauma e overdose de medicamentos, ocorrência de natimortos.  
**Verminoses:** OPG e Famacha.  
**Vacinas:** linfadenite, clostridioses.  
**Alimentação:** pasto, verde no cocho, feno, concentrado feito na propriedade  
**Sal:** sal mineral  
**Coccidiostático:** não  
**Armazenamento dos alimentos:** fechado  
**Água dos animais:** poço convencional, armazenada em caixa d'água limpa regularmente  
**Manejo:** semi-intensivo  
**Instalações:** piso ripado  
**Finalidade da criação:** carne      **Abate:** 5 meses, na propriedade

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG					11	8	19
	1:16			1		11	9	21
	1:64					1	1	2
	1:256						2	2
	1:1024					3	3	6
	1:4096							
	<b>TOTAL</b>			1		26	23	50
ELISA	Neg			1		22	17	40
	Pos					4	6	10
	<b>TOTAL</b>			1		26	23	50

**PROPRIEDADE 3**                      **Município:** Campo Magro                      20 animais  
**Localização:** peri-urbana.  
**Rebanho caprino:** 32  
**Outros animais:** eqüinos (2), aves (30), caninos (11).  
**Felídeos:** não  
**Animais silvestres e pragas:** roedores e aves  
**Acompanhamento por médico veterinário:** sim  
**Principais problemas sanitários:** problemas de parto  
**Abortos:** não, ocorrência de natimortos.  
**Verminoses:** ivomec via intramuscular a cada 6 meses  
**Alimentação:** pasto, verde no cocho, concentrado comprado.  
**Sal:** sal comum e sal mineral  
**Coccidiostático:** não sabe

**Armazenamento dos alimentos:** fechado, com acesso de roedores.

**Água dos animais:** rede publica direto da rede.

**Manejo:** semi-intensivo

**Instalações:** piso ripado

**Finalidade da criação:** mista **Abate:** 6 meses, na propriedade

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG					2	3	5
	1:16		2			6	3	11
	1:64						2	2
	1:256						2	2
	1:1024							
	1:4096							
	TOTAL		2			8	10	20
ELISA	Neg		2			8	5	15
	Pos						5	5
	TOTAL		2			8	10	20

**PROPRIEDADE 4** **Município:** Fazenda Rio Grande **28 animais**

**Localização:** rural

**Rebanho caprino:** 99

**Outros animais:** ovinos (45), outras espécies não tem contato com caprinos.

**Felídeos:** não

**Animais silvestres e pragas:** animais silvestres (veados, pacas)

**Acompanhamento por médico veterinário:** sim

**Principais problemas sanitários:** verminose, coccidioses

**Abortos:** sim, no início da gestação, sem diagnóstico. Natimortos.

**Verminoses:** pelo método Famacha.

**Alimentação:** verde no cocho, silagem, feno e concentrado comprado.

**Sal:** sal mineral

**Coccidiostático:** não

**Armazenamento dos alimentos:** local fechado, com acesso de roedores

**Água dos animais:** poço convencional, armazenada em caixa d'água limpa regularmente

**Manejo:** intensivo

**Instalações:** piso ripado e chão batido + cama

**Finalidade da criação:** carne **Abate:** na propriedade, até 1 ano e animais de descarte

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG	2	2		1	2	8	15
	1:16	1		1	2		4	8
	1:64							
	1:256					1	3	4

	<b>1:1024</b>							
	<b>1:4096</b>							
	<b>TOTAL</b>	3	2	1	3	3	15	27
<b>ELISA</b>	<b>Neg</b>	3	2	1	3	2	12	23
	<b>Pos</b>					1	3	4
	<b>TOTAL</b>	3	2	1	3	3	15	27

