

DANIELA PEDRASSANI

**PREVALÊNCIA DE TÍTULO DE ANTICORPOS  
IMUNOGLOBULINAS G ANTI-*Toxoplasma gondii*  
NICOLLE&MANCEAUX, 1909 EM CÃES**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

2001



## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **DANIELA PEDRASSANI** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“Prevalência de Título de Anticorpos Anti-Toxoplasma gondii (Nicolle&Manceaux, 1909) em cães”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito **“A”** concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 20 de dezembro de 2000.

Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL  
Presidente/Orientador

Prof. Dr. WALDIR HAMANN  
Membro

Profa. Dra. ROSANGELA MARIA DE AZEVEDO BASSI  
Membro

**Dedico este trabalho com todo carinho**

**Ao Flavio Rech Filho**

**Pelo amor, compreensão e apoio durante  
este período em que muitas vezes estive  
ausente.**

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, sempre presente. Por permitir conhecer e conviver com pessoas especiais.
- Aos meus pais, que sempre me incentivaram a prosseguir nesta jornada.
- Aos meus irmãos todo o amor, carinho e compreensão.
- A CAPES e a Universidade do Contestado/Canoinhas pelo auxílio financeiro.
- À Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol pela orientação, paciência e ensinamentos. O seu conhecimento e sua vontade de ensinar motivaram-me em todos os momentos difíceis. O seu profissionalismo serviu-me sempre de exemplo.
- Aos professores Doutores Odilon Vidotto e Italmir Teodorico Navarro, por terem cedido a cepa Rh padrão de *Toxoplasma gondii* e os soros controles positivos e negativos.
- Ao FIOCRUZ/Biomanguinhos, que gentilmente nos cederam o conjugado para a prova de Imunofluorescência Indireta.
- A Fundação Ezequiel Diaz, na pessoa do Professor Carlos Chavéz Olortégui, que gentilmente nos cedeu o conjugado para a prova de ELISA indireta.
- Ao Setor de Ciências Biológicas e ao laboratório Marcos Enrietti, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná, por permitirem a utilização de seus microscópios com fonte de luz ultravioleta, para a leitura das lâminas de Imunofluorescência Indireta.
- Às professoras, Doutora Edilene Alcântara de Castro e Rosângela Clara Paulino pelo auxílio e pela amizade.
- Ao pesquisador do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, João Carlos Minozzo pelas valiosas orientações e sugestões.
- Às laboratoristas Juliana Tracz e Luciane Mara Hennig por toda a ajuda e pelo ótimo ambiente de trabalho.

- Ao amigo Aldo Galloti Silveira Sobrinho pelo auxílio nas coletas de sangue e pelas agradáveis tardes de sábados e domingos durante o período das coletas.
- À professora Ida Cristina Gubert pela oportunidade de usar seu laboratório, equipamentos e reagentes.
- Às alunas do Curso de Ciências Biológicas, Maria Elisa M. Vieira e Simone Massuquetto por dividirem comigo o árduo trabalho de manutenção do cultivo de *Toxoplasma gondii*.
- Às colegas de mestrado Fernanda Rosalinski Moraes e Patrícia Pimenta Sillos pelas longas conversas, pela amizade e apoio em todos os momentos.
- Aos proprietários dos cães e aos cães que contribuíram para a realização deste trabalho.
- A todos os camundongos que contribuíram com suas vidas para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.
- Ao biotério do Setor de Ciências Biológicas, pela doação dos camundongos.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2.REVISÃO: <i>Toxoplasma gondii</i> e Toxoplasmose.....</b>	<b>07</b>
2.1.POSIÇÃO TAXONÔMICA.....	08
2.2.MORFOLOGIA.....	08
2.2.1.Oocisto.....	08
2.2.2.Estádios Intestinais.....	09
2.2.3.Estádios Extra Intestinais.....	10
2.3.O <i>Toxoplasma gondii</i> NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO.....	12
2.4.CICLO BIOLÓGICO.....	13
2.5.MECANISMOS DE CONTAMINAÇÃO E TRANSMISSÃO.....	15
2.6.PATOGENIA.....	16
2.6.1.Patogenia do <i>Toxoplasma gondii</i> no hospedeiro definitivo.....	16
2.6.2.Patogenia do <i>Toxoplasma gondii</i> no hospedeiro intermediário.....	17
2.6.3.Toxoplasmose no Homem.....	17
2.6.3.1.Formas Clínicas de Toxoplasmose no Homem.....	18
2.6.4.Toxoplasmose em Cães.....	21
2.7.CONTROLE.....	23
2.8.TRATAMENTO.....	24
2.9.DIAGNÓSTICO.....	25
2.9.1.Diagnóstico Clínico.....	25
2.9.2.Diagnóstico Parasitológico.....	25
2.9.2.1.Visualização do Parasita.....	25
2.9.2.2.Isolamento do Parasita.....	26
2.9.2.3.Reação em Cadeia da Polimerase.....	26
2.9.3.Diagnóstico Imunológico.....	26
2.9.3.1.Método de Sabin e Feldman ou Teste do Corante.....	27
2.9.3.2.Método de Fixação de Complemento.....	27
2.9.3.3.Método de Hemaglutinação Indireta.....	27
2.9.3.4.Método de Imunofluorescência Indireta.....	28
2.9.3.5.Método de Enzimaimunoensaio.....	28
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1.POPULAÇÕES DE CÃES ESTUDADAS.....	31
3.1.1.População de cães usada para a Padronização do Método de Enzimaimunoensaio.....	31
3.1.2.Populações de cães usadas para a determinação da soroprevalência de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	32
3.1.2.1.População de cães de Canoinhas, Santa Catarina.....	32
3.1.2.2.Município de Canoinhas.....	32

3.1.2.3. População de cães de Curitiba, Paraná.....	33
3.1.2.4. Município de Curitiba.....	33
3.2. PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS PARA OS MÉTODOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO.	34
3.2.1. Cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	34
3.2.2. Manutenção da cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	35
3.2.3. Produção de antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i> para o Método de Imunofluorescência Indireta.....	35
3.2.4. Produção do antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i> para o Método de Enzimaimunoensaio Indireto .....	36
3.3. MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	37
3.4. MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	39
3.4.1. Etapas realizadas para a padronização do Método de Enzimaimunoensaio Indireto.....	39
3.5. MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G ANTI- <i>Leishmania</i> spp.....	44
3.6. MÉTODO EPIDEMIOLÓGICO E ESTATÍSTICO.....	45
3.6.1. Indicadores Epidemiológicos observados para a Padronização do Método de Enzimaimunoensaio.....	47
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
4.1. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA ...	51
4.1.1. Padronização do antígeno .....	51
4.1.2. Padronização da diluição do conjugado.....	51
4.1.3. Reatividade do soro para ser considerado positivo.....	51
4.2. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO.....	52
4.2.1. Padronização do antígeno.....	52
4.2.1.1. Dosagem proteica do antígeno.....	52
4.2.2. Padronização da diluição de conjugado .....	55
4.2.3. Padronização da diluição dos soros.....	57
4.2.4. Estabelecimento do <i>Cut-off</i> ou ponto de corte entre soro reagente e não reagente.....	58
4.2.5. Indicadores epidemiológicos obtidos com a padronização do método de enzimaimunoensaio.....	59
4.2.6. Prevalência de anticorpos anti – <i>Toxoplasma gondii</i> em soros de cães de Canoinhas, SC.....	61
4.2.7. Estimativa da Prevalência de Toxoplasmose em cães de Canoinhas, SC.....	62
4.2.8. Resultados do método de Imunofluorescência Indireta para detecção de imunoglobulina G anti- <i>Leishmania</i> spp.....	66
4.2.9. Prevalência de anticorpos IgG anti – <i>Toxoplasma gondii</i> no soro de cães de Curitiba, PR .....	67
4.2.10. Estimativa da Prevalência de Toxoplasmose em cães de Curitiba, PR .....	70
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA	1	- MATRIZ PARA CÁLCULO DE INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS.....	48
TABELA	2	- DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>Toxoplasma gondii</i> . CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	53
TABELA	3	- VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS 32 SOROS DE CÃES NÃO REAGENTES AO ANTÍGENO DE <i>Toxoplasma gondii</i> QUE FORAM USADOS PARA O ESTABELECIMENTO DO CUT-OFF OU PONTO DE CORTE. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	59
TABELA	4	- COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A ANÁLISE DE 389 SOROS DE CÃES PROVENIENTES DE CANOINHAS, SC E CURITIBA, PR; AVALIADOS PELOS MÉTODOS DE IFI (PROVA REFERÊNCIA) E ELISA INDIRETO NAS DILUIÇÕES DE 1/40 E 1/400 RESPECTIVAMENTE, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> . CURITIBA, PARANÁ, 2001....	60
TABELA	5	- DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS,SC, REAGENTES NO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI), PARA PESQUISA DE IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> DE ACORDO COM O TÍTULO REAGENTE FINAL. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	62
TABELA	6	- ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES DE CANOINHAS SEGUNDO O SEXO, QUANDO ANALISADOS PELO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> . CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	63
TABELA	7	- DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES DE CANOINHAS REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> , SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	64
TABELA	8	- DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES DE CANOINHAS REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> , DE ACORDO COM A RAÇA. CURITIBA,PARANÁ, 2001.....	65
TABELA	9	- DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE SOROS DE CÃES DE CURITIBA,PR, REAGENTES NO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI), PARA PESQUISA DE IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> DE ACORDO COM O TÍTULO REAGENTE FINAL. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	67
TABELA	10	- DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES DE CURITIBA REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> , SEGUNDO O SEXO. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	69



TABELA	11 - DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES DE CURITIBA REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI - <i>Toxoplasma gondii</i> , SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	70
TABELA	12 - PREVALÊNCIAS DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> EM CÃES REGISTRADAS EM DIVERSOS INQUÉRITOS SOROLÓGICOS NO BRASIL NO PERÍODO DE 1958 À 2001. CURITIBA, PARANÁ 2001.....	83

## LISTA DE GRAFICOS

GRÁFICO	1	- FLUXOGRAMA DAS ETAPAS SEGUIDAS PARA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	38
GRÁFICO	2	- FLUXOGRAMA DAS ETAPAS SEGUIDAS PARA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO.....	40
GRÁFICO	3	- CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY <i>et al.</i> , 1951. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	53
GRÁFICO	4	- VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR POCINHO, COM CONJUGADO DILUÍDO 1:1000 E SORO DILUÍDO 1:400. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	54
GRÁFICO	5	- VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR POCINHO, COM CONJUGADO DILUÍDO 1:1000 E SORO DILUÍDO 1:400. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	55
GRÁFICO	6	- VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR POCINHO, COM CONJUGADO DILUÍDO 1:2000 E SORO DILUÍDO 1:400. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	56
GRÁFICO	7	- VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR POCINHO, COM CONJUGADO DILUÍDO 1:3000 E SORO DILUÍDO 1:400. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	57
GRÁFICO	8	- VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DO SORO, COM 450ng DE ANTÍGENO POR POCINHO E CONJUGADO DILUÍDO 1:1000. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	58
GRÁFICO	9	- PERCENTUAL DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS, SC, REAGENTES E NÃO REAGENTES NOS MÉTODOS DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI - <i>Toxoplasma gondii</i> . CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	61

GRÁFICO	10	-	NÚMERO DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS REAGENTES NO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IgG) PARA O ANTÍGENO DE <i>Toxoplasma gondii</i> CONSIDERANDO OS TÍTULOS DOS SOROS. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	63
GRÁFICO	11	-	PERCENTUAL DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS REAGENTES AO ANTÍGENO DE <i>Toxoplasma gondii</i> NO MÉTODO DE ELISA INDIRETO (IgG), DE ACORDO COM O SEXO. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	64
GRÁFICO	12	-	SOROPREVALÊNCIA DOS CÃES DE CANOINHAS NA PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> , SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA. CURITIBA, PARANÁ, 2001 .....	65
GRÁFICO	13	-	PERCENTUAL DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS REAGENTES AO ANTÍGENO DE <i>Toxoplasma gondii</i> NO MÉTODO DE ELISA INDIRETO (IgG), DE ACORDO COM A RAÇA. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	66
GRÁFICO	14	-	NÚMERO DE SOROS DE CÃES DE CURITIBA REAGENTES, NO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IgG), PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI - <i>Toxoplasma gondii</i> , CONSIDERANDO OS TÍTULOS FINAIS DOS SOROS. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	68
GRÁFICO	15	-	PERCENTUAL DE SOROS DE CÃES DE CURITIBA, PR, REAGENTES E NÃO REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> . CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	69
GRÁFICO	16	-	PERCENTUAL DE CÃES DE CURITIBA SOROREAGENTES AO ANTÍGENO DE <i>Toxoplasma gondii</i> NO MÉTODO DE ELISA INDIRETO (IgG), DE ACORDO COM O SEXO. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	70
GRÁFICO	17	-	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IgG ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> NO SORO DE CÃES DE CURITIBA, NO MÉTODO DE ELISA INDIRETO, DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA. CURITIBA, PARANÁ, 2001.....	71

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	1	- OOCISTOS DE <i>Toxoplasma gondii</i> .....	09
FIGURA	2	- CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DE GATO EVIDENCIANDO UM ESQUIZONTE .....	09
FIGURA	3	- CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DE GATO EVIDENCIANDO UM GAMONTE .....	10
FIGURA	4	- TAQUIZOÍTOS DE <i>Toxoplasma gondii</i> .....	11
FIGURA	5	- CORTES HISTOLÓGICOS EVIDENCIANDO CISTOS TISSULARES COM BRADIZOÍTOS .....	12
FIGURA	6	- CICLO EVOLUTIVO DO <i>Toxoplasma gondii</i> .....	14
FIGURA	7	- ROTAS DE TRANSMISSÃO DO <i>Toxoplasma gondii</i> .....	16
FIGURA	8	- MAPA DO MUNICÍPIO DE CANOINHAS, SANTA CATARINA COM DELIMITAÇÃO DOS BAIRROS.....	33
FIGURA	9	- MAPA DO MUNICÍPIO DE CURITIBA, PARANÁ COM DELIMITAÇÃO DOS 75 BAIRROS.....	34
FIGURA	10	- LÍQUIDO COM TAQUZOÍTOS, OBTIDO DO LAVADO INTRAPERITONEAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>Toxoplasma gondii</i> .....	36
FIGURA	11	- PLACA DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO.....	44
FIGURA	12	- IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE.....	52
FIGURA	13	- IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CANINA.....	66

## LISTA DE QUADROS

QUADRO	1	- INTERPRETAÇÃO DO VALOR DE KAPPA.....	49
--------	---	--	----

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

° C	⇒ Grau Centígrado
Km <sup>2</sup>	⇒ Quilômetro quadrado
°	⇒ Grau
'	⇒ Minuto
”	⇒ Segundo
mL	⇒ Mililitro
g	⇒ Giro
pH	⇒ Potencial hidrogeniônico
KHZ	⇒ Quilohertz
MA	⇒ Miliampère
µm	⇒ Micrômetro
µg	⇒ Micrograma
µL	⇒ Microlitro
nm	⇒ Nanômetro
ng	⇒ Nanograma
χ <sup>2</sup>	⇒ Qui-quadrado
n	⇒ Número
®	⇒ Marca registrada
r	⇒ Correlação
CAPES	⇒ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
UNC	⇒ Universidade do Contestado
IFI	⇒ Imunofluorescência Indireta
SC	⇒ Santa Catarina
PR	⇒ Paraná
AIDS	⇒ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
DNA	⇒ Ácido desoxiribonucléico
PCR	⇒ Reação em Cadeia da Polimerase
IHA	⇒ Método de Hemaglutinação Indireta
ELISA	⇒ Método de Enzimaímunoensaio
IDS	⇒ Índice de Desenvolvimento dos Municípios
PBS	⇒ Tampão fosfato
OPD	⇒ Ortofenilenodiamino
UFPR	⇒ Universidade Federal do Paraná
K	⇒ Kappa
S	⇒ Sensibilidade
E	⇒ Especificidade
VPP	⇒ Valor Preditivo Positivo
VPN	⇒ Valor Preditivo Negativo
SF	⇒ Reação de Sabin-Feldman
IFI	⇒ Imunofluorescência indireta
IgG	⇒ Imunoglobulina G
IgM	⇒ Imunoglobulina M
SRD	⇒ Sem raça definida

## RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (NICOLLE&MANCEAUX, 1909) que afeta muitas espécies de animais domésticos, inclusive os cães. Nesta espécie, a sorologia tem sido o método de escolha para o diagnóstico clínico e epidemiológico. Por este motivo, foi padronizado um método de Enzimaimunoensaio indireto (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em cães e comparado seus resultados com o método de Imunofluorescência Indireta (IFI). A padronização do ELISA indireto foi obtida com concentração de 450 ng de antígeno por pocinho, soro e conjugado diluídos 400 e 1000 vezes respectivamente e ponto de corte de 0,115 nm. Para a padronização foram analisadas 389 amostras de soros de cães. O ELISA padronizado apresentou, na pesquisa de IgG em comparação com a IFI, 96,85% de copositividade, 90,43% de conegatividade e um índice de classificação correta de 93% e índice de classificação incorreta de 6,94%. O Valor Preditivo Positivo do teste foi de 87,5% e o Valor Preditivo Negativo foi de 97,65%. A correlação (r) entre os métodos foi de 0,86 e o indicador Kappa (K) foi de 0,87. Dos soros, usados na padronização, 158 foram analisados pelo método de IFI com antígeno de *Leishmania* spp. não foram observadas reações cruzadas com este protozoário. Após a padronização, foi determinada a soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em duas populações de cães, uma de 158 cães de Canoinhas, SC e outra de 513 cães de Curitiba, PR. Nas amostras de soro de cães de Canoinhas, SC, 49,36% foram reagentes pelo método de IFI e 50% pelo método de ELISA. Os títulos da reação de IFI foram considerados positivos em diluição igual ou superior a 1/40. Os títulos de 1/40 e 1/80 dos soros foram os mais freqüentes e a maior diluição na qual foi obtido resultado positivo foi a de 1/1280. A soropositividade aumentou com a idade dos animais, sendo maior naqueles cães acima de um ano de idade ( $\chi^2= 9,55^*$ ,  $p= 0,023$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as proporções de reagentes, quando considerados o sexo e a raça dos animais. Nas amostras de soros dos cães de Curitiba, PR, a presença de anticorpos anti – *T. gondii* foi detectada em 46,8% destas através do método de ELISA padronizado neste trabalho. Pela análise dos resultados do ELISA, a soropositividade foi maior nos animais adultos ( $\chi^2= 5,51^*$ ,  $p= 0,023$ ). Com relação ao sexo não foram observadas diferenças significativas na ocorrência de soropositivos. Os resultados demonstraram que os dois métodos são equivalentes. Pode-se concluir que o ELISA – IgG padronizado deve ser indicado para processos de triagem sorológica e em estudos soropidemiológicos, sendo a IFI indicada principalmente como método de diagnóstico individual em cães que manifestem sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose.