**PROPRIEDADE 5**                      **Município:** São José dos Pinhais                      20 animais

**Localização:** peri-urbana

**Rebanho caprino:** 20

**Outros animais:** ovinos (103), eqüídeos (6), caninos (3).

**Felídeos:** não

**Animais silvestres e pragas:** roedores

**Acompanhamento por médico veterinário:** sim

**Principais problemas sanitários:** verminoses

**Abortos:** sim, e natimortos

**Verminoses:** Famacha

**Alimentação:** pasto, feno, concentrado feito na propriedade, pré-secado.

**Sal:** sal mineral

**Coccidiostático:** não

**Armazenamento dos alimentos:** local fechado, com acesso de roedores.

**Água dos animais:** rede pública, armazenada em caixa d'água limpa regularmente.

**Manejo:** semi-intensivo

**Instalações:** piso ripado

**Finalidade da criação:** carne                      **Abate:** na propriedade, 6 a 8 meses e descarte

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
<b>RIFI</b>	<b>NEG</b>					2		2
	<b>1:16</b>					2		2
	<b>1:64</b>					2	1	3
	<b>1:256</b>					5	4	9
	<b>1:1024</b>					3	1	4
	<b>1:4096</b>							
	<b>TOTAL</b>					14	6	20
<b>ELISA</b>	<b>Neg</b>					4		4
	<b>Pos</b>					10	6	16
	<b>TOTAL</b>					14	6	20

**PROPRIEDADE 6**                      **Município:** Balsa Nova                      75 animais

**Localização:** rural                      **Atividade principal:** pecuária

**Rebanho caprino:** 180

**Outros animais:** bovinos (112), ovinos (300), suínos (5), eqüídeos (4), caninos (10).

**Felídeos:** Foi relatado que algum tempo antes da coleta foram eliminados todos os gatos da propriedade, pois havia muitos e estavam causando problemas, como atacar crias recém nascidas e subir nos cochos dos animais.

**Animais silvestres e pragas:** roedores e aves

**Acompanhamento por médico veterinário:** sim

**Principais problemas sanitários:** podridão de casco

**Abortos:** sim, praticamente todas as fêmeas tratadas no cocho, por causa não identificada.

**Verminoses:** controle por OPG e Famacha

**Alimentação:** pasto, verde no cocho, concentrado feito na propriedade.

**Sal:** sal mineral

**Coccidiostático:** sim

**Armazenamento dos alimentos:** local fechado com acesso de roedores e gatos.

**Água dos animais:** poço, armazenada em caixa d'água

**Manejo:** semi-intensivo

**Instalações:** piso ripado e chão batido

**Finalidade da criação:** mista

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG	13	5	1	3	3		25
	1:16		2		1	1		4
	1:64	1		1		1	4	7
	1:256	1	1	5	1	10	8	26
	1:1024		2		5	2	1	10
	1:4096	1				1	1	3
	TOTAL	16	10	7	10	18	14	75
ELISA	Neg	13	7	1	4	4		29
	Pos	3	3	6	6	14	14	46
	TOTAL	16	10	7	10	18	14	75

**PROPRIEDADE 7**

**Município:** Rio Negro 36 animais

**Localização:** rural

**Atividade principal:** pecuária

**Rebanho caprino:** 100

**Outros animais:** ovinos (6), aves (10), caninos (5).

**Felídeos:** sim (9), alimentados com ração.

**Animais silvestres e pragas:** aves e pequenos mamíferos

**Acompanhamento por médico veterinário:** não

**Principais problemas sanitários:**

**Abortos:**

**Verminoses:** Famacha.

**Vacinas:** salmonelose, pasteurelose e clostridioses.

**Alimentação:** pasto, verde no cocho, silagem, feno, concentrado feito na propriedade.

**Sal:** sal mineral

**Coccidiostático:** sim

**Armazenamento dos alimentos:** local fechado

**Água dos animais:** poço convencional, armazenada em caixa d'água limpa regularmente

**Manejo:** semi-intensivo

**Instalações:** piso ripado, chão batido e cama

**Finalidade da criação:** mista

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG	2		2	6	1	5	16
	1:16				2	4	2	8
	1:64				2	2	2	6
	1:256			1			2	3
	1:1024					1	2	3
	1:4096							
	TOTAL	2		3	10	8	13	36
ELISA	Neg	2		2	7	5	6	22
	Pos			1	3	3	7	14
	TOTAL	2		3	10	8	13	36

**PROPRIEDADE 8**

**Município:** Piraquara

31 animais

**Localização:** rural

**Atividade principal:** pecuária

**Rebanho caprino:** 41

**Outros animais:** bovinos (2), ovinos (90), aves (50), caninos (4).

**Felídeos:** não

**Animais silvestres e pragas:** roedores, aves, pequenos mamíferos.

**Acompanhamento por médico veterinário:** sim

**Principais problemas sanitários:** verminoses

**Abortos:** não

**Verminoses:** controle por Famacha.

**Alimentação:** pasto, verde no cocho, concentrado comprado, rolão de milho.

**Sal:** sal mineral

**Coccidiostático:** sim

**Armazenamento dos alimentos:** local fechado

**Água dos animais:** rede pública, armazenada em caixa d'água

**Manejo:** semi-intensivo

**Instalações:** chão batido e cama

**Finalidade da criação:** carne **Abate:** na propriedade, aos 5 meses

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG				3	5	6	14
	1:16				3	3	2	8
	1:64			1			1	2
	1:256						3	3

	1:1024				3	1	4
	1:4096						
	<b>TOTAL</b>		1	6	11	13	31
<b>ELISA</b>	<b>Neg</b>		1	6	8	7	22
	<b>Pos</b>				3	6	9
	<b>TOTAL</b>		1	6	11	13	31

**PROPRIEDADE 9**      **Município:** Pinhais      35 animais

**Localização:** peri-urbana

**Rebanho caprino:** 50

**Outros animais:** ovinos (86), caninos (3)

**Felídeos:** não

**Animais silvestres e pragas:** roedores e aves

**Acompanhamento por médico veterinário:** sim

**Principais problemas sanitários:** verminoses

**Abortos:** não

**Verminoses:** OPG e Famacha.

**Vacinas:** clostridioses.

**Alimentação:** pasto, silagem, concentrado feito na propriedade.

**Sal:** sal mineral

**Coccidiostático:** sim

**Armazenamento dos alimentos:** local aberto com acesso de roedores e aves

**Água dos animais:** rede pública e poço convencional, armazenada em caixa d'água limpa regularmente.

**Manejo:** semi-intensivo

**Instalações:** piso ripado

**Finalidade da criação:** carne      **Abate:** 6 meses, 40 Kg

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
<b>RIFI</b>	<b>NEG</b>	1			1	1	3	6
	<b>1:16</b>	1		1	14	1	8	25
	<b>1:64</b>		1				2	3
	<b>1:256</b>							
	<b>1:1024</b>						1	1
	<b>1:4096</b>							
	<b>TOTAL</b>	2	1	1	15	2	14	35
<b>ELISA</b>	<b>Neg</b>	2		1	14	2	5	24
	<b>Pos</b>		1		1		9	11
	<b>TOTAL</b>	2	1	1	15	2	14	35

**PROPRIEDADE 10**      **Município:** Campo Largo      31 animais

**Localização:** peri-urbana      **Atividade principal:** pecuária

**Rebanho caprino:** 60

**Outros animais:** ovinos (60), suínos (2), eqüino (1), aves (50), caninos (5).

**Felídeos:** não

**Animais silvestres e pragas:** roedores e aves  
**Acompanhamento por médico veterinário:** sim  
**Principais problemas sanitários:** verminoses  
**Abortos:** sim, carência de selênio (doença do músculo branco).  
**Verminoses:** controle por Famacha.  
**Alimentação:** pasto, verde no cocho, silagem, concentrado feito na propriedade  
**Sal:** sal mineral  
**Coccidiostático:** apenas para filhotes  
**Armazenamento dos alimentos:** local aberto com acesso de roedores  
**Água dos animais:** poço convencional, armazenada em caixa d'água  
**Manejo:** semi-intensivo  
**Instalações:** piso ripado  
**Finalidade da criação:** carne    **Abate:** na propriedade

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG	3		1		7	5	16
	1:16					1	3	4
	1:64							
	1:256					1	4	5
	1:1024						5	5
	1:4096						1	1
	<b>TOTAL</b>	3		1		9	18	31
ELISA	Neg	3		1		8	5	17
	Pos					1	13	14
	<b>TOTAL</b>	3		1		9	18	31

**PROPRIEDADE 11**      **Município:** Quitandinha      22 animais  
**Localização:** peri-urbana      **Atividade principal:** pecuária  
**Rebanho caprino:** 22  
**Outros animais:** ovinos (20), eqüídeos (2), aves (50), caninos (3).  
**Felídeos:** não  
**Animais silvestres e pragas:** roedores, aves e pequenos mamíferos.  
**Acompanhamento por médico veterinário:** sim  
**Principais problemas sanitários:**  
**Abortos:** não  
**Verminoses:**  
**Alimentação:** pasto, verde no cocho, concentrado feito na propriedade.  
**Sal:** sal comum  
**Coccidiostático:** não  
**Armazenamento dos alimentos:** local aberto com acesso de roedores  
**Água dos animais:** poço convencional, armazenada em caixa d'água  
**Manejo:** semi-intensivo  
**Instalações:** piso ripado  
**Finalidade da criação:** mista