**PALAVRAS CHAVE:** Imunofluorescência Indireta, ELISA, *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose, cães.

## ABSTRACT

The toxoplasmosis is a world widespread zoonosis, caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* (NICOLLE&MANCEUX, 1909) which affects many species of animals, including dogs. In this specie, the sorology has been the chosen method for the clinic and epidemiologic diagnosis. For this reason, a method of indirect immunoenzymatic assay (ELISA) has been standardized for the detection of anti-*T. gondii* antibodies in dogs and their results compared with the method of indirect immunofluorescence test (IFI). The standardization of indirect ELISA was obtained with the antigen concentration of 450 ng by well, serum and conjugated diluted 400 and 1000 times respectively and cut-off 0,115 nm. For the standardization 389 serum samples were analysed. The standized ELISA showed, in the IgG research comparing with IFI, 96,85% of copositivity, 90,43% of conegativity and a level of acurate classification of 93% and a level of inaccurate classification of 6,94%. The Positive Predictive Value of the test was of 87,5% and the Negative Predictive Value was of 97,65%. The correlation (r) between the methods was of 0,86 and the Kappa indicator (K) was of 0,87. From the serum samples used in the standardization, 158 were analized by the IFI method with antigen of *Leishmania* spp. and crossed reaction were not observed with this protozoan. After standardization, the serum prevalence of antibodies anti-*T. gondii* were determined in two populations of dogs, one of 158 dogs from Canoinhas, SC; and another with 513 dogs from Curitiba, PR. In the serum samples of the dogs from Canoinhas, SC; 49,36% were reacted by IFI and 50% by the ELISA. The titles of IFI reaction were considered positive in dilution equal or superior 1/40. The titles 1/40 and 1/80 from the serum were the most frequent and the major dilution in which positive result was obtained was the 1/1280. The serum positivity increase with the age of the animals, being higher in those dogs above one year old ( $\chi^2= 9,55^*$ ,  $p=0,023$ ). Statistically significant differences were not observed between the proportion of the reactings, when considered the sex and breed of animals. In the serum samples of the dogs from Curitiba, PR, the presence of anti-*T. gondii* antibodies was detected in 46,8% through the ELISA standardized in this work. By the analysis of ELISA results, the serum positivity was higher in adult animals ( $\chi^2= 5,51^*$ ,  $p=0,023$ ). In relation to the sex significant differences were not observed in the occurrence of serum positivity. The results demonstrated that the two methods are equivalent. A conclusion can be made that the ELISA-IgG standardized must be indicated for the processes of sorologic tracking and in epidemic surveys, being the IFI indicated mainly as a method of individual analysis in dogs which show suggestive clinic signals of toxoplasmosis.

**KEY WORDS:** Indirect Immunofluorescence test, ELISA, *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, dogs.

# **1. INTRODUÇÃO**



O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, parasita intestinal de felinos e com grande gama de hospedeiros intermediários. Ele parasita provavelmente todas as espécies de sangue quente, como as aves, os mamíferos e o homem conferindo, desta forma, potencial zoonótico (DUBEY & BEATTIE, 1988; REY, 1991; CORRÊA & CORRÊA, 1992; CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

Segundo AMATO *et al.* (1982) e FRENKEL (1997) a importância da toxoplasmose, em termos de saúde pública reside no fato de esta zoonose representar uma causa importante de alterações neonatais como: lesões oculares, microcefalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais, alterações psicomotoras e retardo mental. Portanto, a infecção primária na gestante e conseqüentemente a infecção no feto, por via transplacentária, são os aspectos mais graves da toxoplasmose humana.

O nome toxoplasma (*Toxon* = arco, *plasma* = forma) é derivado da forma em crescente dos taquizoítos, na fase multiplicativa do parasita no interior de macrófagos (REY, 1991). O parasita foi descrito independentemente por SPLENDORE (1908) no Brasil em coelho de laboratório (os microorganismos provocavam a morte destes coelhos no laboratório do pesquisador) e por NICOLLE e MANCEAUX (1909) em um roedor, *Ctenodactylus gundi*, no Instituto Pasteur da Tunísia (REY, 1991; CORRÊA & CORRÊA, 1992). A descoberta quase que concomitante do parasita, denominado de *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) em dois continentes e em duas espécies animais diferentes, fazia antever, de certa forma, a ampla distribuição geográfica e o amplo espectro de hospedeiros do novo protozoário descrito (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

A primeira afecção humana, por este parasita, foi descrita por JANKU em 1923. O autor relata o caso de uma criança falecida em Praga, com 11 meses de idade, que apresentou hidrocefalia, cegueira e em cortes diretos de globo ocular ficaram evidenciados parasitas semelhantes ao *T. gondii*. Segundo o autor, tratava-se de infecção congênita. WOLF e COWEN (1938) foram os primeiros autores a confirmar a infecção congênita no homem, relatando a ocorrência de toxoplasmose fatal em um recém-nascido com encefalite, meningite e mielite.

O ciclo de vida do *T. gondii* foi completamente elucidado apenas no ano de 1970, pela descoberta dos estádios sexuais do parasita no intestino delgado de

felinos (DUBEY & BEATTIE, 1988). Hoje, 30 anos após esta descoberta ainda existem muitas dúvidas quanto a existência de uma única espécie do parasita e quanto as rotas de transmissão epidemiologicamente importantes. Durante a primeira metade deste século, diversas espécies de *T. gondii* foram nomeadas, principalmente de acordo com a espécie de hospedeiro na qual o parasita era detectado. Em 1930, comparações biológicas e imunológicas demonstraram que os vários isolados de animais e do homem, tratavam-se do mesmo protozoário (TENTER, HECKEROTH, WEISS; 2000). Diversos autores, tem confirmado através de técnicas de biologia molecular e de estudos de morfologia, que embora existam diferenças com relação a patogenia e ao quadro clínico nos casos de infecção pelo *T. gondii*, trata-se de uma única espécie. Embora exista apenas uma espécie, dentro desta, encontram-se cepas que tem comportamentos diferenciados. MITSUKA *et al.* (1998) demonstraram que soros diferentes reconhecem várias cepas de *T. gondii*. Estes dados reforçam a existência de antígenos comuns entre as diferentes cepas isoladas quer seja de animais, quer seja do homem. Amostras de *T. gondii*, isoladas de diferentes espécies animais, apesar de morfologicamente indistintas, exibem considerável variação na virulência e patogenicidade para animais de laboratório. Estudos moleculares epidemiológicos tem evidenciado que existem, ao menos, duas linhagens de *T. gondii*. Uma compreendendo cepas que são virulentas em camundongos, outra compreendendo cepas avirulentas em camundongos (TENTER, HECKEROTH, WEISS; 2000). MITSUKA *et al.* (1998) analisando oito cepas de *T. gondii*, isoladas de diferentes espécies animais, verificaram pela técnica de *Western blot* que, embora os isolados possuam variações antigênicas, estes também compartilham vários antígenos. Dentre as bandas reconhecidas pelos oito isolados, três foram comuns a todos: a banda p33 (33-37 kDa), a p54 (52-55 kDa) e a p66 (66 kDa).

O primeiro caso de toxoplasmose canina foi reportado por MELLO em 1910 na Itália. No Brasil o primeiro relato foi feito por CARINI em 1911. Casos de toxoplasmose canina tem sido reportados desde então em diversos países, sugerindo uma significativa disseminação no meio ambiente (DUBEY, 1987; VIDOTTO, 1992; DOMINGUES *et al.*, 1998). Mais recentemente FRENKEL *et al.* (1995) demonstraram que os cães constituem um importante meio de transmissão

mecânica de *T. gondii*, pelos seus hábitos de ingerir e rolar em fezes de gatos. Os cães são considerados animais de alta receptividade para o *T. gondii*, devido ao hábito de alimentação que facilita a ingestão de tecidos contaminados com cistos e o contato com o solo, possivelmente contaminado com oocistos esporulados (GERMANO *et al.*, 1985). Embora seja alta a prevalência da infecção em cães, os sinais clínicos são pouco frequentes e muitas vezes passam despercebidos. A doença é geralmente mais grave em animais jovens e idosos. Todavia, é comum a associação de outros agentes infecciosos, como os da cinomose e hepatite viral canina, uma vez que o *T. gondii* tem caráter oportunista (DUBEY, 1985).

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose canina é de grande importância, uma vez que a doença pode se manifestar sob as mais variadas formas e situações, com quadros clínicos que facilmente podem ser confundidos com outras doenças infecciosas tais como cinomose, neosporidiose e hepatite viral canina (VIDOTTO, 1992; DOMINGUES *et al.*, 1998). O imunodiagnóstico da toxoplasmose canina vêm sendo estudado desde os anos 40 e passou por diferentes fases, sofrendo modificações de acordo com a evolução das técnicas de diagnóstico sorológico (VIDOTTO, 1992). Dentre as técnicas mais empregadas para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em cães, pode-se destacar a técnica de Hemaglutinação Indireta (IHA) e a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI). Os fundamentos da técnica de Imunofluorescência Indireta foram desenvolvidos nas décadas de 30 e 40, e esta passou a ser usada rotineiramente na década de 60 para diagnóstico da toxoplasmose (DESMONTS *et al.*, 1985; VIDOTTO, 1992). Atualmente é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo da toxoplasmose em cães. Apresenta alta especificidade e sensibilidade, porém, requer equipamentos caros, análise individual, pessoal técnico altamente treinado e a leitura das lâminas não é automatizada.

A técnica de Enzaimunoensaio (ELISA), foi descrita por ENGVALL e PERLMANN (1971). Atualmente é uma das técnicas mais utilizadas para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. Sua sensibilidade supera a da já consagrada técnica de Imunofluorescência Indireta (VIDOTTO, 1992). Apresenta as vantagens de ser uma técnica de fácil execução e possuir leitura automatizada, o que permite o

processamento de vários soros simultaneamente, possibilitando seu uso em estudos epidemiológicos (MINOZZO, 1997; LIN, 1998).

Tanto a técnica de ELISA quanto a técnica de IFI permitem a pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM, variando de acordo com a especificidade do conjugado que está sendo usado. Anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii*, podem ser detectados cerca de duas semanas após a infecção e permanecem por toda a vida do hospedeiro, enquanto que anticorpos da classe IgM aparecem cerca de uma semana após a infecção e permitem a detecção de infecções recentes (LIN, 1998).

Do ponto de vista de saúde pública, a infecção na população canina significa que a área envolvida representa nicho ecológico para o *T. gondii* e, conseqüentemente, um risco para a população humana (GERMANO *et al.*, 1985). GARCIA *et al.* (1999a) encontraram, pelo método de imunofluorescência indireta, correlações positivas e significativas nos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, entre cães e homens, o que os levou a supor que cães e homens compartilhem de uma fonte de infecção comum e que esta seja a alimentação. O conhecimento da prevalência de toxoplasmose em cães é importante, porque o cão é o mais comum animal de estimação e desta forma ele pode refletir a extensão da prevalência da infecção por *T. gondii* no ambiente doméstico (LIN, 1998).

O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de título de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em cães em duas localidades: a primeira no município de Canoinhas, Santa Catarina; e a segunda no município de Curitiba, Paraná; usando como ferramenta diagnóstica o método de Enzaimunoensaio indireto (ELISA). No estado de Santa Catarina, a prevalência de títulos de anticorpos IgG anti - *T. gondii* em cães não foi previamente estudada, justificando o presente trabalho, uma vez que a prevalência parece ser devido a fatores geográficos, hábitos alimentares e coabitação com felídeos. No município de Curitiba, o trabalho referente a sorologia para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, data da década de 50 (GIOVANOINI, 1958). Então, uma população de cães de rua de Curitiba foi selecionada aleatoriamente, com o objetivo de avaliar como se encontra o perfil sorológicos de anticorpos IgG anti -*T. gondii* nos cães deste município após um período de aproximadamente 40 anos.

Para atingir o objetivo proposto, foram realizados:

✓ num primeiro tempo, a padronização do método de Enzimaimunoensaio Indireto para o uso no diagnóstico da presença de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em cães.

✓ num segundo tempo, a comparação do método de Enzimaimunoensaio Indireto, padronizado neste trabalho, com o método de Imunofluorescência Indireta (padrão ouro).

✓ num terceiro tempo, foram determinadas as prevalências de títulos de anticorpos IgG anti- *Toxoplasma gondii* em soros de cães do município de Canoinhas, SC e do município de Curitiba, PR; usando como ferramenta diagnóstica o método de Imunofluorescência Indireta.

✓ num quarto tempo, foram determinadas as prevalências de títulos de anticorpos IgG anti- *Toxoplasma gondii* em soros de cães do município de Canoinhas, SC e do município de Curitiba, PR; usando como ferramenta diagnóstica o método de Enzimaimunoensaio Indireto padronizado no presente trabalho.

## 2.REVISÃO:

*Toxoplasma gondii* e TOXOPLASMOSE.

## 2.1. POSIÇÃO TAXONÔMICA.

### Segundo LEVINE (1977)

- Filo: Protozoa
- Sub Filo: Apicomplexa
- Classe: Sporozoa
- Família: Sarcocystidae
- Sub Família: Toxoplasmatinae
- Gênero: *Toxoplasma* (NICOLLE & MANCEUX, 1909)
- Espécie: *gondii* (NICOLLE & MANCEUX, 1909)

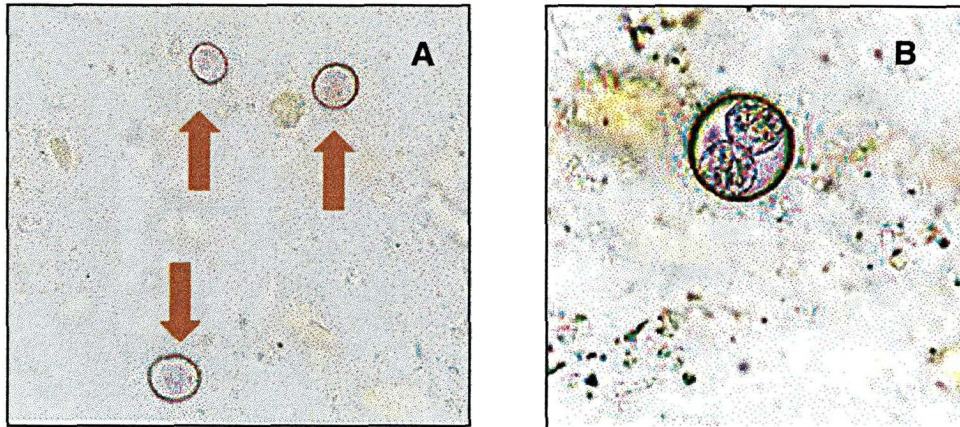
## 2.2. MORFOLOGIA.

### 2.2.1. Oocisto.

É a forma infectante do parasita produzida no intestino do gato e eliminada com as suas fezes (FIGURA 1). Possuem forma esférica e membrana dupla. Seu tamanho é de aproximadamente 11 $\mu$ m de diâmetro. A esporulação dos oocistos ocorre em três a cinco dias num ambiente com condições adequadas. Quando esporulado, este possui em seu interior dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos e uma massa de citoplasma residual. Os oocistos podem permanecer viáveis no ambiente por até 12 meses, resistindo a extremos de temperaturas ambientais de  $-20^{\circ}\text{C}$  até  $37,5^{\circ}\text{C}$  (URQUHART *et al.*, 1990). Pela presença de uma membrana espessa, os oocistos resistem vários meses no meio externo, e aproximadamente meia hora em solução de hipoclorito a 5% e formol a 5% (PESSÔA & MARTINS, 1988).

O número de oocistos eliminados em uma só evacuação de um gato infectado é da ordem de 10.000 a 100.000 oocistos por grama de fezes (REY, 1991).

**FIGURA 1 – OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii*.**



A – Fotomicrografia de Oocistos imaturos (400x, à fresco)  
 B – Fotomicrografia de Oocisto esporulado (1000x, à fresco)  
 FONTE: Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFPR.

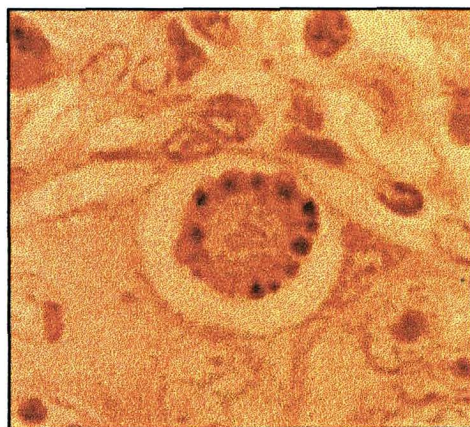
### 2.2.2. Estádios Intestinais.

São encontrados somente no hospedeiro definitivo durante a infecção intra-epitelial, podendo ser:

#### ✓ *Esquizontes*

São encontrados no jejuno e no íleo. Seu tamanho varia de 4 -17  $\mu\text{m}$ . Um esquizonte pode dar origem a até 32 merozoítos em seu interior (FIGURA 2).

**FIGURA 2 - CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DE GATO EVIDENCIANDO UM ESQUIZONTE.**



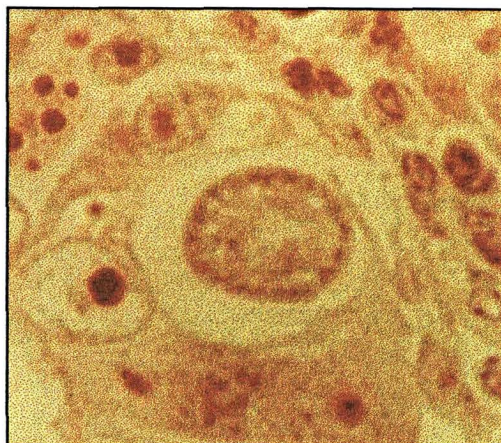
(Fotomicrografia. Coloração: Hematoxilina e Eosina, 1000x)  
 FONTE: Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFPR.



### ✓ *Gamontes*

São observados principalmente no íleo. O tamanho médio é de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Existem em duas formas, um microgametócito ou gameta masculino (móvel através de flagelo) e um macrogametócito ou gameta feminino (imóvel) (FIGURA 3).

**FIGURA 3** - CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DE GATO EVIDENCIANDO UM GAMONTE.



(Fotomicrografia. Coloração: Hematoxilina e Eosina, 1000x)  
FONTE: Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFPR.

### 2.2.3. Estádios Extra Intestinais.

São encontrados nos hospedeiros intermediários e mesmo no gato quando este se comporta como hospedeiro intermediário.

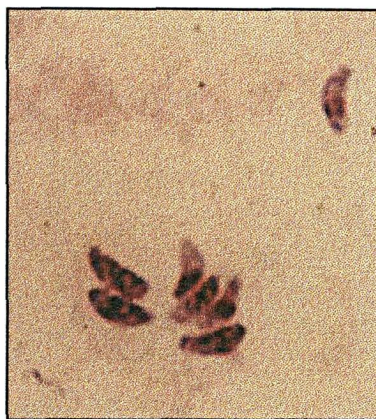
### ✓ *Taquizoítos*

Apresentam um comprimento médio de 6  $\mu\text{m}$ , com diâmetro em torno de 2  $\mu\text{m}$ . São formas de proliferação rápida do parasita. Possuem forma de meia lua ou arco. Possuem uma extremidade arredondada, a outra extremidade afilada e um núcleo mais ou menos central (FIGURA 4). São encontrados dentro de vacúolos citoplasmáticos principalmente no interior dos fibroblastos, hepatócitos, macrófagos, células do miocárdio e em líquidos orgânicos (FRENKEL, 1970).

Os taquizoítos retirados do exsudato peritoneal de animais infectados, quando examinados à fresco, apresentam-se bastante refringentes. São organismos lábeis a fatores externos, permanecendo vivos por pouco tempo em temperaturas de 23 a

25° C, aproximadamente oito horas a 5°C e duas semanas no leite ou em solução de peptona a 1%. Os taquizoítos conservam-se infectantes por quatro a oito dias na carcaça de animais, quando mantidas a 5°C (REY, 1991; CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

**FIGURA 4 – TAQUIZOÍTOS DE *Toxoplasma gondii*.**



(Fotomicrografia. Coloração: Giemsa&May Grünwald, 1000x)  
FONTE: Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFPR.