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG	3		1	5	1		10
	1:16	1			2			3
	1:64				3	1	1	5
	1:256						3	3
	1:1024					1		1
	1:4096							
	TOTAL	4		1	10	3	4	22
ELISA	Neg	4		1	7	1		13
	Pos				3	2	4	9
	TOTAL	4		1	10	3	4	22

**PROPRIEDADE 12** Município: Colombo 32 animais  
**Localização:** peri-urbana **Atividade principal:** pecuária  
**Rebanho caprino:** 60  
**Outros animais:** ovinos (60), eqüino (1), caninos (5).  
**Felídeos:** 1 macho adulto e 2 fêmeas adultas.  
**Animais silvestres e pragas:** roedores  
**Acompanhamento por médico veterinário:** sim  
**Principais problemas sanitários:** verminoses  
**Abortos:** sim, por intoxicação, natimortos.  
**Verminoses:** controle por Famacha.  
**Alimentação:** pasto, verde no cocho, feno, concentrado feito na propriedade.  
**Sal:** sal mineral  
**Coccidiostático:** sim  
**Armazenamento dos alimentos:** local aberto com acesso de gatos  
**Água dos animais:** rede publica e poço convencional, armazenada em caixa d'água.  
**Manejo:** semi-intensivo  
**Instalações:** piso ripado e chão batido  
**Finalidade da criação:** carne **Abate:** na propriedade

		Machos			Fêmeas			TOTAL
		0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	0 a 1 ano	1 a 3 anos	+ 3 anos	
RIFI	NEG	2			3	1	3	9
	1:16	3	1		1	2		7
	1:64			1	1		2	4
	1:256		1				5	6
	1:1024						4	4
	1:4096					1	1	2
	TOTAL	5	2	1	5	4	15	32
ELISA	Neg	4	1	1	3	3	3	15
	Pos	1	1		2	1	12	17
	TOTAL	5	2	1	5	4	15	32

## ANEXO 10

## CÁLCULO DO RISCO RELATIVO

EXPOSIÇÃO	ELISA reagente	ELISA não reagente	TOTAL	% positivos	
sim	a	b	t1		RR = (a/t1)/(c/t2)
não	c	d	t2		IC = RR exponencial (1±(1,96/raiz(qui-quadrado)))
<b>PRESENÇA DE GATOS</b>					
sim	77	66	143	53,8	
não	83	180	263	31,6	RR = 1,706209 $\chi^2 = 19,26968$ IC = 1,344097 - 2,165879
<b>TOTAL</b>	160	246	406		RR considerado. O IC Não passa pela unidade
<b>PRESENÇA DE ROEDORES</b>					
sim	132	160	292	42,2	
não	28	86	114	24,6	RR = 1,840509 $\chi^2 = 14,63354$ IC = 1,346457 - 2,515842
<b>TOTAL</b>	160	246	406		RR considerado. O IC Não passa pela unidade
<b>ACESSO DE GATOS AO ALIMENTO</b>					
sim	63	44	107	58,8	
não	97	202	299	32,4	RR = 1,814915 $\chi^2 = 23,06489$ IC = 1,423029 - 2,314722
<b>TOTAL</b>	160	246	406		RR considerado. O IC Não passa pela unidade
<b>ACESSO DE RATOS AO ALIMENTO</b>					
sim	110	147	257	42,8	
não	50	99	149	33,6	RR = 1,275486 $\chi^2 = 3,375655$ IC = 0,983881 - 1,653519
<b>TOTAL</b>	160	246	406		RR não considerado. O IC passa pela unidade
<b>ALIMENTAÇÃO DOS GATOS</b>					
caça	63	44	107	58,8	
ração	14	22	36	38,8	RR = 1,514019 $\chi^2 = 4,323548$ IC = 1,024085 - 2,238341
<b>TOTAL</b>	77	66	143		RR considerado. O IC Não passa pela unidade