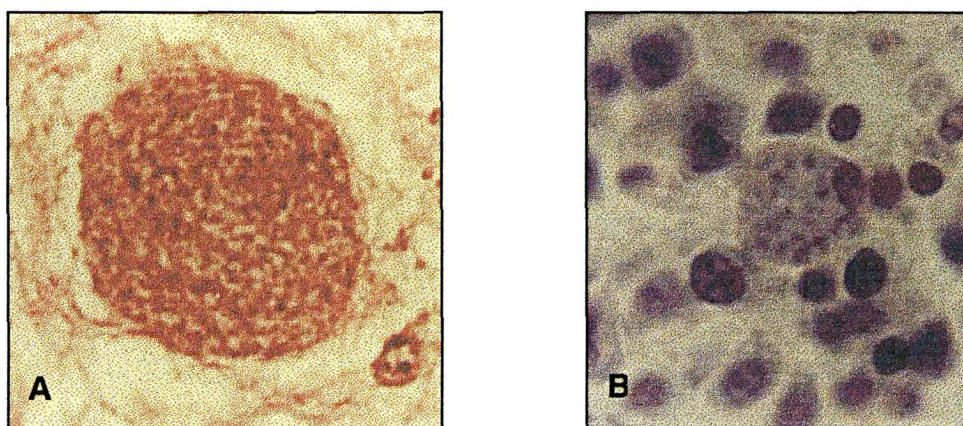
#### ✓ *Bradizoítos*

A forma de resistência do parasita nos tecidos dos hospedeiros intermediários é o cisto contendo bradizoítos. Segundo DUBEY (1987) os bradizoítos possuem forma lanceolada semelhante a do taquizoíto. Porém, sua multiplicação por endodiogenia é lenta, apresentam maior depósito de glicogênio e o núcleo está localizado mais próximo do pólo anterior (REY, 1991; CIMERMAN & CIMERMAN, 1999). Os cistos tissulares possuem diâmetro de 10 a 100µm, podendo conter centenas ou até milhares de bradizoítos (FIGURA 5). São geralmente encontrados no tecido hepático, muscular, pulmonar, cerebral e na retina dos hospedeiros intermediários. A localização e o número de cistos tissulares em animais, difere com o hospedeiro e com a cepa de *T. gondii*. Em camundongos e ratos, a maioria dos cistos tissulares são encontrados no cérebro, independentemente da cepa que foi utilizada na infecção. Nos bovinos, ovinos, caprinos e felinos a maioria dos cistos são observados na musculatura e poucos são observados no cérebro (DUBEY, 1987). Segundo DUBEY e BEATIE (1988) os bradizoítos e seus cistos são mortos se congelados a -20°C, aquecidos a 65°C ou submetidos a radiação ionizante. Os

bradizoítos resistem a digestão péptica e triptica, o que está de acordo com sua transmissão pela via oral (FRENKEL, 1997).

Estudos de biologia celular, especialmente microscopia eletrônica, foram cruciais para a identificação e caracterização dos oocistos, monitorização da diferenciação dos taquizoítos e bradizoítos e exame do completo desenvolvimento dos cistos tissulares. Descobriu-se que taquizoítos e bradizoítos são morfologicamente semelhantes, mas que possuem diversas diferenças em sua composição molecular, com antígenos diferentes e com maior acúmulo de glicogênio em bradizoítos (KNOLL & BOOTHROYD, 1998). Quanto aos oocistos foi possível a descoberta de que estes possuem uma micrópila. O estudo da diferenciação de modelos *in vitro* está sendo importante para a elucidação de como taquizoítos se diferenciam em bradizoítos (KNOLL & BOOTHROYD, 1998).

**FIGURA 5 – CORTES HISTOLÓGICOS EVIDENCIANDO CISTOS TISSULARES COM BRADIZOÍTOS.**



A=Fotomicrografia de Cisto tissular em cérebro de camundongo (Hematoxilina e Eosina, 1000x)

B=Fotomicrografia de Cisto tissular em baço de cão (Hematoxilina e Eosina, 1000x)

FONTE: Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFPR.

### **2.3.O *Toxoplasma gondii* NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO.**

Os felinos (gêneros *Felis* e *Lynx*) desempenham papel fundamental na epidemiologia da toxoplasmose por serem hospedeiros definitivos do *T. gondii* e os únicos animais em que o parasita realiza a fase sexuada de seu ciclo de vida com a produção de oocistos, os quais são eliminados nas fezes e assim podem infectar

outros hospedeiros (LUCAS *et al.*, 1998). Ainda que o gato se constitua no único hospedeiro urbano completo, outros felídeos silvestres também são capazes de eliminar formas infectantes do protozoário através das fezes, mantendo o ciclo epidemiológico em áreas não urbanizadas (BONAMETTI *et al.*, 1997).

Embora seja possível que o ciclo do *T. gondii* possa ser perpetuado na ausência de felinos, parece que esses animais são de importância primária na transmissão do *T. gondii* na maioria das regiões do mundo.

Quando um gato jovem se alimenta com um hospedeiro intermediário, que apresente toxoplasmose aguda ou crônica, começam a aparecer em suas fezes oocistos imaturos. O mesmo acontece se o felino se contaminar através da ingestão de oocistos esporulados (PESSÔA & MARTINS, 1988; URQUHART *et al.*, 1990; REY, 1991; TENTER, HECKEROTH, WEISS; 2000).

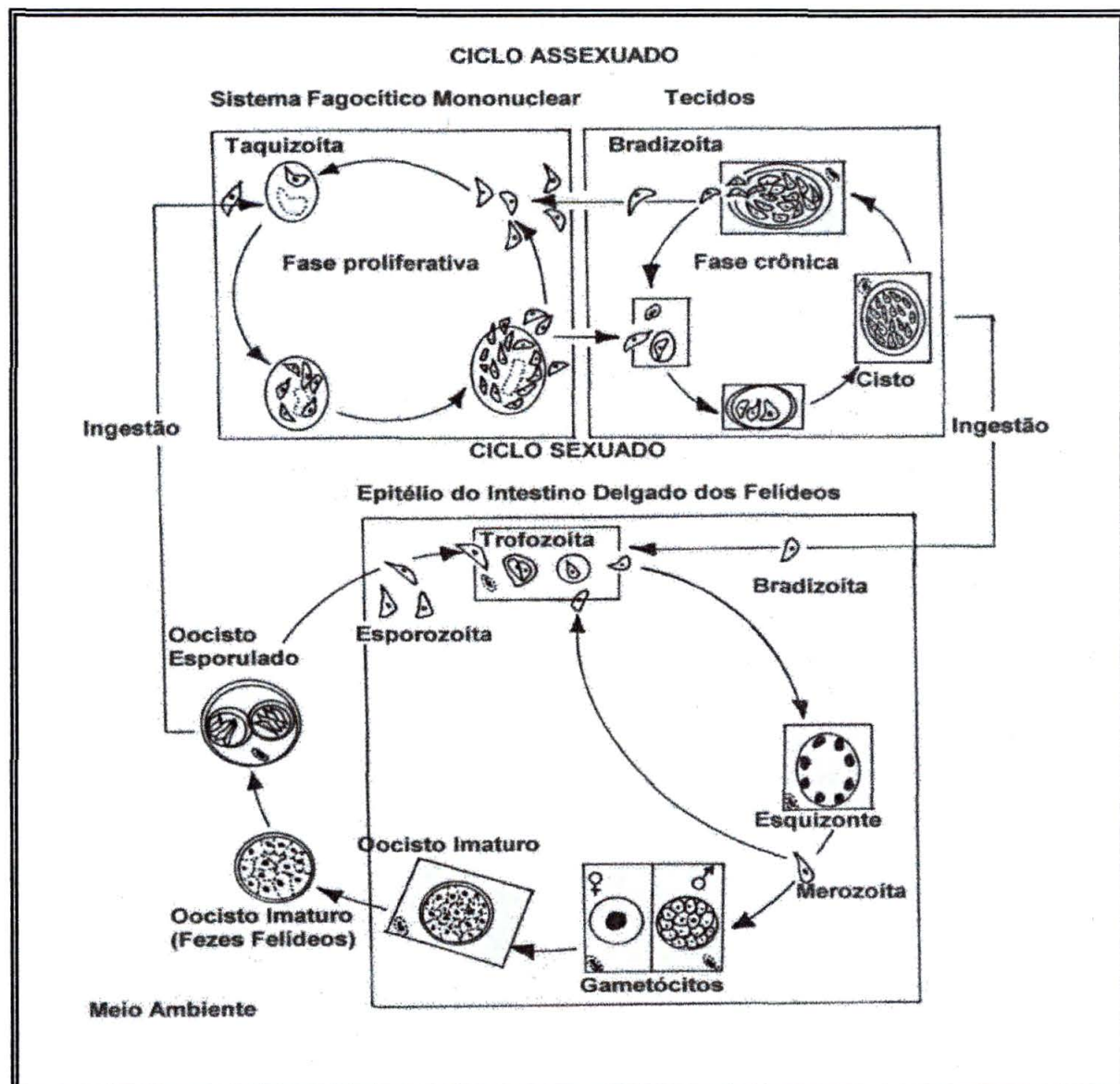
## **2.4.CICLO BIOLÓGICO.**

Nos hospedeiros intermediários o *T. gondii* assume duas fases de desenvolvimento assexuais. Na primeira fase, os taquizoítos se multiplicam rapidamente por repetidas endodiogenias, dentro de diferentes células do hospedeiro, principalmente no interior de macrófagos.

Após diversas gerações, os taquizoítos de última geração iniciam a segunda fase do desenvolvimento que vai resultar na formação de cistos tissulares. Dentro destes cistos, os bradizoítos multiplicam-se lentamente por endodiogenia. Os cistos tem alta afinidade por tecido muscular e neural e estão localizados predominantemente no sistema nervoso central, olhos, músculo cardíaco e esquelético. Os cistos tissulares são o estágio terminal do ciclo de vida no hospedeiro intermediário e são imediatamente infectantes. Se ingeridos por um hospedeiro definitivo, os bradizoítos, são liberados pela digestão, penetram nas células epiteliais e iniciam outra fase assexual de proliferação que consiste de uma multiplicação inicial por endodiogenia, seguida de repetidas esquizogonias nas células do epitélio do intestino delgado. O estágio terminal desta multiplicação assexual inicia a fase sexual do ciclo de vida. A fase sexual ocorre através de

multiplicação por gametogonia terminando com a formação de oocistos imaturos no epitélio do intestino delgado. Os oocistos não esporulados são liberados no lúmen intestinal e passam para o meio ambiente com as fezes. No meio ambiente sofrem esporulação e tornam-se infectantes em três a cinco dias (PESSÔA & MARTINS, 1988; URQUHART *et al.*, 1990; REY, 1991) (FIGURA 6).

FIGURA 6 – CICLO EVOLUTIVO DO *Toxoplasma gondii*.



Adaptado de PESSÔA e MARTINS, 1988.

## 2.5.MECANISMOS DE CONTAMINAÇÃO E TRANSMISSÃO.

Existem três estádios infectantes no ciclo de vida do *T. gondii*: taquizoítos, bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e esporozoítos (contidos em oocistos esporulados) (VIDOTTO, 1992). Todos os três estádios são infectantes para ambos, hospedeiros intermediários e hospedeiro definitivo (FIGURA 7). Estes podem adquirir o *T. gondii* através de uma das seguintes rotas:

⇒horizontalmente por ingestão de oocistos esporulados provenientes do ambiente;

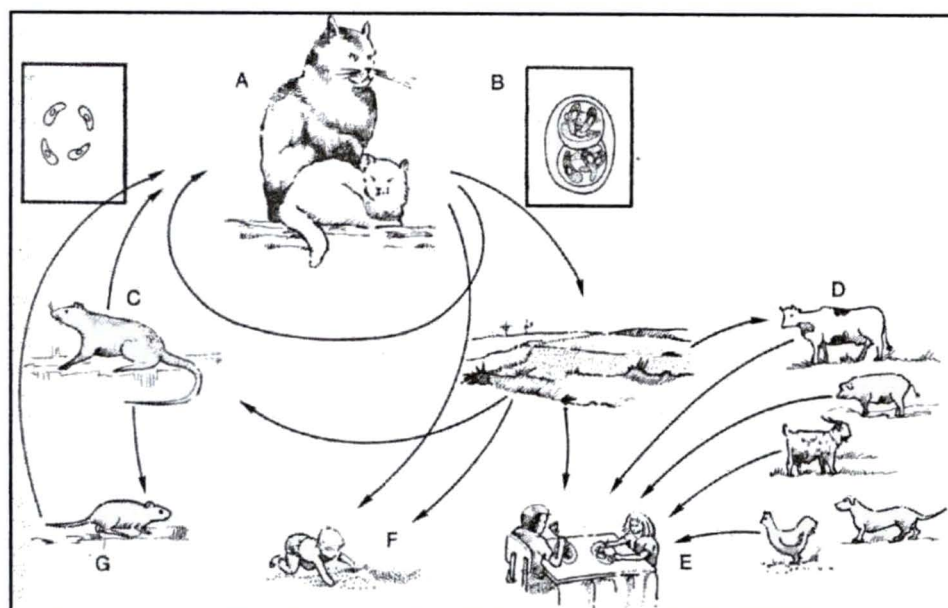
⇒horizontalmente por ingestão de cistos tissulares contidos em carne crua ou mal passada de hospedeiros intermediários;

⇒verticalmente por transmissão transplacentária de taquizoítos. A transmissão congênita do *T. gondii* pode ocorrer quando a infecção aguda coincide com a prenhez. As conseqüências são mais sérias aos fetos se a infecção é contraída no primeiro terço ou metade da gestação; embora quanto mais adiantada estiver esta gestação, maior é a probabilidade da infecção fetal, porém com menos riscos de fetopatias graves (VIDOTTO, 1992).

Então, o *T. gondii* pode ser transmitido do hospedeiro definitivo para o intermediário, do hospedeiro intermediário para o hospedeiro definitivo, bem como entre hospedeiros definitivos e entre hospedeiros intermediários (TENTER, HECKEROTH, WEISS; 2000).

GARCIA *et al.* (1999b) encontraram altas prevalências de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos, bovinos e ovinos, sendo então, alto o risco das carnes destes animais como via de transmissão para o homem, desde que ingeridas cruas ou mal cozidas e que contenham cistos tissulares de *T. gondii*. Outras vias de transmissão têm sido assinaladas. Taquizoítos tem sido encontrados no leite de diversos hospedeiros intermediários, incluindo ovelhas, cabras e vacas. Porém, toxoplasmose humana foi assinalada somente após consumo de leite de cabra cru (SACKS, ROBERTO, BROOKS, 1982; DE ANDRADE CHIARI & PEREIRA NEVES, 1984).

FIGURA 7 – ROTAS DE TRANSMISSÃO DO *Toxoplasma gondii*.



FONTE: REY (1991).

## 2.6.PATOGENIA.

### 2.6.1. Patogenia do *Toxoplasma gondii* no hospedeiro definitivo.

Cerca de 50% dos felinos apresentam anticorpos anti-*T. gondii* (FRENKEL, 1997). Nos gatos, a toxoplasmose-doença não é muito freqüente quando comparada à taxa de infecção verificada nestes animais através de levantamentos sorológicos (GERMANO, 1985). Porém, alguns felinos podem desenvolver doença aguda. Nestes casos os sinais mais freqüentemente observados incluem febre, tosse, dispnéia, letargia, anorexia, vômito, diarreia e icterícia, além de alterações miocárdicas, hiperestesia muscular, alterações neurológicas e oculares (LUCAS *et al.*, 1998). O quadro clínico pode evoluir para a morte, principalmente se o animal não for convenientemente tratado (GERMANO, 1985).

Os felinos podem também desenvolver quadros subagudos ou crônicos. Nos felinos as observações mais freqüentes são leucopenia e anemia, além de lesões oftálmicas graves como irite e retinocoroidite (GERMANO, 1985). Gatos com o vírus

da imunodeficiência dos felinos, podem reativar uma infecção latente pelo *T. gondii* resultando em quadros sintomáticos de toxoplasmose (LUCAS *et al.*, 1998).

### **2.6.2. Patogenia do *Toxoplasma gondii* no hospedeiro intermediário.**

A patogenia do *T. gondii* na fase aguda está diretamente relacionada à divisão intracelular por endodiogenia realizada pelos taquizoítos nos tecidos dos hospedeiros intermediários. Sua multiplicação rápida, perturba o tropismo celular e causa a morte da célula hospedeira; desta forma quando existem grupos de células infectadas, o resultado macroscópico é o de necrose de coagulação, de cor creme claro a amarelada (CORRÊA & CORRÊA, 1992). Pontos de necrose com um a dois milímetros de diâmetro são encontrados no baço, fígado e pulmões (CORRÊA & CORRÊA, 1992). A cepa RH isolada e caracterizada por SABIN (1941), conserva ainda hoje elevada virulência em animais de laboratório. Animais contaminados com esta cepa virulenta apresentam manifestações agudas severas que levam ao óbito em razão da rápida proliferação dos taquizoítos nas células de diferentes órgãos (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

### **2.6.3. Toxoplasmose no Homem.**

Os avanços nas técnicas de diagnóstico associados ao conhecimento dos clínicos e dos patologistas, tem mostrado a vasta distribuição e ocorrência da toxoplasmose humana e animal (ISHIZUKA, 1974). No Brasil, vários levantamentos sorológicos mostraram que a prevalência em humanos é de cerca de 50 a 80% em indivíduos adultos (BONAMETTI *et al.*, 1997; CANTOS *et al.*, 2000), com variações de acordo com a idade, condição sócio econômica e hábitos alimentares (REY & RAMALHO, 1999).

As duas maiores rotas de transmissão do parasita para o homem são a oral e a congênita, podendo também ocorrer por auto inoculação acidental em profissionais que trabalham com material contaminado. A infecção também pode ser transmitida



por transfusão de sangue, transplante de órgãos ou de medula óssea. O *T. gondii* pode sobreviver no plasma citratado a 4° C por cerca de 50 dias (REY, 1991).

Atenção especial deve ser dispensada à doença nos pacientes imunossuprimidos, como nos casos de AIDS, nos quais ocorre reativação da forma latente do parasita que permaneceu encistado nos tecidos após a infecção primária. Nestes casos, podemos ter o desenvolvimento de encefalite toxoplásmica, que é uma das mais importantes causas de mortalidade em aidéticos (LUCAS *et al.*, 1998).

Segundo NOGUEIRA, MOREIRA e PEREIRA (1996) 14% dos casos de AIDS notificados ao Ministério da Saúde apresentam toxoplasmose, sendo esta a quarta infecção oportunistas mais freqüente no Brasil.

A toxoplasmose é uma doença geralmente assintomática em indivíduos adultos saudáveis, mas o feto e o recém-nascido são altamente suscetíveis a sérias complicações quando infectados durante a gravidez, ou no período neonatal. Os sintomas neonatais incluem, febre, convulsões ou icterícia prolongada (TENTER, HECKEROTH, WEISS; 2000).

#### **2.6.3.1. Formas clínicas de Toxoplasmose no Homem.**

A toxoplasmose no homem pode se manifestar de diferentes formas e com os mais variados sinais clínicos. Algumas formas da doença são clássicas, como a toxoplasmose em imunocomprometidos, a toxoplasmose ocular, a congênita e aquela em pacientes imunocompetentes.

##### **✓Toxoplasmose adquirida em pacientes imunocompetentes.**

A maioria dos casos de infecção por *T. gondii* em humanos são assintomáticos. Ocasionalmente pode ocorrer doença.