<b>LOCALIZAÇÃO</b>	<b>ELISA +</b>	<b>ELISA -</b>	<b>TOTAL</b>	<b>% +</b>	
peri-urbana	72	88	160	45	
rural	88	158	246	35,8	RR = 1,257955 $\chi^2 = 3,46033$ IC = 0,987763 - 1,602054
<b>TOTAL</b>	160	246	406		RR não considerado. O IC passa pela unidade
<b>FONTE DE ÁGUA</b>					
poço convencional	97	145	242	40	
rede pública	30	41	71	42,2	RR = 0,948623
<b>TOTAL</b>	127	186	313		RR menor que a unidade
<b>INSTALAÇÃO</b>					
piso ripado	65	113	178	36,5	
chão batido	9	22	31	29	RR = 1,257803 $\chi^2 = 0,646695$ IC = 0,719165 - 2,199869
<b>TOTAL</b>	74	135	209		RR não considerado. O IC passa pela unidade
<b>TIPO DE MANEJO</b>					
semi-intensivo	156	222	378	41,2	
intensivo	4	24	28	14,2	RR = 2,888889 $\chi^2 = 7,949458$ IC = 1,381807 - 6,039686
<b>TOTAL</b>	160	246	406		RR considerado. O IC Não passa pela unidade
<b>FINALIDADE DA CRIAÇÃO</b>					
mista	74	79	153	48,3	
carne	86	167	253	33,9	RR = 1,422861 $\chi^2 = 8,249607$ IC = 1,118521 - 1,810008
<b>TOTAL</b>	160	246	406		RR considerado. O IC não passa pela unidade
<b>SAL MINERAL</b>					
sim	151	233	384	39,3	
não	9	13	22	40,9	RR = 0,961227
<b>TOTAL</b>	160	246	406		RR menor que a unidade
<b>COCCIDIOSTÁTICO</b>					
sim	116	150	266	43,6	
não	39	81	120	32,5	RR = 1,341816 $\chi^2 = 4,246765$ IC = 1,014481 - 1,77477
<b>TOTAL</b>	155	231	386		RR considerado. O IC Não passa pela unidade

## ANEXO 11

## RESULTADOS DO TESTE Z DE RESÍDUOS PADRONIZADOS POR SEXO E IDADE DOS ANIMAIS

## Sexo e idade

RIFI	IDADE		
	0 a 1 ano	1 a 3 anos	Mais de 3 anos
<b>machos positivos</b>	3	5	9
<b>fêmeas positivas</b>	32	12	8
<b>machos negativos</b>	12	42	75
<b>fêmeas negativas</b>	47	79	81
<b>Cálculo:</b>	Zres = (o-e)/raizE*raiz(freq. Marginal)		
	-0,55506	-0,41438	0,870749
	7,012543	-1,79218	-4,26768
	-4,53241	-0,44006	4,289813
	-0,24593	1,775751	-1,49153

O teste de resíduos padronizados em z indicou, proporcionalmente:

**Maior número de machos negativos em 0 a 1 ano (32)**

**Maior número de fêmeas positivas em >3 anos (75)**

**Menor número de fêmeas positivas em 0 a 1 ano (12)**

**Menor número de machos negativos > 3 anos (8)**

ELISA	IDADE		
	0 a 1 ano	1 a 3 anos	Mais de 3 anos
<b>machos positivos</b>	4	5	7
<b>fêmeas positivas</b>	31	12	10
<b>machos negativos</b>	15	42	87
<b>fêmeas negativas</b>	44	79	69
<b>Cálculo:</b>	Zres = (o-e)/raizE*raiz(freq. Marginal)		
	0,173064	-0,243192	0,085310
	6,525925	-1,883639	-3,764752
	-4,529799	-1,547749	5,348905
	-0,132702	2,850858	-2,618262

O teste de resíduos padronizados em z indicou, proporcionalmente:

**Maior número de machos negativos em 0 a 1 ano (31)**

**Maior número de fêmeas positivas em >3 anos (87)**

**Maior número de fêmeas negativas em 1 a 3 anos (79)**

**Menor número de fêmeas positivas em 0 a 1 ano (15)**

**Menor número de machos negativos > 3 anos (10)**

**Menor número de fêmeas negativas em >3 anos (69)**

**Sexo**

		Sexo	machos	fêmeas
<b>RIFI</b>	positivo		17	129
	negativo		52	207
<b>Teste de resíduos:</b>		Zres = (o-e)/raizE*raiz(freq. Marginal)		
			-2,167512	2,1675121
			2,1675121	-2,167512