O curso clínico da doença é benigno e auto limitado. Os sintomas, se presentes, desaparecem dentro de poucos meses e raramente persistem por mais de 12 meses. Uma linfadenopatia é a manifestação clínica mais significativa, mas também são observados miocardite, hepatite, miosite e mais raramente encefalite (DEROUIN & THULLIEZ; 1995).

Somente 10 a 20% dos casos de infecção pelo *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes são sintomáticos (BONAMETTI *et al.*, 1997). Toxoplasmose aguda

sintomática foi registrada após ingestão de carne crua de ovino com manifestações clínicas de febre, cefaléia, mialgia, artralgia, adenomegalia cervical e/ou maxilar além de exantema e hepatomegalia (BONAMETTI *et al.*, 1997).

✓Toxoplasmose adquirida ou reativada em pacientes imunodeficientes.

Nestes indivíduos, a toxoplasmose adquirida perde seu caráter clínico autolimitado e benéfico, especialmente se a resposta imunomediada por células estiver debilitada (ISRAELSKI & REMINGTON, 1993). Nestes casos a infecção pode ser assintomática ou estar associada com doenças não específicas (doenças do sistema nervoso central, miocardite ou pneumonite) (TENTER, HECKEROTH, WEISS; 2000). Nos indivíduos imunodeprimidos, a forma mais grave de toxoplasmose corresponde a reativação de cistos tissulares provenientes de uma primoinfecção. A multiplicação do parasita ocorre principalmente em tecido cerebral, sendo caracterizada clinicamente por sintomas neurológicos (DEROUIN & THULLIEZ; 1995). Pode haver um alto risco de uma disseminação fatal da infecção pelo *T. gondii* com grande envolvimento cerebral e morte, especialmente em pacientes com AIDS, quando a reativação da doença ocorre mais freqüentemente (TENTER, HECKEROTH, WEISS; 2000). A toxoplasmose pode também complicar transplantes de órgãos ou de medula óssea pelo uso de medicamentos imunossupressivos (REY, 1991).

✓Toxoplasmose Ocular.

Acreditava-se até pouco tempo, que a toxoplasmose ocular fosse exclusivamente uma manifestação de infecção congênita por *T. gondii*. Atualmente já está bem esclarecido que a toxoplasmose ocular pode ser resultado de ambos: infecção congênita e infecção adquirida (PESSÔA & MARTINS, 1988). A doença ocular envolve primariamente a retina. As recorrências acontecem com freqüência, podendo provocar dano progressivo a retina e estruturas adjacentes, principalmente ao corpo vítreo e nervo óptico. O principal efeito clínico é o desenvolvimento de coriorretinite devido ao desenvolvimento e posterior crescimento dos cistos de *T. gondii* no globo ocular. Estes cistos continuam seu desenvolvimento mesmo quando o indivíduo adquire imunidade, porque os anticorpos não passam para o interior do

globo ocular. É a causa mais importante de coriorretinite quando resulta de uma infecção congênita (AMATO, 1971).

#### ✓Toxoplasmose Congênita.

A toxoplasmose congênita ocorre quando o feto é contaminado, quando a mãe adquire o protozoário pela primeira vez durante a gestação. Geralmente a infecção congênita está associada a sintomas mais graves do que a infecção pós natal. As conseqüências causadas no feto dependem do trimestre em que a infecção foi adquirida (DEROUIN & THULLIEZ; 1995). Sem tratamento, a incidência de infecção fetal é de 10 a 15% se a gestante adquirir a toxoplasmose no primeiro trimestre, 30% se no segundo trimestre e 60% no terceiro trimestre, ou seja, ela é maior a medida que aumenta o fluxo sangüíneo placentário (NOGUEIRA, MOREIRA, PEREIRA; 1996). A infecção materna ocorrendo no primeiro trimestre, geralmente leva ao aborto espontâneo ou a mal formações congênitas. Infecções contraídas no segundo trimestre podem também levar a quadros de mal formações congênitas; e infecções contraídas durante o terceiro trimestre resultam em um alto percentual de crianças infectadas, a maioria com poucos ou nenhum sintoma (TENTER, HECKEROTH, WEISS; 2000). O recém nascido com toxoplasmose congênita pode ser assintomático ao nascer, com problemas clínicos aparecendo posteriormente (retardo mental, coriorretinite, encefalite, calcificações intracranianas e hidrocefalia), nascer de parto prematuro ou ainda natimorto (PESSÔA & MARTINS, 1988).

Estudos realizados no Brasil mostraram que de 60 a 75% das mulheres em idade reprodutiva apresentavam anticorpos da classe IgG contra *T. gondii*, isto é, 25% a 40% delas estavam suscetíveis a essa infecção durante a gestação (MIURA, 1993). Em um estudo realizado por REICHE *et al.* (2000) a presença de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG foi detectada em 67% das amostras de gestantes atendidas no Hospital Universitário de Londrina, PR. Neste estudo, 33% das gestantes atendidas estavam suscetíveis a infecção durante a gravidez. A presença de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgM foi observada em 19 amostras, evidenciando que 1,8% das gestantes incluídas no estudo estavam apresentando infecção atual ou recente por esse protozoário, com ocorrência de risco de transmissão dessa protozoose a seus fetos.

Relatos de resultados terapêuticos na prevenção e na redução da gravidade da toxoplasmose congênita torna obrigatória a triagem de gestantes de risco soronegativas e o seu seguimento sorológico durante a gravidez para a detecção precoce de soroconversão (TENTER, HECKEROTH, WEISS; 2000). A prática de seleção sorológica rotineira, que é adotada na França e na Áustria, obrigatória por lei, trouxe como consequência uma redução acentuada na incidência de toxoplasmose congênita nesses países (BITTENCOURT, 1995).

#### **2.6.4. Toxoplasmose em Cães.**

No cão, a exemplo do que ocorre no homem, a infecção é de evolução crônica e assintomática na grande maioria dos casos, mas quando diante de condições imunossupressoras manifesta-se clinicamente como uma moléstia grave (GERMANO *et al.*, 1985).

As lesões encontradas em cães são um exsudato seroso nas cavidades pleural e peritoneal, enterite hemorrágica, broncopneumonia e pequenas úlceras no estômago. Áreas necróticas focais no pulmão, fígado e cérebro de cães infectados são comuns e podem levar ao desenvolvimento de sinais clínicos severos (DUBEY, 1985; SILVA *et al.*, 1997).

O estado se caracteriza por doença febril (40-42° C); anorexia, apatia, ataxia, desenvolvimento de pneumonia, dispnéia inspiratória, rinorréia, conjuntivite catarral ou catarro-purulenta, linfadenopatia, sinais nervosos e diarreia (DUBEY, 1985; PIMENTA, 1993; SILVA *et al.*, 1997). O quadro clínico é bastante semelhante ao de cinomose (CORRÊA & CORRÊA, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1992). Um quadro agudo do sistema nervoso central foi relatado por SAWCHUCK (1981). Cães com toxoplasmose nervosa mudam de hábitos, ficam agressivos ou apáticos, apresentam convulsões, sialorréia, paresia e paralisia (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Lesões oculares também foram verificadas em cães. Os cães apresentavam retinite, corioretinite e midríase permanente (PIPER *et al.*, 1970). Alguns animais podem apresentar sinais neurológicos de cinomose concomitante com as lesões oculares por *T. gondii* (KAVINSKI, 1980).

O *T. gondii* pode ser transmitido congenitamente em cães, quando as fêmeas são infectadas durante a gestação (BRESCIANI *et al.*, 1999). Nestas circunstâncias, os fetos se infectam através da placenta. As conseqüências são a interrupção da prenhez, seja por aborto ou por parto prematuro com morte fetal (GERMANO, 1985).

Como a sintomatologia clínica da doença é inespecífica, outras moléstias devem ser suspeitadas pelo clínico. Desta forma, o diagnóstico diferencial da toxoplasmose em cães deve incluir a cinomose, a isosporose, a estrogiloidose, intoxicações por organofosforados e a raiva (CORRÊA & CORRÊA, 1992). O diagnóstico diferencial deve ainda incluir o *Neospora caninum*, não esquecendo porém que os cães podem concomitantemente ter sorologia positiva para ambos os protozoários (MINEO *et al.*, 2001).

SCHLOGEL (1967) na cidade de Curitiba, relatou que em 64 cérebros de cães remetidos para exame de raiva, encontrou 11 positivos para esta virose, sete positivos para toxoplasmose e 46 negativos; confirmando a necessidade de um diagnóstico diferencial entre raiva e toxoplasmose nos animais com sinais nervosos.

Mais recentemente FRENKEL *et al.* (1995) sugeriram que os cães constituem um importante meio de transmissão mecânica de *T. gondii*. Pelos seus hábitos de ingerir e rolar em fezes de gatos, contaminam o ambiente que dividem com seus proprietários, permitindo deste modo a contaminação do homem. Ao contrário do esperado, FRENKEL *et al.* (1995) no Panamá, encontraram um maior risco de soroconversão para *T. gondii* em crianças pelo contato com cães do que através do contato com gatos.

Outro estudo realizado por LINDSAY *et al.* (1997) demonstrou que oocistos esporulados de *T. gondii* podem atravessar o trato intestinal canino e serem excretados nas fezes ainda infectantes; entretanto, naqueles cães onde oocistos foram colocados na pele e nos pelos ainda não esporulados, estes não se tornaram infectantes, provavelmente porque a pele do cão não tenha temperatura e umidade adequadas para o processo de esporulação. Estes dados reforçam a hipótese de que os cães podem estar envolvidos na transmissão mecânica de *T. gondii* para o homem.

## 2.7.CONTROLE.

A prevenção da toxoplasmose humana é difícil, devido a distribuição universal do parasita. Porém deve ser especialmente enfatizada na gestante e em imunodeprimidos soronegativos, pois nestes grupos as consequências são mais graves (NOGUEIRA, MOREIRA, PEREIRA; 1996).

A prevenção da toxoplasmose animal requer conhecimento preciso da cadeia epidemiológica da doença, estabelecendo-se com exatidão, a possível fonte de infecção, que pode estar representada por alimentos contaminados, roedores ou felinos.

No caso de cães e gatos, a limpeza diária das instalações com retirada das fezes e controle da alimentação, evitando o fornecimento de carnes cruas, constituem-se em medidas essenciais para o controle da doença. Já para herbívoros e onívoros, que se infectam basicamente com os oocistos eliminados nas fezes dos felídeos, evitar o acesso destes animais às instalações e abrigos nas propriedades, é a medida mais correta a ser adotada (VIDOTTO, 1992).

Atualmente, pesquisas vem sendo realizadas com o objetivo de desenvolver vacinas para a toxoplasmose. Uma vez que os gatos são os hospedeiros definitivos e disseminadores dos oocistos que contaminam o ambiente, os felinos jovens são o alvo dos estudos para o desenvolvimento de vacinas. PINILLA *et al.* (1999) realizaram uma triagem de campo para avaliar a eficácia de uma vacina de *T.gondii* para felinos, na redução da exposição de suínos ao parasita. O objetivo deste experimento, foi de testar a praticabilidade de uso e a eficácia da vacina felina na diminuição da exposição de suínos ao *T. gondii* em condições de campo. A vacina consistia de bradizoítos vivos de uma cepa mutante (T-263) derivada de um homogeneizado de cérebro de rato. Esta cepa era capaz de produzir imunidade e devido a alterações no ciclo reprodutivo sexual do parasita não promovia a eliminação de oocistos. Por enquanto, os autores referidos, concluíram que a vacina ainda não se mostrou eficaz após o desafio com uma cepa selvagem, e que ainda são necessárias maiores pesquisas para que se desenvolvam vacinas realmente eficazes.

## 2.8. TRATAMENTO.

Várias drogas são descritas no tratamento da toxoplasmose com resultados satisfatórios. Os medicamentos usados atuam contra os taquizoítos, mas não atuam contra os cistos tissulares.

Em relação a terapêutica, pelo fato da toxoplasmose ser geralmente autolimitada, em princípio, não está indicado tratamento específico na toxoplasmose aguda em pacientes imunocompetentes. Exceção a esta regra, são os casos com comprometimento ocular, pacientes imunodeprimidos, gravidez e cursos prolongados (mais de um mês de febre e repercussão sistêmica). As drogas usadas para o tratamento em humanos, são uma associação de sulfadiazina (100 mg/kg/dia), pirimetamina (1 mg/kg/dia) e ácido folínico (5 mg/dia) por um período mínimo de três semanas (NOGUEIRA, MOREIRA, PEREIRA; 1996). As mesmas drogas são usadas no tratamento de animais.

Está indicado o uso de cloridrato de clindamicina no tratamento dos sinais clínicos associados ao ciclo extra intestinal em gatos (LAPPIN, 1996). Esta droga pode ser usada também em outras espécies animais (DUBEY & BEATTIE, 1988). A administração das drogas deve continuar por duas semanas após a melhora do quadro clínico, o qual se verifica com freqüência em dois a três dias após instituída a terapia (GERMANO, 1985). Outras drogas comumente utilizadas, como as sulfonamidas, sulfadiazina, sulfametazina, entre outras foram testadas há pelo menos uma década e mostraram-se efetivas contra o *T. gondii* (DUBEY & BEATTIE, 1988; REY, 1991).

DUBEY e BEATTIE (1988) demonstraram que a espiramicina produz alta concentração tecidual, particularmente na placenta, sem atravessar a barreira placentária. Posteriormente foi demonstrado que o tratamento prévio com espiramicina pode prevenir a transmissão do *T. gondii* para o feto.

O tratamento possui a finalidade de evitar maiores lesões ao organismo, dando tempo para que este produza os anticorpos específicos anti-*T. gondii*, ou seja, as drogas disponíveis inibem, mas não eliminam a infecção.

## **2.9. DIAGNÓSTICO.**

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser de duas formas: direto ou indireto. O diagnóstico direto consiste no isolamento do parasita de tecidos, órgãos ou líquidos corporais dos hospedeiros intermediários; ou na evidenciação de oocistos em exames fecais dos hospedeiros definitivos. O diagnóstico indireto, consiste na demonstração da presença de anticorpos anti-*T. gondii* no soro ou plasma dos hospedeiros definitivos e intermediários.

### **2.9.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.**

O diagnóstico clínico da toxoplasmose torna-se difícil por ser um processo sistêmico, com baixa parasitemia, sinais e sintomas clínicos genéricos o que leva a confusão com outras afecções de etiologias diversas, necessitando de técnicas laboratoriais e de biologia molecular para sua confirmação.

Desta forma, o diagnóstico clínico nos casos de toxoplasmose é quase que impossível; seja nos casos assintomáticos quanto nos casos sintomáticos pois os mesmos são inespecíficos e facilmente confundidos com outras doenças infecciosas e parasitárias. As suspeitas são mais evidentes nos casos de infecções congênitas, retinocoroidite e encefalite toxoplásmica em pacientes com AIDS.

### **2.9.2. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.**

**2.9.2.1. Visualização do Parasita:** realizada em exames anatomopatológicos dos casos fatais, das biópsia e nas necropsias (REY, 1991; DEROUIN & THULLIEZ; 1995). O parasita pode ser observado nas formas de taquizoítos, cistos tissulares contendo bradizoítos ou ainda nas suas formas enteroepiteliais em cortes intestinais de felinos.



2.9.2.2. *Isolamento do Parasita*: é realizado através da inoculação intraperitoneal do material suspeito (placenta, feto abortado) em animais de laboratório, como os camundongos ou em cultivo celular *in vitro*. Se os animais resistirem vivos por seis semanas e os parasitas não forem encontrados após realizadas oito a dez passagens, o resultado pode ser considerado negativo (REY, 1991; VIDOTTO, 1992).

2.9.2.3. *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*: a evidenciação do parasita pela demonstração de seus componentes como antígenos ou segmentos de DNA é de alto valor diagnóstico e vem assumindo posição de destaque especialmente em imunodeficientes.

Pela PCR é possível detectar DNA de microorganismos, sendo uma reação de grande sensibilidade e especificidade, a qual tem sido usada no diagnóstico pré-natal e na prevenção da infecção toxoplásmica durante a gestação (CANTOS *et al.*, 2000).

Na atualidade, o diagnóstico da toxoplasmose pelo método de PCR, é realizado basicamente em laboratório de pesquisa e em alguns laboratórios comerciais de grandes centros. É uma reação que requer reagentes e equipamentos caros e de difícil obtenção comercial no Brasil.

### **2.9.3. DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO.**

Devido às limitações e dificuldades inerentes aos métodos parasitológicos, os métodos sorológicos são os mais comumente usados para o diagnóstico da toxoplasmose.

A demonstração de anticorpos pelos métodos sorológicos, apenas indica infecção prévia pelo *T. gondii*. O diagnóstico conclusivo de toxoplasmose doença requer a demonstração de altos títulos de anticorpos específicos e aumento neste título em duas amostras de soro colhidas com duas a quatro semanas de intervalo (DUBEY, 1987; SILVA *et al.*, 1997).

O imunodiagnóstico da toxoplasmose passou por diferentes fases, sofrendo modificações de acordo com a evolução das técnicas de diagnóstico sorológico. Os

métodos sorológicos freqüentemente usados para o diagnóstico da toxoplasmose incluem:

#### *2.9.3.1. Método de Sabin e Feldman ou Teste do Corante.*

Foi uma das primeiras provas de boa sensibilidade e especificidade desenvolvida e ainda se encontra em uso em alguns laboratórios (VIDOTTO, 1992). A reação é desenvolvida com a utilização de taquizoítos vivos como antígeno, soro suspeito, fator acessório e azul de metileno alcalino. As principais vantagens são: boa especificidade, boa sensibilidade e detecta anticorpos produzidos precocemente (DEROUIN & THULLIEZ; 1995). As desvantagens desta reação são a necessidade de taquizoítos vivos (que envolvem a manutenção do parasita em cultivo e constituem risco para os manipuladores), necessidade de um fator acessório proveniente de soros humanos sem anticorpos e contagem do número de parasitas corados e não corados (ISHIZUKA *et al.*, 1974; REY, 1991).

#### *2.9.3.2. Método de Fixação de Complemento.*

Esta técnica requer antígeno solúvel do parasita (VIDOTTO, 1992). Foi um dos primeiros métodos a ser utilizado no diagnóstico sorológico da toxoplasmose. Entretanto, não foi um método que permaneceu em uso por longo período de tempo. A sua substituição ocorreu principalmente pelo fato deste método apresentar baixa sensibilidade e das reações positivas serem reveladas tardiamente, pois os anticorpos que fixam complementos são produzidos mais tarde (DEROUIN & THULLIEZ; 1995).

#### *2.9.3.3. Método de Hemaglutinação Indireta (IHA).*

Utiliza antígenos solúveis, é simples e não é espécie específica, podendo ser realizada em soros humanos e animais. Os inconvenientes deste método são a

dificuldade de estabilização das hemácias sensibilizadas, as variações nos antígenos e pelo fato de detectar anticorpos no soro mais tardiamente que os métodos do corante e IFI (REY, 1991), pois enquanto os antígenos do método do corante e IFI estão localizados na superfície do parasita, aqueles da IHA que sensibilizam as hemácias estão no interior dos parasitas e só são liberados quando os parasitas começam a ser destruídos.

#### 2.9.3.4. Método de Imunofluorescência Indireta (IFI).

É atualmente o método sorológico mais usado para diagnóstico de toxoplasmose (UCHÔA *et al.*, 1999). O método de IFI foi padronizado para utilização no diagnóstico de toxoplasmose por CAMARGO em 1964. Apresenta maior sensibilidade em relação ao teste do corante, facilidade de execução e boa reprodutibilidade (ISHIZUKA, 1974).

Em contrapartida, requer diagnóstico individual, disponibilidade de um microscópio, fonte de luz ultravioleta, condensador e filtros especiais (FRENKEL, 1996). A finalidade da técnica de Imunofluorescência Indireta, é a fixação dos anticorpos aos antígenos de membrana dos taquizoítos com membrana íntegra. A visualização desta reação é obtida através da adição de um conjugado fluorescente. Em microscopia com raios ultra violeta em fundo escuro, o *T. gondii* encontra-se impregnado de uma fluorescência cuja intensidade depende da quantidade de anticorpos disponíveis no soro testado (REY, 1991; CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

#### 2.9.3.5. Método de Enzimaimunoensaio (ELISA).

O princípio de funcionamento das técnicas imunoenzimáticas é semelhante ao da técnica de imunofluorescência. Partindo de uma reação antígeno-anticorpo, o complexo é revelado por um conjugado. O conjugado é representado por imunoglobulinas ligadas a uma enzima, que na presença de um substrato revela uma reação colorida nos soros que possuem os anticorpos pesquisados (CALAMEL

& DUFOUR, 1985; MINOZZO, 1997). O método apresenta algumas vantagens em relação a imunofluorescência, principalmente quando grandes quantidades de amostras de soros são analisadas, pela objetividade, rapidez e automação (MINOZZO, 1997). As desvantagens do método são a sua maior complexidade e os problemas referentes à purificação e padronização dos vários componentes (FRENKEL, 1997).

O método de ELISA ainda não é usado rotineiramente, apenas alguns laboratórios humanos e centros de pesquisa realizam o método para diagnóstico da toxoplasmose. Para o diagnóstico da toxoplasmose em cães, este método não é usado, pois a metodologia ainda está sendo adaptada para o diagnóstico na espécie canina.

### **3.MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1.POPULAÇÕES DE CÃES ESTUDADAS.**

Três populações de cães foram selecionadas para este estudo. Uma primeira população, foi escolhida com a finalidade de obter soros para a padronização do método de Enzimaimunoensaio (ELISA) para o imunodiagnóstico da toxoplasmose em cães. A segunda população, foi constituída de cães provenientes do município de Canoinhas, SC e usada para a determinação da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* nesta cidade. A terceira população, foi constituída de cães provenientes de Curitiba, PR e usada para verificar como se encontra o perfil sorológico dos cães com respeito a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*.

#### **3.1.1.População de cães usada para a Padronização do Método de Enzimaimunoensaio.**

Para a padronização do método de Enzimaimunoensaio (ELISA), foram analisados soros de 389 cães aparentemente saudáveis e escolhidos aleatoriamente. Os cães eram provenientes dos municípios de Curitiba, Paraná (n=231) e Canoinhas, Santa Catarina (n=158).

Para a coleta das amostras, os cães eram contidos com mordança e o sangue era obtido por venopunção jugular ou cefálica de aproximadamente cinco mL. Em seguida, o sangue era deixado em banho maria a 37° C por três a quatro horas. O soro era então recuperado e submetido a uma centrifugação de 900 giros (g), durante cinco minutos. A seguir as amostras de soro eram acondicionadas em tubos para microcentrífuga, identificadas e armazenadas a -20° C até a sua utilização. Os soros controle positivos e negativos usados na padronização, foram cedidos pelo Laboratório de Protozoologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina – PR.

### **3.1.2. Populações de cães usadas para a determinação da soroprevalência de anticorpos IgG anti – *Toxoplasma gondii*.**

#### **3.1.2.1. População de Cães de Canoinhas, Santa Catarina.**

Para a determinação da prevalência de anticorpos IgG anti – *T. gondii* no soro de cães de Canoinhas, Santa Catarina, foram analisados 158 soros, obtidos conforme descrito no ÍTEM 3.1.1.

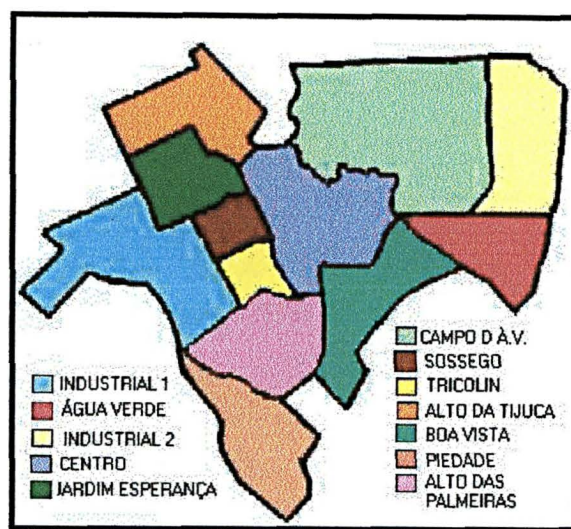
Os animais usados eram de proprietários particulares porque a cidade não possui Canil Municipal. Os proprietários dos cães foram selecionados ao acaso, de modo que animais de todos os bairros e do centro da cidade, estivessem incluídos na pesquisa (ANEXO 2). Aos proprietários dos cães, foi solicitado que assinassem uma autorização, permitindo a coleta de sangue de seu animal. Nesta autorização (ANEXO 1) constavam os dados do proprietário; o nome, endereço; e ainda dados de identificação do animal, como raça, sexo, idade e nome.

#### **3.1.2.2. Município de Canoinhas.**

O município de Canoinhas, Santa Catarina, possui área de 1.143 Km<sup>2</sup> e está situado no vale do rio Canoinhas a uma latitude de 26°10'38" Sul, longitude de 50°23'24" Oeste de Greenwich e altitude de 765 metros (FIGURA 8).

A população do município é de 51.616 habitantes (IBGE, 2000), dos quais em percentuais, 72,6% vivem na cidade e 27,4% nas áreas rurais. A taxa de crescimento anual é de 1,16. A média de moradores é de 3,95 por domicílio. Na área urbana, que compreende 25,86 Km<sup>2</sup>, estão os bairros que formam o município. Os bairros do município e os locais selecionados para a coleta do sangue dos cães são observados no ANEXO 2. Na classificação dos 293 municípios catarinenses, através do "Índice de Desenvolvimento dos Municípios" (IDS), Canoinhas ocupa a 82ª posição, atingindo o índice médio na condição de eficiência desse estudo.

**FIGURA 8-** MAPA DO MUNICÍPIO DE CANOINHAS, SANTA CATARINA COM DELIMITAÇÃO DOS BAIRROS



FONTE: Prefeitura Municipal de Canoinhas

### **3.1.2.3. População de Cães de Curitiba, Paraná.**

Para a determinação da prevalência de anticorpos anti – *T. gondii* foram analisados soros de 513 cães provenientes do canil municipal de Curitiba, Paraná. O sangue dos cães foi obtido conforme descrito no ÍTEM 3.1.1.

Por se tratarem de cães recolhidos pela prefeitura, dados sobre idade e raça não puderam ser obtidos com precisão. Quanto à idade, os animais foram então classificados em dois grupos: animais jovens e animais adultos. Quanto à raça, a totalidade dos animais era sem raça definida.

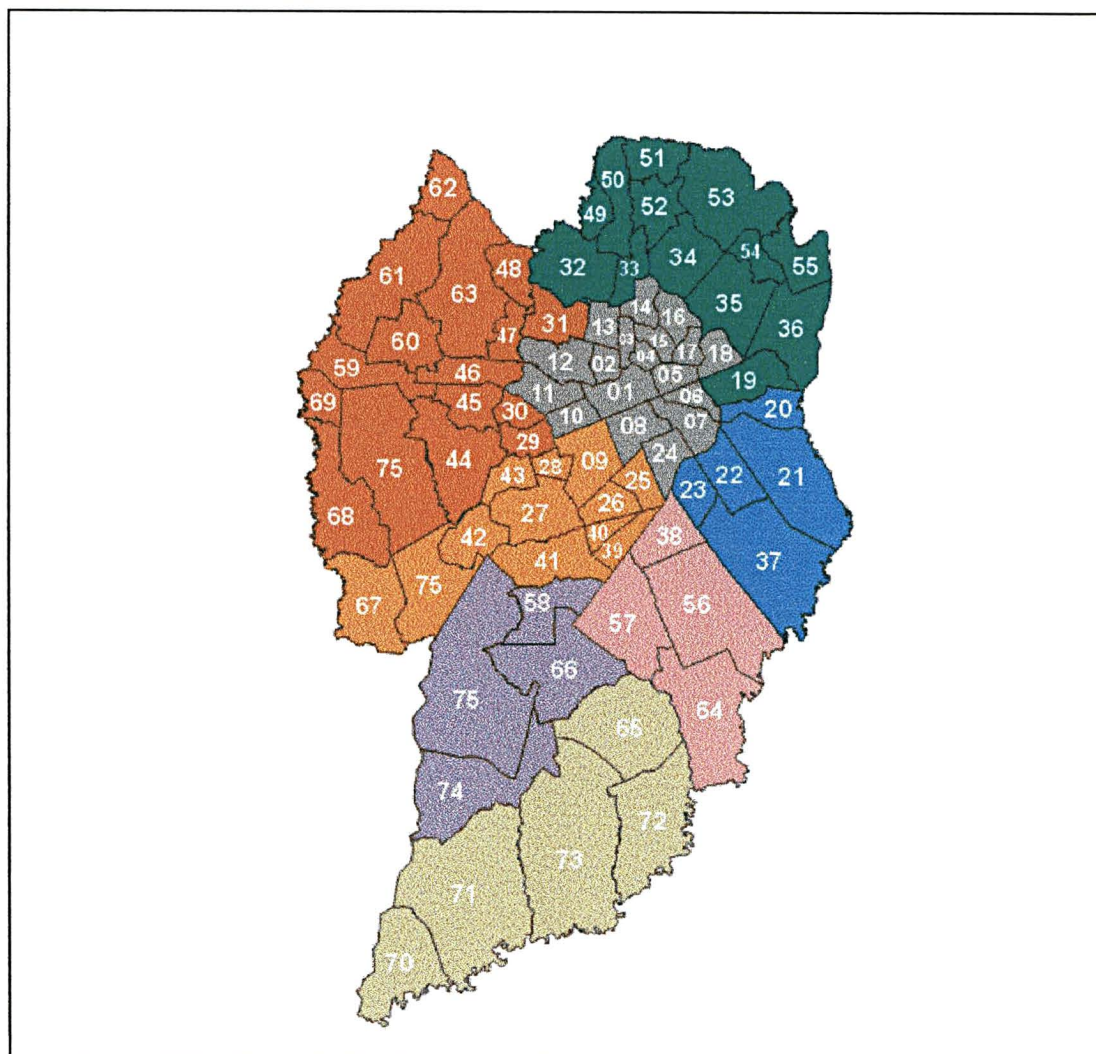
### **3.1.2.4. Município de Curitiba.**

O município de Curitiba, Paraná, possui área de 436,4954 Km<sup>2</sup> e está localizado no Sul do Brasil a uma latitude de 25°25'40" Sul, longitude de 49°16'23" Oeste de Greenwich e altitude de 908 metros.

A população do município é de 1.586.898 habitantes (IBGE, 2000), dos quais a totalidade reside em áreas consideradas urbanas. A taxa de crescimento anual é de 1,82. O município de Curitiba é formado por 75 bairros (FIGURA 9) (ANEXOS 3 e 15). As amostras de sangue coletadas dos cães do Canil Municipal, são provavelmente de cães provenientes de todos os bairros que formam o município.



**FIGURA 9-MAPA DO MUNICÍPIO DE CURITIBA, PARANÁ COM DELIMITAÇÃO DOS 75 BAIROS.**



FONTE: Prefeitura Municipal de Curitiba.

### **3.2.PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS PARA OS MÉTODOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO.**

#### **3.2.1.Cepa de *Toxoplasma gondii*.**

O antígeno foi produzido a partir da cepa RH padrão de *T. gondii*, cepa cedida pelo Laboratório de Protozoologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, PR.

### **3.2.2. Manutenção da cepa de *Toxoplasma gondii*.**

A manutenção da cepa foi realizada através de sucessivas passagens intraperitoneais em camundongos *Swiss webster (Mus musculus)* fêmeas de 40 dias de idade, obtidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

A coleta de líquido intraperitoneal contendo os taquizoítos, foi realizada através de lavagem da cavidade peritoneal com soro fisiológico, a cada dois dias, sendo que, parte do líquido intraperitoneal obtido foi usado para manutenção do cultivo, através da inoculação intraperitoneal de 0,5 mL em outros seis camundongos com as mesmas características. A outra parte deste líquido intraperitoneal foi usada para a produção de antígeno (FIGURA 10). A suspensão de taquizoítos, obtida do cultivo *in vivo*, foi inicialmente passada através de uma agulha hipodérmica (10x15) para a ruptura dos macrófagos e liberação dos taquizoítos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada, por três vezes para a retirada de hemácias, núcleo de macrófagos e macrófagos inteiros. A primeira centrifugação foi realizada a 40 g por dez minutos em temperatura de 4-8 ° C, recuperando-se o sobrenadante, que foi submetido a mais duas centrifugações de 700 g por dez minutos a 4-8 ° C para lavagem do antígeno. O sedimento foi ressuspenso em 0,5 mL de tampão fosfato (PBS) estéril (pH 7,2) (ANEXO 6).

Esta suspensão foi usada no preparo do antígeno íntegro para Imunofluorescência Indireta (ÍTEM 3.3.3) e no preparo de antígeno solúvel para o método de Enzimaimunoensaio Indireto (ÍTEM 3.3.4).

### **3.2.3. Produção do antígeno de *Toxoplasma gondii* para o Método de Imunofluorescência Indireta.**

Para a padronização e posterior utilização do antígeno de *T. gondii*, no método de Imunofluorescência Indireta (IFI), taquizoítos íntegros foram contados em câmara de Thoma, seguida de diluições em PBS (pH 7,2) estéril, e posteriormente em formalina a 2%. O antígeno foi submetido a diluições até que fosse obtida a concentração padrão de taquizoítos por campo da área circunscrita da lâmina ou *spot* (CML/France) (ANEXO 4).

**FIGURA 10** – LÍQUIDO COM TAQUIZOÍTOS, OBTIDO DO LAVADO INTRAPERITONEAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii*.



Fotomicrografia de taquizoítos à fresco (400x).

FONTE: Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFPR.

#### **3.2.4. Produção do antígeno de *Toxoplasma gondii* para o Método de Enzimaimunoensaio Indireto.**

Para a produção de antígeno para o teste de Enzimaimunoensaio, a suspensão de taquizoítos (ÍTEM 3.3.2), foi submetida a 11 ciclos de congelamento (em nitrogênio líquido) e descongelamento (em banho maria a 37° C). Após este processo, a suspensão foi submetida a ruptura, para a obtenção do antígeno solúvel, por meio de ultra-som (20 KHZ-1mA), utilizando 80 ciclos por minuto e efetuando cinco séries de 30 segundos com intervalos de um minuto. A suspensão foi mantida durante todo o processo em banho de gelo. Este procedimento foi repetido até que não se obtivessem parasitas íntegros na visualização em microscopia ótica no aumento de 400 vezes. A suspensão foi então passada através de um filtro bacteriano (0,22 µm de diâmetro/MILIPORE®) e a seguir centrifugada a 3900 g a 4° C por 30 minutos, sendo então recuperado o sobrenadante, que foi utilizado como antígeno solúvel. O antígeno solúvel após alíquotado em tubos para microcentrífuga, foi armazenado a -20° C até sua utilização.

A dosagem protéica do antígeno seguiu o método de LOWRY *et al.* (1951) (ANEXO 5). O objetivo deste método, é o de obter uma curva padrão com cinco pontos de concentração de uma proteína pura conhecida: 20µg, 40µg, 60µg, 80µg e 100µg diluídos em 500µL de solução. A proteína conhecida utilizada foi a Soro Albumina Bovina. A partir dos valores de densidade ópticas obtidos com as

concentrações protéicas conhecidas, foram desenvolvidas, uma reta e uma equação da curva padrão obtida. Com estes pontos de concentração protéica conhecidos, pode-se calcular a concentração protéica da amostra de antígeno.

### **3.3.MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G ANTI-*Toxoplasma gondii*.**

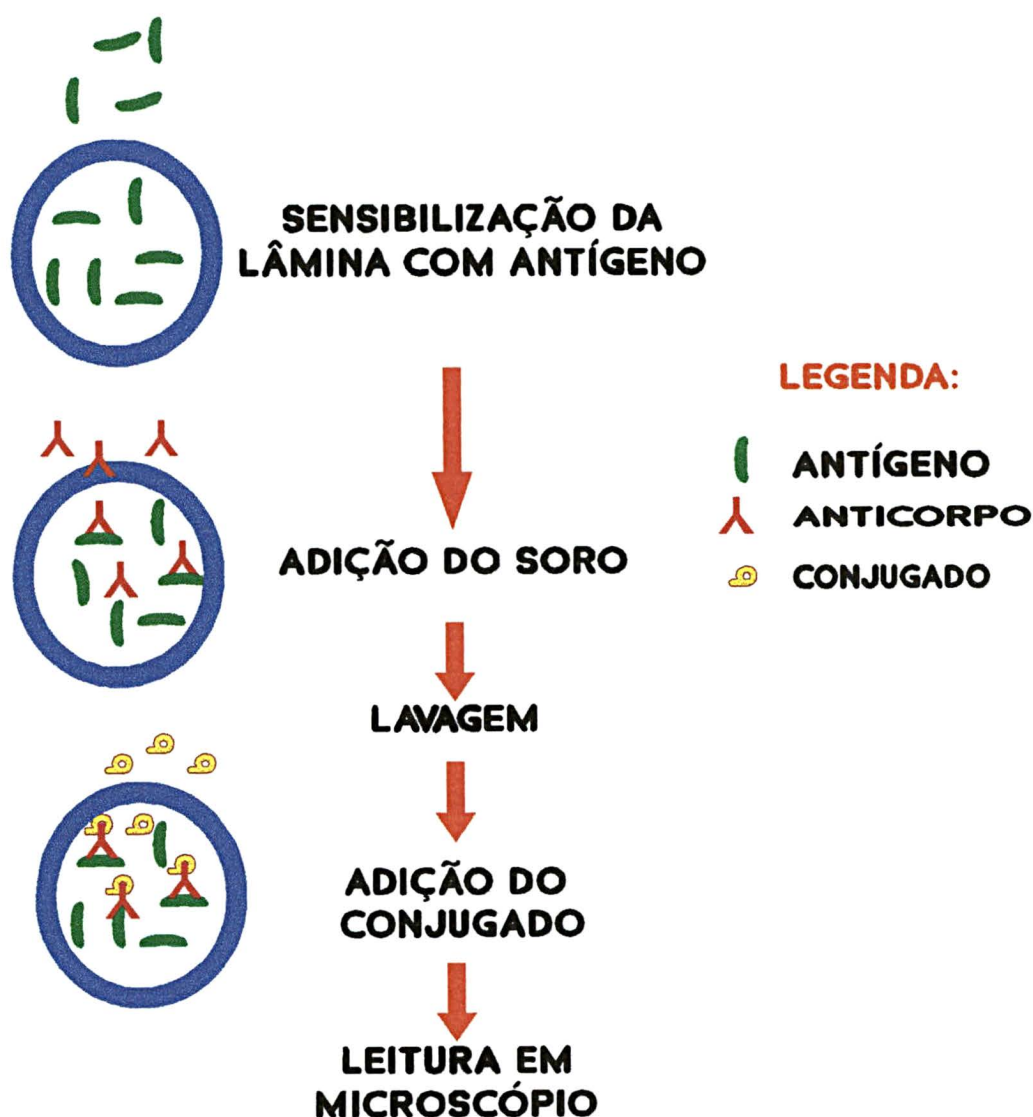
A finalidade do método de Imunofluorescência Indireta, é a fixação dos anticorpos aos antígenos de membrana dos taquizoítos íntegros. A visualização desta reação, é obtida através da adição de um conjugado fluorescente. Em microscopia com raios ultra violeta em fundo escuro, o *T. gondii* encontra-se impregnado de uma fluorescência cuja intensidade depende da quantidade de anticorpos disponíveis no soro analisado. A reação de Imunofluorescência Indireta foi desenvolvida de acordo com o método descrito por CAMARGO em 1964, com algumas modificações (GRÁFICO 1).