O teste de resíduo indica:

**Maior proporção de fêmeas positivas e machos negativos**

		Sexo	machos	fêmeas
<b>ELISA</b>	positivo		16	144
	negativo		53	192
<b>Teste de resíduos:</b>		Zres = (o-e)/raizE*raiz(freq. Marginal)		
			-3,044074	3,0440735
			3,0440735	-3,044074

O teste de resíduo indica:

**Maior proporção de fêmeas positivas e machos negativos**

**Idade**

		Idade	0 a 1 ano	1 a 3 anos	> 3 anos
<b>RIFI</b>	positivo		15	47	84
	negativo		79	91	89
<b>Teste de resíduos</b>		Zres = (o-e)/raizE*raiz(freq. Marginal)			
			-4,629795	-0,600069	4,5262382
			4,6297948	0,600069	-4,526238

O teste de resíduo indica, proporcionalmente:

**Maior número de negativos em 0 a 1 ano (79)**

**Maior número de positivos em >3 anos (84)**

**Menor número de positivos em 0 a 1 ano (15)**

**Menor número de negativos em > 3 anos (89)**

		Idade	0 a 1 ano	1 a 3 anos	> 3 anos
<b>ELISA</b>	positivo		19	47	94
	negativo		75	91	79
<b>Teste de resíduos</b>		Zres = (o-e)/raizE*raiz(freq. Marginal)			
			-4,366487	-1,612414	5,2714851
			4,3664869	1,6124142	-5,271485

O teste de resíduo indica, proporcionalmente:

**Maior número de negativos em 0 a 1 ano (75)**

**Maior número de positivos em >3 anos (94)**

**Menor número de positivos em 0 a 1 ano (19)**

**Menor número de negativos em > 3 anos (79)**

## ANEXO 12

RESULTADOS DO TESTE Z DE RESÍDUOS PADRONIZADOS POR  
PROPRIEDADE

## RIFI

Propriedade	No. soros coletados	RIFI positivo	RIFI negativo	% RIFI positivo	Teste de resíduos padronizado em z: Zres = (o-e)/raizE*raiz(freq. Marginal)	
1	26	5	21	19,23	-1,837435665	1,837435665
2	50	10	40	20	-2,511510071	2,511510071
3	20	4	16	20	-1,52544399	1,52544399
4	28	4	24	14,29	-2,476941233	2,476941233
5	20	16	4	80	4,209095455	-4,209095455
6	75	46	29	61,33	5,071191258	-5,071191258
7	36	12	24	33,33	-0,344095527	0,344095527
8	31	9	22	29,03	-0,836411353	0,836411353
9	35	4	31	11,43	-3,163780323	3,163780323
10	31	11	20	35,49	-0,05755124	0,05755124
11	22	9	13	40,91	0,497330657	-0,497330657
12	32	16	16	50	1,724304488	-1,724304488

Considerando as proporções observadas nas propriedades, o teste de resíduos padronizados em z indicou que houve:

Maior número de casos positivos nas propriedades 5 e 6

Menor número de casos positivos nas propriedades 2, 4 e 9

## ELISA

Propriedade	No. soros coletados	ELISA positivo	ELISA negativo	% ELISA positivo	Teste de resíduos padronizado em z: Zres = (o-e)/raizE*raiz(freq. Marginal)	
1	26	5	21	19,23	-2,176389405	2,176389405
2	50	10	40	20	-2,999312328	2,999312328
3	20	5	15	25	-1,352423422	1,352423422
4	28	4	24	14,29	-2,81947832	2,81947832
5	20	16	4	80	3,809903931	-3,809903931
6	75	46	29	61,33	4,303354972	-4,303354972
7	36	14	22	38,89	-0,066880106	0,066880106
8	31	9	22	29,03	-1,230218258	1,230218258
9	35	11	24	31,43	-1,010712297	1,010712297
10	31	14	17	45,16	0,681989294	-0,681989294
11	22	9	13	40,91	0,148068718	-0,148068718
12	32	17	15	53,13	1,654368992	-1,654368992

Considerando as proporções observadas nas propriedades, o teste de resíduos padronizados em z indicou que houve:

Maior número de casos positivos nas propriedades 5 e 6

Menor número de casos positivos nas propriedades 1, 2 e 4