Para a padronização do método de Imunofluorescência Indireta, lâminas fixadas com quantidade padrão do antígeno, foram submetidas a várias diluições de conjugado (1/20; 1/40; 1/80 e 1/160), contra várias diluições dos soros controles positivo e negativo (1/20; 1/40; 1/80, 1/160 e 1/320). A diluição escolhida do conjugado, foi a que forneceu o título esperado para o soro padrão positivo utilizado.

Sucessivas diluições de cada soro a ser analisado (1/20; 1/40; 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560...) eram adicionadas nos *spots* das lâminas. A cada *spot* eram adicionados 20 µL de cada diluição do soro. As lâminas eram colocadas em câmara úmida e incubadas a 37° C por 30 minutos. Após eram lavadas, primeiro por imersão em Tampão Bicarbonato Fosfato (PBS) estéril (pH 7,2)(ANEXO 6), por dez minutos, e a seguir com água destilada. Após secagem da lâmina, a cada *spot* eram adicionados 20 µL de conjugado anti-cão IgG (BIOMANGUINHOS/FIO CRUZ) marcado com isotiocianato de fluoresceína, diluído em PBS contendo 1% de Azul de Evans. As lâminas, após colocadas em câmara úmida e incubadas por 30 minutos a 37° C, eram novamente lavadas em PBS por dez minutos, e a seguir com água destilada. Após a montagem das lâminas com glicerina tamponada e lamínula, procedia-se a leitura. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz ultravioleta

(AXIOPHOT – Zess, Alemanha) utilizando o aumento de 400 vezes. A maior diluição do soro, na qual 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. A cada lâmina, eram acrescentados soros controles positivo e negativo e um controle do conjugado, para serem usados como controles da reação e guias para a leitura.

**GRÁFICO 1 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS SEGUIDAS PARA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA**



### **3.4.MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G ANTI-*Toxoplasma gondii*.**

O teste de Enzimaimunoensaio é um método quantitativo, em que a reação antígeno-anticorpo é monitorada por medida da atividade de um enzima (CANTOS *et al.*, 2000). O princípio do método é uma reação de cor. A coloração faz-se presente quando a enzima peroxidase, integrante do conjugado, desdobra um substrato, neste trabalho, o ortofenilenodiamino (OPD). A coloração desenvolvida será tanto mais intensa quanto maior for a quantidade de anticorpos específicos existentes no soro que está sendo testado (FIGURA 11). A reação é desenvolvida em placas de poliestireno contendo séries de pocinhos onde os antígenos são adsorvidos. Uma única diluição do soro a ser analisado é incubada com o antígeno fixado no pocinho. Depois de uma lavagem, um conjugado anti-IgG ou anti-IgM acoplado a uma enzima é também adicionado. Para que haja manifestação de cor, é necessário que ocorram uma série de eventos em seqüência. Estes eventos tem início com a sensibilização da placa com o antígeno e seguem até a aferição da cor pelo leitor de placas (GRÁFICO 2 e ÍTEM 3.4.1).

#### **3.4.1.Etapas realizadas para a Padronização do Método de Enzimaimunoensaio Indireto.**

##### **✓ Sensibilização da placa para realização do Enzimaimunoensaio Indireto.**

Sensibilização é o processo de fixação do antígeno na placa. O volume de antígeno a ser usado, varia de acordo com a concentração proteica do mesmo.

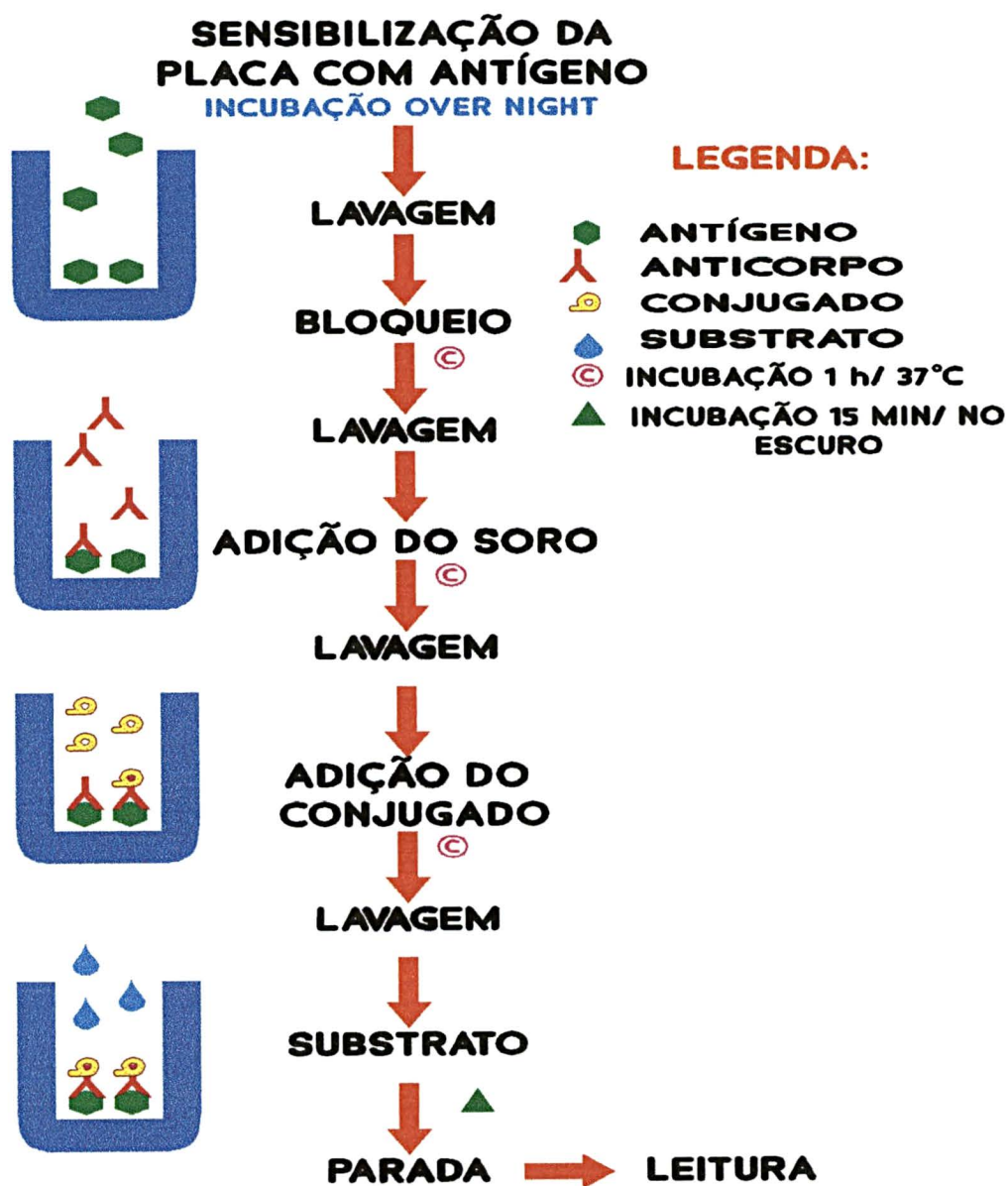
Para a padronização da concentração proteica de antígeno de *T. gondii* a ser usada, este foi avaliado em três concentrações (150, 300 e 450 ng de proteína do antígeno por pocinho) para que fosse estabelecida a concentração mais adequada para o desenvolvimento do Enzimaimunoensaio Indireto. Foram testados soros controles positivos e negativos frente as três concentrações (ROGAN, 1997). Para obter a concentração proteica desejada, o antígeno foi diluído em solução de *Coating buffer* (ANEXO 7). A solução antigênica foi adicionada a cada pocinho

(100 $\mu$ L da solução de antígeno) exceto na primeira coluna da placa, pois a mesma foi usada para zerar o leitor de Placas.

Após a distribuição da solução antigênica as placas eram armazenadas em geladeira *over night*. Nesta e nas etapas seguintes as placas foram protegidas durante os períodos de incubação por uma tampa plástica.

Foram usadas placas de poliestireno (Nunclon®, cat nº 167008), de fundo plano, constituídas de 96 pocinhos (12 colunas com oito pocinhos cada).

GRÁFICO 2 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS SEGUIDAS PARA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO



**✓ Primeira lavagem.**

Após o período de incubação a placa era lavada com o objetivo de remover o antígeno que não se fixou ao fundo da placa.

As placas foram lavadas com solução de lavagem (0,05% Tween-salina)(ANEXO 7). Os pocinhos eram completamente preenchidos com esta solução e em seguida o conteúdo era removido. Esta fase era repetida duas vezes.

**✓ Bloqueio da placa.**

A utilização de uma solução de bloqueio, tem a finalidade de preencher com proteína, os espaços nos pocinhos, não ocupados pelo antígeno, durante o processo de sensibilização da placa.

As placas foram bloqueadas com 100 $\mu$ L de solução de bloqueio (Caseína 2%) (ANEXO 7) por pocinho e, em seguida incubadas a 37°C por 60 minutos.

**✓ Segunda lavagem.**

O objetivo da segunda lavagem, foi de remover proteínas da solução de bloqueio que não se fixaram nas placas. O procedimento era semelhante ao da primeira lavagem.

**✓ Diluição dos soros.**

A finalidade desta etapa, foi de promover a ligação do antígeno fixado nas placas, com os anticorpos específicos para *T. gondii* presentes no soro dos animais portadores de título.

Os soros obtidos dos cães foram diluídos em tampão de incubação (ANEXO 7), e usados como fonte de primeiro anticorpo. Os soros foram analisados diluídos na proporção de 1/200, 1/400 e 1/600 vezes buscando estabelecer a melhor diluição a ser usada nas análises.

A cada pocinho foram adicionados 100  $\mu$ L do soro diluído. Com a finalidade de diminuir erros de diluição e pipetagem as amostras foram analisadas sempre em duplicata. Na primeira coluna das placas, não eram adicionados soros, pois as mesmas foram usadas para fazer o branco do leitor de placas. Depois de



distribuídos os soros nas placas, estas foram incubadas por 60 minutos a 37° C em estufa.

#### ✓Terceira lavagem.

A terceira lavagem é um processo mais rigoroso que as lavagens anteriores. Por esta razão, ela foi realizada por seis vezes. O objetivo era de remover anticorpos que não se ligaram ao antígeno fixado nas placas, remover anticorpos que não são específicos para *T. gondii* e também remover outras substâncias presentes no soro. Se estas substâncias não forem removidas adequadamente, poderão alterar significativamente o resultado do teste.

#### ✓Diluição do conjugado.

O conjugado é o segundo anticorpo adicionado nas placas, e ele consiste de imunoglobulinas heterólogas anti – IgG de cão, conjugadas com a enzima peroxidase. O conjugado usado foi produzido em ovinos, pela Fundação Ezequiel Diaz e gentilmente cedido pelo Dr. Carlos Chávez Olortégui.

De forma semelhante ao soro, o conjugado foi diluído em tampão de incubação nas diluições de 1/1000, 1/2000 e 1/3000 vezes. Foi adicionado na quantidade de 100 µL por pocinho das placas. Após, a placa foi incubada por 60 minutos a 37° C em estufa.

#### ✓Quarta lavagem.

Esta lavagem tem a finalidade de remover todo conjugado, que não estiver ligado a moléculas de anticorpos nos pocinhos das placas de Enzimaimunoensaio. Esta operação era realizada por seis vezes.

#### ✓Adição do substrato.

A atividade da enzima peroxidase, é revelada através da adição de um substrato. O substrato usado foi o Ortofenilenodiamino (OPD). É nesta substância que a enzima vai atuar resultando no desenvolvimento de cor. O catalisador utilizado para esta reação foi o peróxido de hidrogênio e o veículo foi o tampão citrato.

A solução de substrato (ANEXO 7) foi adicionada na quantidade de 100  $\mu$ L por pocinho das placas. Em seguida, as placa foram mantidas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos, para a revelação.

#### ✓ **Parada da reação.**

Para que a atividade enzimática fosse uniforme, após os 15 minutos de revelação, a reação era interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico a 5% por pocinho (ANEXO 7). Desta forma, a enzima peroxidase era desnaturada deixando de agir sobre o substrato, podendo ser realizada a leitura.

#### ✓ **Leitura.**

A leitura das placas foi realizada com comprimento de onda de 492 nm em um leitor de placas BIO – RAD<sup>®</sup>, modelo 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 o estabelecimento de um limiar de reatividade dos soros, ao qual se denomina **PONTO DE CORTE** ou **CUT-OFF**. Abaixo deste limite estão os valores que são considerados negativos e acima dele os valores tomados como positivos (GUIMARÃES *et al.*, 1987).

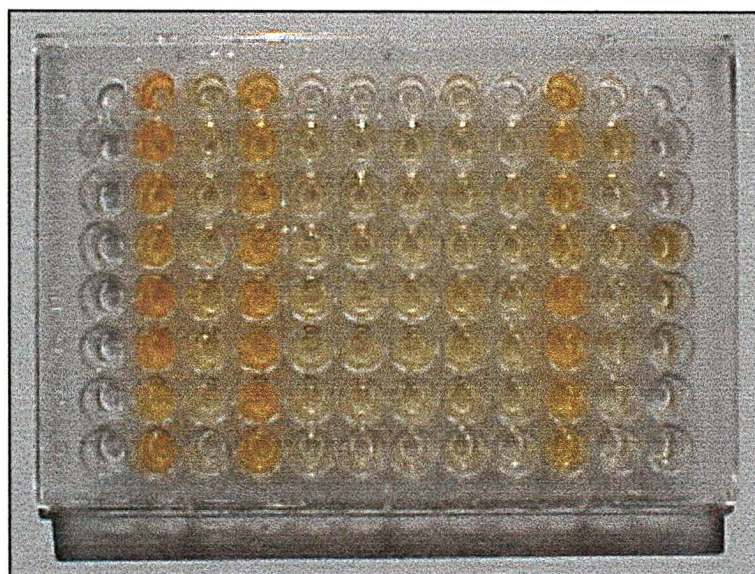
A escolha do ponto de corte ou *cut-off*, situação de discriminar doentes de sadios, deve depender dos objetivos a que o método se destina. Quando se deseja identificar todos os indivíduos portadores dos anticorpos pesquisados, usa-se um *cut-off* com sensibilidade máxima e especificidade reduzida, ciente neste caso da existência de falsos positivos. Quando o objetivo for o diagnóstico clínico, o *cut-off* deve ter especificidade máxima, mesmo que para isto tenha sensibilidade reduzida.

O estabelecimento do *cut-off*, foi realizado a partir da análise dos soros controle negativos (n=2) e de soros de cães provenientes de Canoinhas. Os soros de cães de Canoinhas (n=30), foram previamente testados pelo método de Imunofluorescência Indireta e considerados não reagentes ao antígeno de *T. gondii*. Os soros controle positivos (n=2) foram adicionados a placa de estabelecimento do *cut-off*, e os mesmos soros controle positivos foram adicionados a todas as placas

realizadas, com o objetivo de avaliar a variação entre as placas, através da observação do valor de densidade ótica dos mesmos (MINOZZO, 1997).

O valor do *cut-off* correspondeu a soma da média das densidades óticas dos soros controles negativos (n=32), mais duas vezes o desvio padrão da média (MINOZZO, 1997; SILVA *et al.*, 1997).

**FIGURA 11 – PLACA DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO.**



FONTE: Presente Trabalho.

### **3.5.MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G ANTI-*Leishmania* spp.**

Para minimizar a possibilidade de reações cruzadas, os 158 soros de cães de Canoinhas usados na padronização do Enzimaimunoensaio, foram também submetidos ao método de Imunofluorescência Indireta frente ao antígeno de *Leishmania* spp.

O procedimento técnico, foi realizado com a utilização do antígeno e conjugado do kit de Imunofluorescência Indireta para diagnóstico da Leishmaniose canina do BIO-MANGUINHOS/FIO CRUZ®.

Lâminas foram preparadas com a adição de 20µL de antígeno. Após a fixação dos parasitas por duas horas à 37° C; o conjugado foi analisado nas diluições de (1/20; 1/40; 1/80 e 1/160), contra várias diluições dos soros controles positivo e

negativo (1/20; 1/40; 1/80 e 1/160). Os soros controles positivos e negativos usados nas reações, foram cedidos pelo Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFPR.

Para o procedimento técnico, sucessivas diluições do soro a ser analisado (1/20; 1/40; 1/80) eram adicionadas nos *spots* das lâminas. A cada *spot* eram adicionados 20  $\mu$ L de cada diluição do soro. As lâminas eram colocadas em câmara úmida e incubadas a 37° C por 30 minutos. Após as lâminas eram lavadas, primeiro por imersão em PBS estéril (pH 7,2) (ANEXO 6), três vezes de cinco minutos cada, e a seguir com água destilada. Após secagem da lâmina, eram adicionados a cada *spot* 20  $\mu$ L de conjugado anti-cão IgG (BIOMANGUINHOS/FIO CRUZ) marcado com isotiocianato de fluoresceína, diluído em PBS contendo azul de Evans (ANEXO 6). As lâminas, após colocadas em câmara úmida e incubadas por 30 minutos a 37° C, eram novamente lavadas em PBS por três vezes de cinco minutos cada, e a seguir com água destilada. Após a montagem das lâminas com glicerina tamponada e lamínula, procedia-se a leitura.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz ultravioleta (AXIOPHOT – Zess, Germany) usando o aumento de 400 vezes. A maior diluição do soro, na qual fluorescência era detectada, em toda a periferia do parasita, 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.

O critério seguido para a determinação de uma amostra positiva, era a presença de reação positiva em diluição igual ou superior a 1/40 (BIOMANGUINHOS/FIO CRUZ).

### **3.6.MÉTODO EPIDEMIOLÓGICO E ESTATÍSTICO.**

Os métodos de Enzimaimunoensaio Indireto e Imunofluorescência Indireta foram comparados com a finalidade de avaliação dos índices de Copositividade (CP), Conegatividade (CN), Valor de Predição de Positividade (VPP), Valor de Predição de Negatividade (VPN), Classificação correta e Classificação incorreta.

Estes índices foram obtidos através da padronização do método de

Enzimaimunoensaio indireto, seguindo as normas propostas por GUIMARÃES *et al.* (1987) e PEREIRA (1995).

Para estas avaliações foram comparados os resultados de IFI e Enzimaimunoensaio indireto das análises de 389 soros de cães provenientes de Canoinhas, Santa Catarina e Curitiba, Paraná.

Para o cálculo dos indicadores de sensibilidade e especificidade do método padronizado, o diagnóstico de certeza deveria ser baseado no isolamento do parasita. Entretanto, o diagnóstico parasitológico não é realizado com facilidade, por necessitar de laboratórios e técnicos especializados, apresentar demora na obtenção de resultados (isolamento), e necessita de comprovação da identidade do isolado, através de metodologias de biologia molecular (UCHÔA *et al.*, 1999).

A tentativa de isolamento do parasita em 389 animais, demandaria um espaço de tempo que superaria àquele proposto pelo curso para a conclusão e defesa da monografia, além da dificuldade em sua realização. Optou-se, pela utilização do método sorológico que até o presente momento apresenta os melhores índices de sensibilidade e especificidade como indicativo de presença ou ausência de doença (GUIMARÃES *et al.*, 1987, UCHÔA *et al.*, 1999). Sendo assim, o método de Imunofluorescência Indireta foi considerado como padrão-ouro. O método de Imunofluorescência Indireta, em estudos epidemiológicos para diagnóstico de toxoplasmose em humanos, demonstrou uma sensibilidade de 83,8% e uma especificidade de 79,1% com um *cut-off* de 1:16 (UCHÔA *et al.*, 1999). Como o método não apresenta sensibilidade e especificidade de 100%, existe a possibilidade de análises falso positivas e falso negativas, mesmo com a comparação dos resultados por dois métodos sorológicos para o diagnóstico da presença ou ausência do parasita.

Os resultados das análises dos soros pelo método de IFI, foram comparados com aqueles obtidos no método de Enzimaimunoensaio indireto padronizado no presente trabalho, com o objetivo de avaliar a confiabilidade e veracidade dos resultados e concordância em relação ao método padrão.

Como o diagnóstico de positividade ou negatividade, foi estabelecido com base no resultado do método sorológico considerado padrão ouro para a toxoplasmose (Imunofluorescência Indireta), e não no isolamento do parasita, os

índices correspondentes aos valores de sensibilidade e especificidade foram denominados de copositividade e conegatividade respectivamente (GUIMARÃES *et al.*, 1987).

### **3.6.1. Indicadores Epidemiológicos observados para a Padronização do Método de Enzimaimunoensaio.**

Foram observados os seguintes indicadores epidemiológicos:

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| → Sensibilidade            | → Especificidade           |
| → Valor Preditivo Positivo | → Valor Preditivo Negativo |
| → Classificação Correta    | → Classificação Incorreta  |
| → Indicador Kappa          | → Índice de Correlação     |

Para o cálculo dos coeficientes, para a avaliação comparativa e epidemiológica dos testes diagnósticos, foram usadas fórmulas que seguiram o modelo da matriz para avaliação de um teste diagnóstico (PEREIRA, 1995).

#### **✓ Validade de um teste em relação a um padrão.**

A validade de um teste é expressa pelos valores de Sensibilidade e Especificidade. Estes indicadores, demonstram quanto, em termos quantitativos, um teste é útil para diagnosticar um evento.

A Sensibilidade, é a capacidade que o teste apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente doentes; e a Especificidade, é a capacidade do teste de diagnosticar corretamente os indivíduos sadios.

#### **✓ Indicadores globais de concordância.**

São expressos pela **classificação correta** e **classificação incorreta**. Eles servem para informar sobre o resultado geral da aplicação de um teste e sobre sua capacidade de refletir a real situação.

### ✓Valor preditivo ou diagnóstico do teste.

O Valor Preditivo Positivo, é a proporção de doentes entre os considerados positivos pelo teste. O Valor Preditivo Negativo, é a proporção de sadios entre os considerados negativos pelo teste.

Os índices de Sensibilidade e Especificidade são propriedades estáveis do teste, pois não mudam com alterações na prevalência da doença.

O Valor Preditivo Positivo, o Valor Preditivo Negativo e a concordância, são propriedades instáveis do teste, pois variam com a prevalência da doença.

O Valor Preditivo Positivo aumenta com a prevalência da doença, enquanto o Valor Preditivo Negativo diminui (GUIMARÃES *et al.*, 1997; PEREIRA, 1995).

**TABELA 1 - MATRIZ PARA CÁLCULO DE INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS**

TESTE	DOENTES	SADIOS	TOTAL
Positivo	Verdadeiro Positivo (a)	Falso Positivo (b)	a + b
Negativo	Falso Negativo (c)	Verdadeiro Negativo (d)	c + d
<b>TOTAL</b>	a + c	b + d	<b>N</b>

FONTE: PEREIRA, 1995.

Indicadores expressos em porcentagem.

N = número total de examinados	= a+b+c +d	Sensibilidade	= a / a + c
Especificidade	= d / b + d	Valor Preditivo Positivo	= a / a+ b
Valor Preditivo Negativo	= d / c + d	Classificação correta	= a + d / N
Classificação incorreta	= b + c / N		

### ✓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 1). Reflete a confiabilidade e reprodutibilidade do teste em questão.

#### CÁLCULO DO INDICADOR KAPPA (K) (PEREIRA, 1995)

$$1= K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

$$2= Po = \frac{a + d}{a+b+c+d}$$

$$3= Pe = \frac{\{ (a+b) (a+c) \} + \{ (c+d) (b+d) \}}{(a+b+c+d)^2}$$

Po= proporção de concordâncias observadas.  
Pe= proporção de concordâncias esperadas.

**QUADRO 1 – INTERPRETAÇÃO DO VALOR DE KAPPA.**

KAPPA	CONCORDÂNCIA
<0,00	Ruím
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

FONTE: PEREIRA, 1995.

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

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

⇒ Fórmula empregada para a correção da prevalência, quando usado um teste diagnóstico imperfeito.

$$P_c = \frac{P_o + E - 1}{S + E - 1}$$

FONTE: PEREIRA, 1995.

Onde:

P<sub>c</sub>= Prevalência corrigida

S= Sensibilidade

P<sub>o</sub>= Prevalência observada

E= Especificidade

Nas análises estatísticas que compararam sexo, raça e idade, foi usado o teste não-paramétrico do Qui-Quadrado com correção de Yates quando necessário, obtido através do programa estatístico MSTAT-C versão 2.1.

O índice de correlação (correspondência simples entre variáveis dicotômicas) entre os resultados obtidos nos métodos de Imunofluorescência indireta e Enzimaimunoensaio indireto, foi calculados através do programa estatístico MSTAT-C versão 2.1 de acordo com normas propostas por SAMPAIO (1998).



## **4.RESULTADOS**

## **4.1.PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.**

### **4.1.1.Padronização do antígeno.**

✓Número de parasitas por campo.

Após 25 lâminas teste, com diferentes números de taquizoítos por campo (15, 35, 55, 105 e 155), a quantidade padrão ficou estabelecida com base na qualidade das leituras das lâminas. A melhor leitura obtida foi com 155 parasitas por campo.

### **4.1.2.Padronização da diluição do conjugado.**

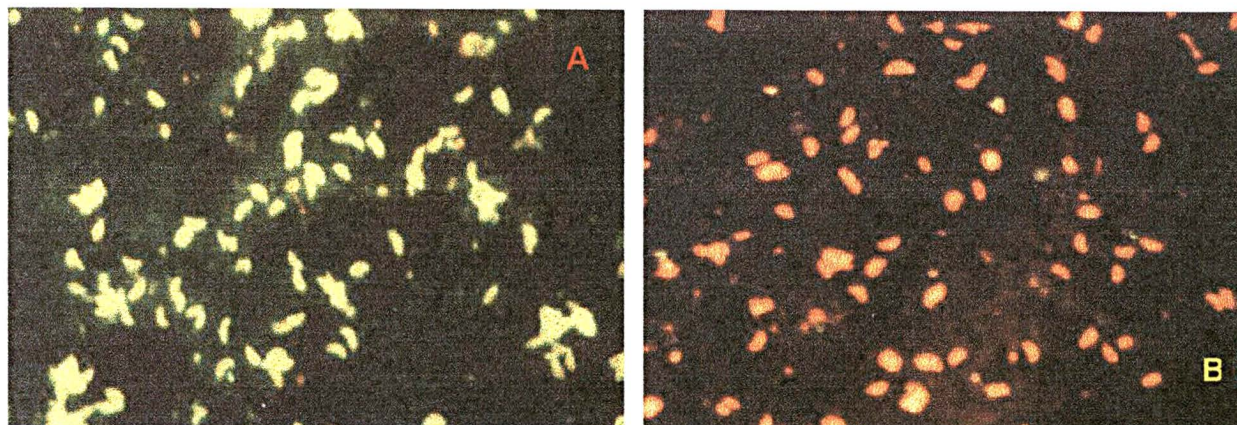
Uma melhor discriminação entre os soros controles positivos e negativos foi obtida com utilização de conjugado diluído 20 e 40 vezes. Como os resultados nestas duas diluições foram equivalentes, por questões econômicas a diluição de 1/40 do conjugado passou a ser usada.

### **4.1.3.Reatividade do soro para ser considerado positivo.**

O critério para a determinação de uma amostra positiva (FIGURA 12), foi a presença de reatividade em toda a periferia do parasita em diluição do soro igual ou superior a 1/40 (DOMINGUES *et al.*, 1998).

A partir da padronização do antígeno e da diluição do conjugado, os soros dos cães foram inicialmente analisados em três diluições: 1/20, 1/40 e 1/80. Quando o soro se mostrava reagente até a diluição de 1/80, o mesmo era submetido a 10 diluições para definir o título de anticorpos anti – *T. gondii*.

**FIGURA 12 – IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE.**



A = Resultado Positivo (400x)

FONTE: Presente Trabalho.

B = Resultado Negativo (400x)

## **4.2.PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO.**

### **4.2.1.Padronização do antígeno.**

A qualidade do antígeno preparado foi avaliada por um método químico e por um método imunológico. Para a análise química, foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de LOWRY *et al.* (1951) (ANEXO 5 e ÍTEM 4.2.1.1). O método imunológico foi realizado avaliando o comportamento do antígeno no método de Enzimaimunoensaio, através da titulação do antígeno para estabelecer sua reatividade ótima, frente aos soros controles positivos e negativos (GUIMARÃES *et al.*, 1997).

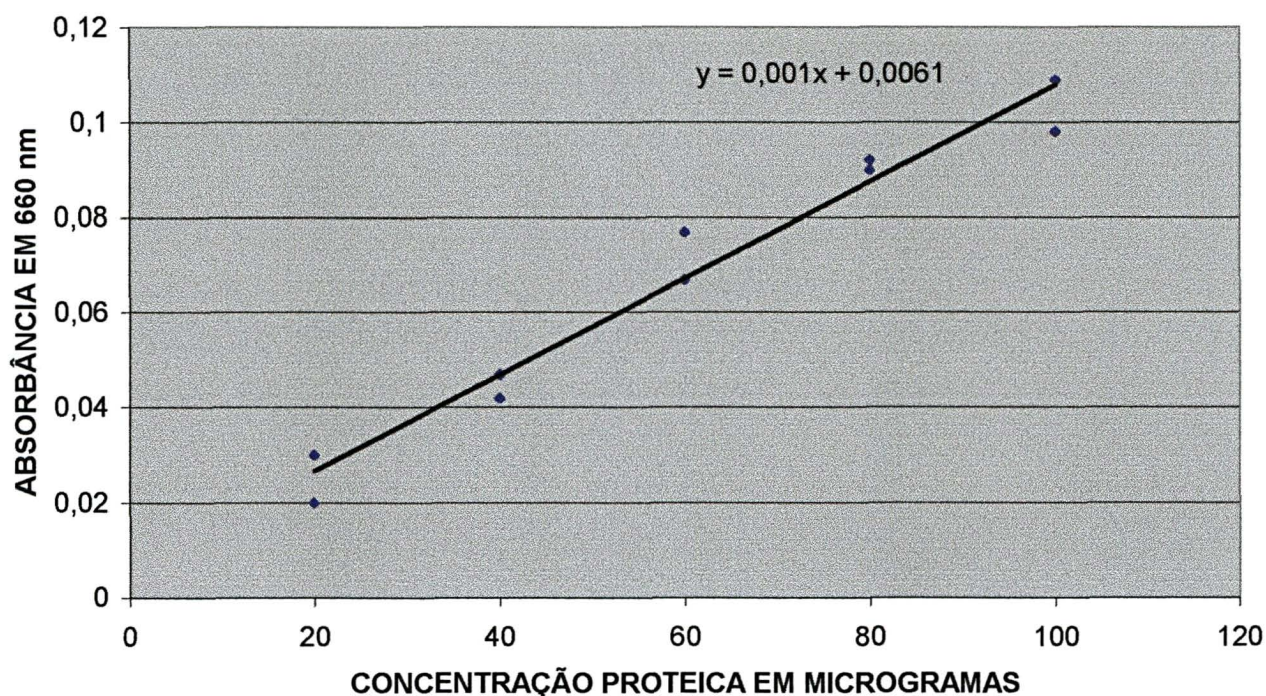
#### **4.2.1.1.Dosagem proteica do antígeno.**

Os resultados da dosagem proteica do antígeno produzido são apresentados na TABELA 2 e GRÁFICO 3.

**TABELA 2 – DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *Toxoplasma gondii*. CURITIBA, PARANÁ, 2001**

Tubo	Concentração Proteica (µg)	Padrão(µL) (0,2mg/mL)	H <sub>2</sub> O (µL)	Reagente A (mL)	Reagente B (mL)	Absorbância 660 nm
1	20	100	400	5	0,5	0,030
2	20	100	400	5	0,5	0,020
3	40	200	300	5	0,5	0,047
4	40	200	300	5	0,5	0,042
5	60	300	200	5	0,5	0,067
6	60	300	200	5	0,5	0,077
7	80	400	100	5	0,5	0,090
8	80	400	100	5	0,5	0,092
9	100	500	0	5	0,5	0,098
10	100	500	0	5	0,5	0,109
11	Branco	0	500	5	0,5	0,000
12	Amostra	50	450	5	0,5	0,060
13	Amostra	50	450	5	0,5	0,048

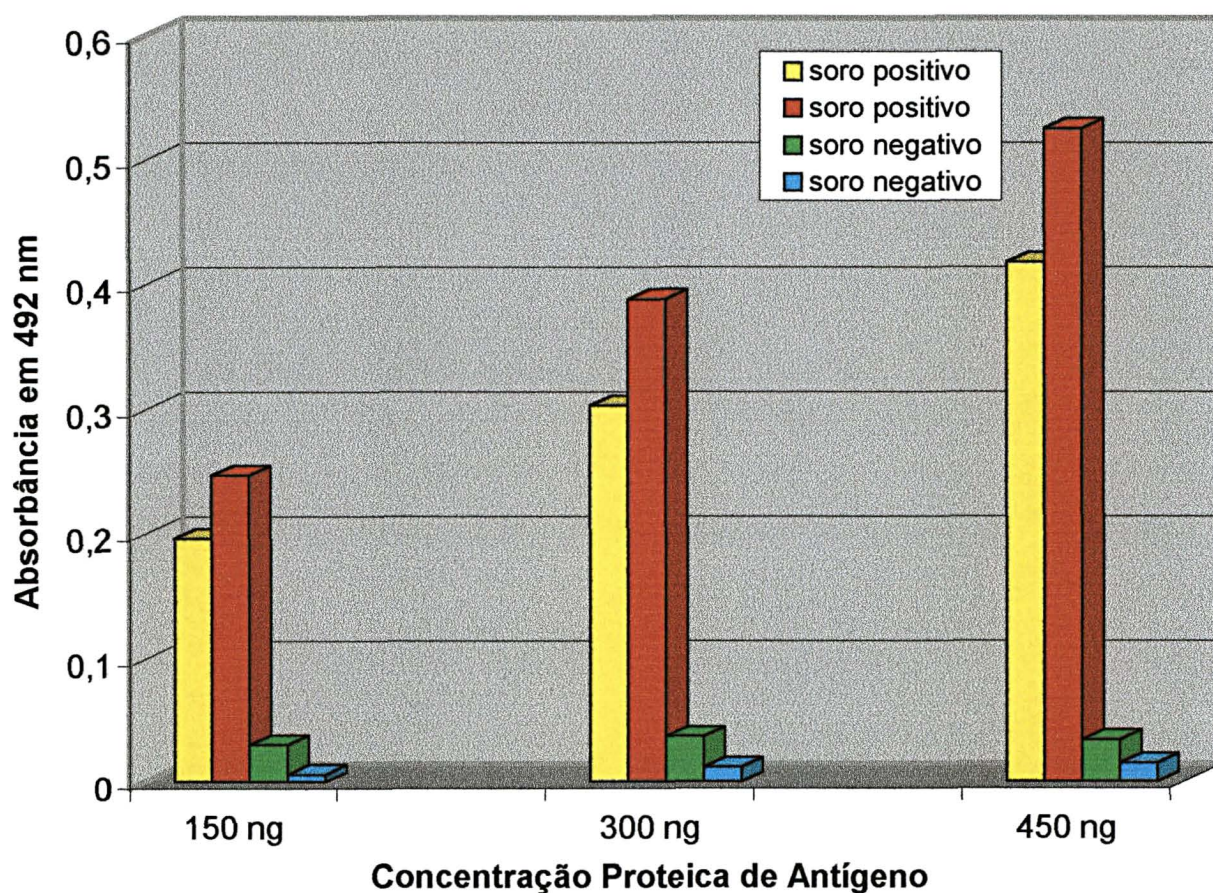
**GRÁFICO 3 – CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY *et al.*, 1951. CURITIBA, PARANÁ, 2001**



O antígeno produzido para a padronização do método de Enzaimunoensaio indireto e para a determinação da soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* apresentou 0,958 mg de proteína por mililitro.

A padronização do método de Enzaimunoensaio indireto, foi realizada através da avaliação dos soros controles positivos e negativos, frente a várias concentrações proteicas do antígeno produzido. Concentrações de antígeno de 150, 300 e 450 ng/pocinho foram avaliadas na presença de soros controle positivos e negativos diluídos 1/400 vezes e na presença de conjugado diluído 1/1000 vezes (GRÁFICO 4).

**GRÁFICO 4**—VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR POCINHO, COM CONJUGADO DILUÍDO 1:1000 E SORO DILUÍDO 1:400. CURITIBA, PARANÁ,2001

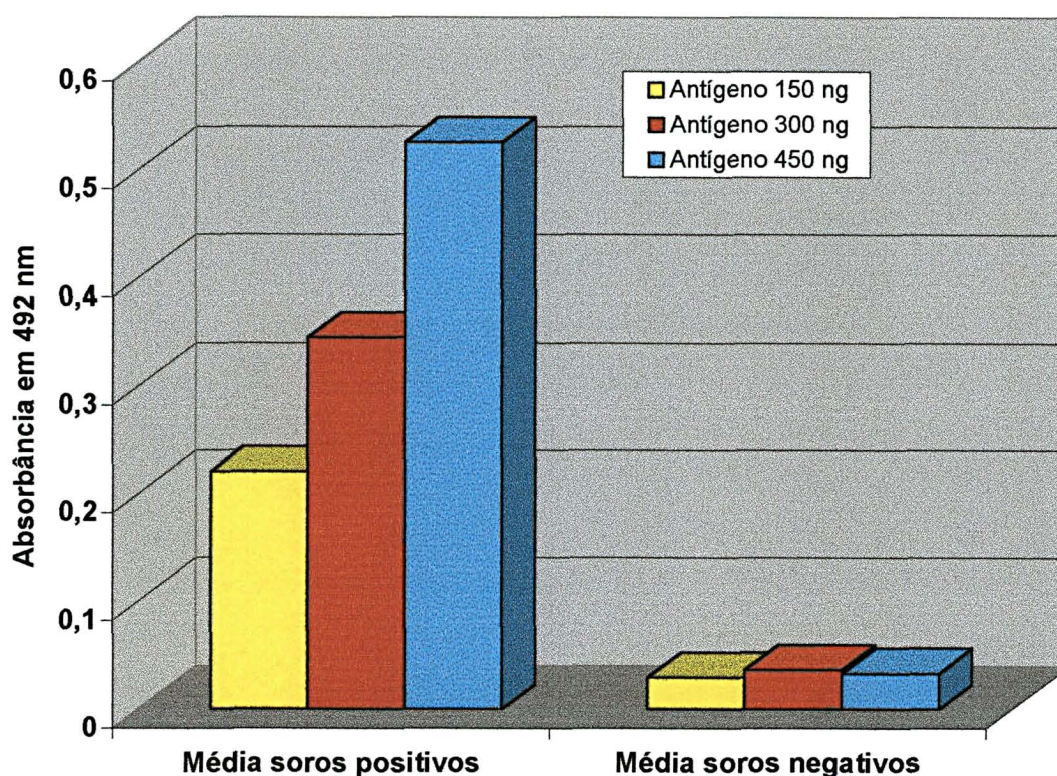


Nos ensaios realizados houveram diferenças significativas entre o valor de absorbância dos controles positivo e negativo, sendo que com 150 ng e 300ng de antígeno por pocinho, os valores de absorbância dos controles positivos eram muito baixos. Os melhores resultados foram obtidos com 450 ng de proteína por pocinho, onde as densidades ópticas dos controles positivos e negativos ficaram bem discriminadas.

#### 4.2.2. Padronização da diluição de conjugado.

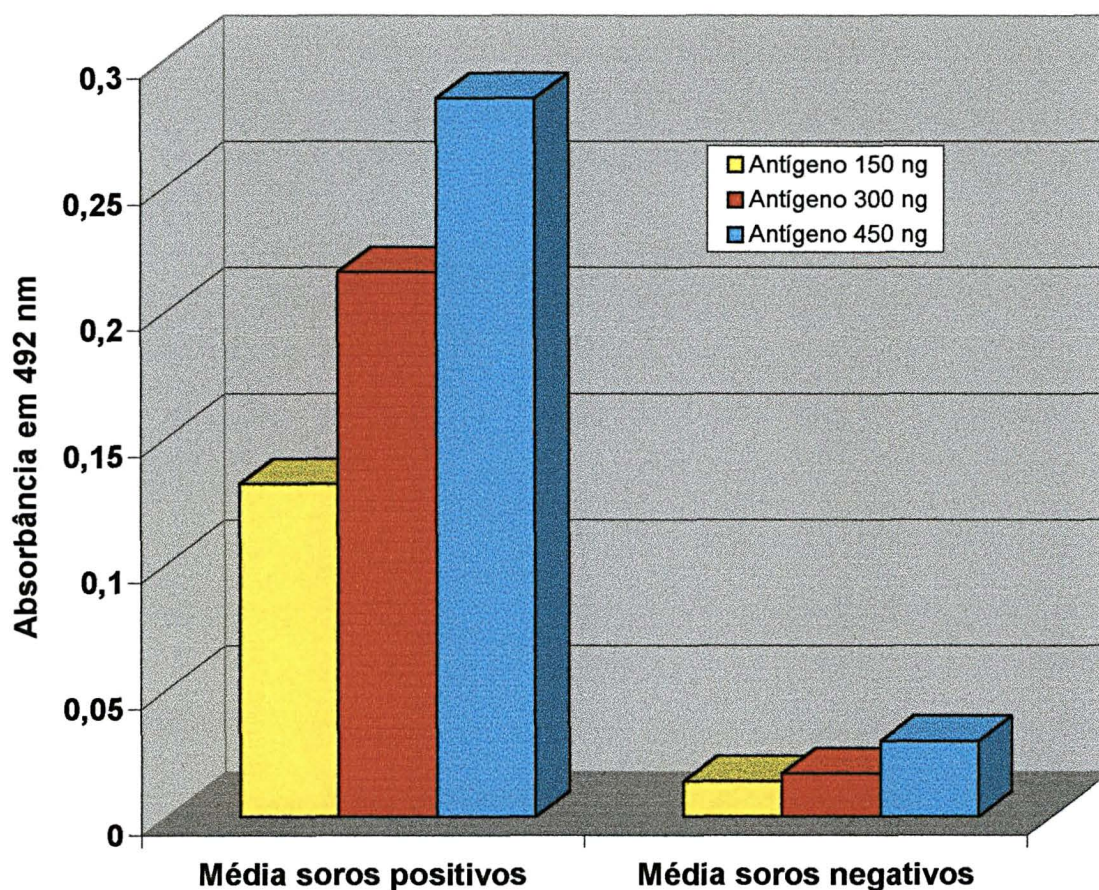
A padronização da diluição de conjugado a ser usada nas análises, foi realizada, através da avaliação do valor de densidade óptica dos soros controles positivos e negativos diluídos 1/400 vezes e com antígeno nas concentrações proteicas de 150, 300 e 450 ng/pocinho. Foram avaliadas as diluições de 1/1000, 1/2000 e 1/3000 (GRÁFICOS 5, 6 e 7).

**GRÁFICO 5**—VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR POCINHO, COM CONJUGADO DILUÍDO 1:1000 E SORO DILUÍDO 1:400. CURITIBA, PARANÁ, 2001

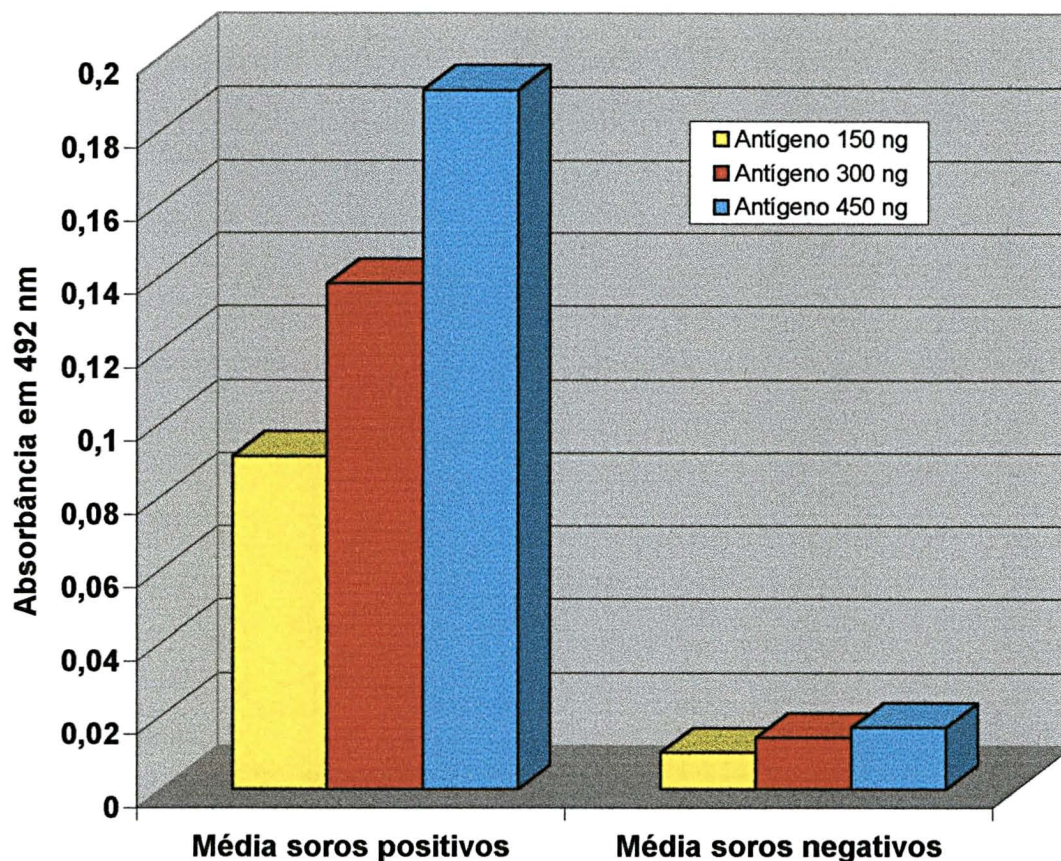


Com as diluições de 1/2000 e 1/3000 de conjugado (GRÁFICOS 6 e 7), os valores de densidade óptica dos soros controles foram muito baixos. Os melhores resultados foram obtidos com conjugado usado na diluição de 1/1000 (GRÁFICO 5). Com esta diluição de conjugado, os soros controles positivos apresentaram altos valores de densidades ópticas sem aumento significativo nas densidades ópticas dos controles negativos. Desta forma a discriminação entre soros positivos e negativos ficou mais evidente.

**GRÁFICO 6**—VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR POCINHO, COM CONJUGADO DILUÍDO 1:2000 E SORO DILUÍDO 1:400. CURITIBA, PARANÁ, 2001



**GRÁFICO 7**–VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO POR POCINHO, COM CONJUGADO DILUÍDO 1:3000 E SORO DILUÍDO 1:400. CURITIBA, PARANÁ,2001

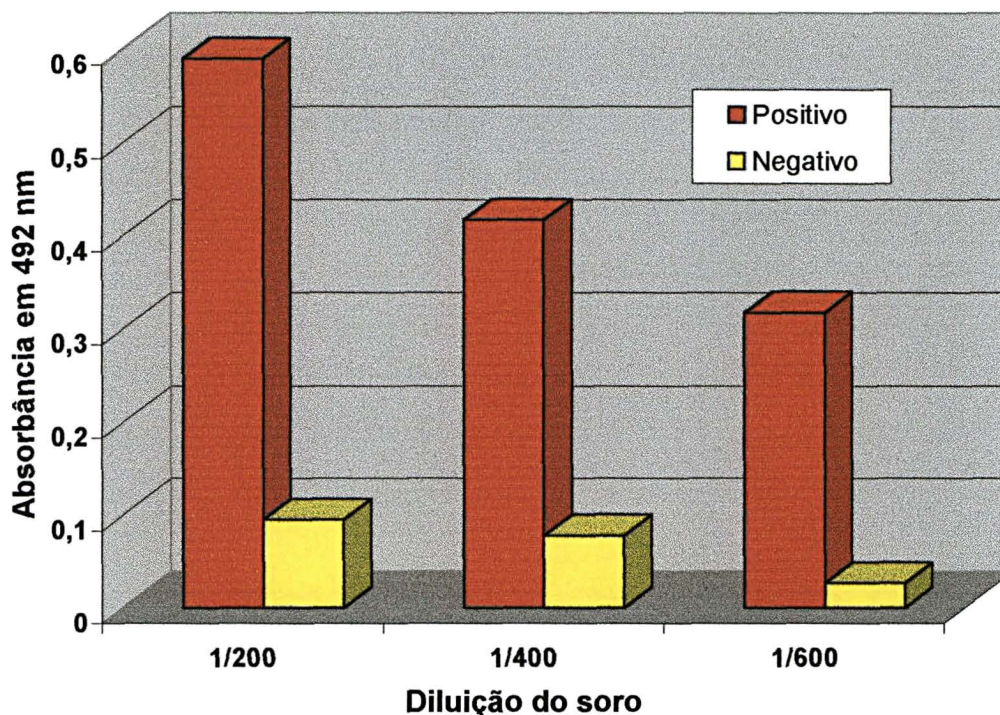


#### 4.2.3. Padronização da diluição dos soros.

Para estabelecer a diluição dos soros a ser usada para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* pelo método de enzima-imunoenensaio, diversas diluições dos soros de animais controles positivos e negativos foram analisadas. As diluições de 1/200, 1/400 e 1/600 foram avaliadas. Conforme os resultados observados (GRÁFICO 8), as diluições de 1/200 e 1/400 apresentaram altos valores de absorbância. Na diluição de 1/200 os soros controles apresentaram altos valores de densidade óptica na ausência de antígeno. Na diluição de 1/600, os valores de absorbância diminuíram muito. Por estes motivos o soro foi usado diluído 400 vezes.



**GRÁFICO 8** – VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE CÃES CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO PARA TOXOPLASMOSE EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DO SORO, COM 450ng DE ANTÍGENO POR POCINHO E CONJUGADO DILUÍDO 1:1000. CURITIBA, PARANÁ, 2001



#### 4.2.4. Estabelecimento do *Cut-off* ou ponto de corte entre soro reagente e não reagente.

No estabelecimento do *cut-off* ou ponto de corte, levou-se em consideração a finalidade para a qual o método de Enzimaimunoensaio Indireto estava sendo padronizado. Como a padronização foi desenvolvida para a realização de estudos soropidemiológicos de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*, optou-se por padronizar o método prezando pela sua sensibilidade. Então, no cálculo do *cut-off* foi usado dois desvios padrões da média de absorbância dos soros analisados.

Os valores de absorbância dos soros usados para o estabelecimento do valor de *cut-off* estão demonstrados na TABELA 3.

**TABELA 3 – VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS 32 SOROS DE CÃES NÃO REAGENTES AO ANTÍGENO DE *Toxoplasma gondii* QUE FORAM USADOS PARA O ESTABELECIMENTO DO CUT-OFF OU PONTO DE CORTE. CURITIBA, PARANÁ, 2001**

AMOSTRA	ABSORBÂNCIA	AMOSTRA	ABSORBÂNCIA	AMOSTRA	ABSORBÂNCIA
91	0,0860	135	0,0960	5b	0,0650
15	0,0165	154	0,0430	CN1	0,0670
24	0,0200	98	0,0450	137	0,0690
138	0,0220	88	0,0475	12	0,0720
54	0,0260	20	0,0500	144	0,0745
30	0,0315	45	0,0545	38	0,0750
99	0,0355	146	0,0560	5a	0,0790
100	0,0420	27	0,0580	62	0,0810
CN2	0,0610	87	0,0990	155a	0,0820
106	0,0620	35	0,0980	136	0,1180
151	0,0855	74	0,0940		

**"CUT – OFF" = MÉDIA ARITMÉTICA + 2 x DESVIO PADRÃO**

MÉDIA = 0,063

DESVIO PADRÃO = 0,026

"CUT – OFF" = 0,063 + 2 x 0,026

"CUT – OFF" = 0,115

Para o método padronizado, o ponto de corte ou *cut-off* foi de 0,115 nm. Portanto, o último animal encontrava-se dentro do limiar de positividade. O método de Enzimaimunoensaio padronizado no presente trabalho ficou, portanto, assim estabelecido:

<b>Diluição do Antígeno</b>	<b>450 ng/well</b>
<b>Diluição do Conjugado</b>	<b>1:1000</b>
<b>Diluição do Soro</b>	<b>1:400</b>
<b>Valor do Cut-off</b>	<b>0,115nm</b>

#### **4.2.5. Indicadores epidemiológicos obtidos com a padronização do método de enzaimunoensaio.**

Para a determinação dos valores dos indicadores epidemiológicos, soros de 389 cães foram analisados através do método de Imunofluorescência Indireta (padrão) e através do método de Enzimaimunoensaio Indireto padronizado neste trabalho (ANEXOS 8 e9).

Os resultados das análises foram agrupados de acordo com a concordância ou não entre os resultados obtidos em ambos os métodos (TABELA 4). Com o agrupamento destes resultados foi montada a matriz para o cálculo dos indicadores epidemiológicos, para determinar a qualidade do método padronizado.

**TABELA 4** - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A ANÁLISE DE 389 SOROS DE CÃES PROVENIENTES DE CANOINHAS, SC E CURITIBA, PR; AVALIADOS PELOS MÉTODOS DE IFI (PROVA REFERÊNCIA) E ELISA INDIRETO NAS DILUIÇÕES DE 1/40 E 1/400 RESPECTIVAMENTE, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI - *Toxoplasma gondii*. CURITIBA, PARANÁ, 2001

		IFI		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA	Positivo	154	22	176
	Negativo	05	208	213
Total		159	230	389

O método de Enzimaimunoensaio indireto para a pesquisa de anticorpos IgG anti - *T. gondii* padronizado no presente trabalho, de acordo com os valores descritos na TABELA 4 apresentou os seguintes índices:

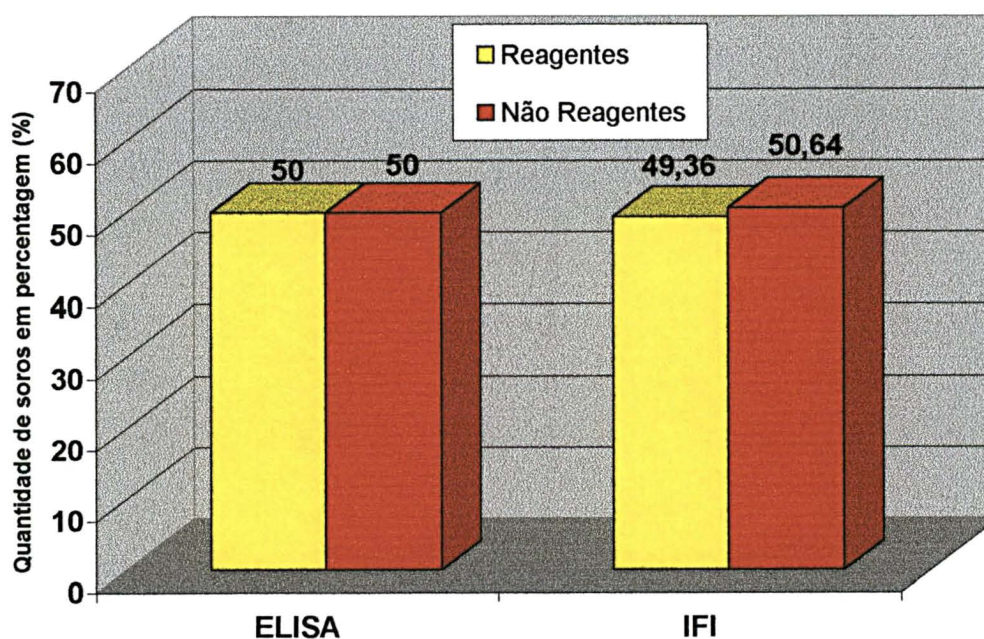
INDICADOR EPIDEMIOLÓGICO	ÍNDICE OBTIDO
⇒ Copositividade	96,85%
⇒ Conegatividade	90,43%
⇒ Classificação Correta	93,00%
⇒ Classificação Incorreta	6,94%
⇒ Valor Preditivo Positivo	87,50%
⇒ Valor Preditivo Negativo	97,65%
⇒ Indicador Kappa (K)	0,86
⇒ Índice de Correlação (r)	0,87

Pela fato de ainda não existirem dados epidemiológicos a respeito de soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães de Santa Catarina, e como alguns dos soros usados na padronização eram provenientes de cães de uma cidade de Santa Catarina, foi então determinada a soroprevalência de anticorpos nesta população (ÍTEM 3.1.2.1).

#### 4.2.6. Prevalência de anticorpos anti – *Toxoplasma gondii* em soros de cães de Canoinhas, SC.

Nos 158 soros provenientes de cães de Canoinhas, SC; a presença de anticorpos anti – *T. gondii* foi observada em 49,36% quando analisados pelo método de Imunofluorescência Indireta; e em 50% quando estes foram analisados pelo método de Enzimaimunoensaio indireto (GRÁFICO 9) (ANEXOS 8 e 10).

GRÁFICO 9 - PERCENTUAL DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS, SC, REAGENTES E NÃO REAGENTES NOS MÉTODOS DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – *Toxoplasma gondii*. CURITIBA, PARANÁ, 2001



#### 4.2.7. Estimativa da Prevalência de Toxoplasmose em cães de Canoinhas, SC.

Após utilização da fórmula de Prevalência corrigida, levando em consideração a sensibilidade (cpositividade) e especificidade (conegatividade) do método de Enzimaimunoensaio padronizado no presente trabalho e usado nas análises, a prevalência estimada de Toxoplasmose em cães de Canoinhas, SC foi de 46,5%.

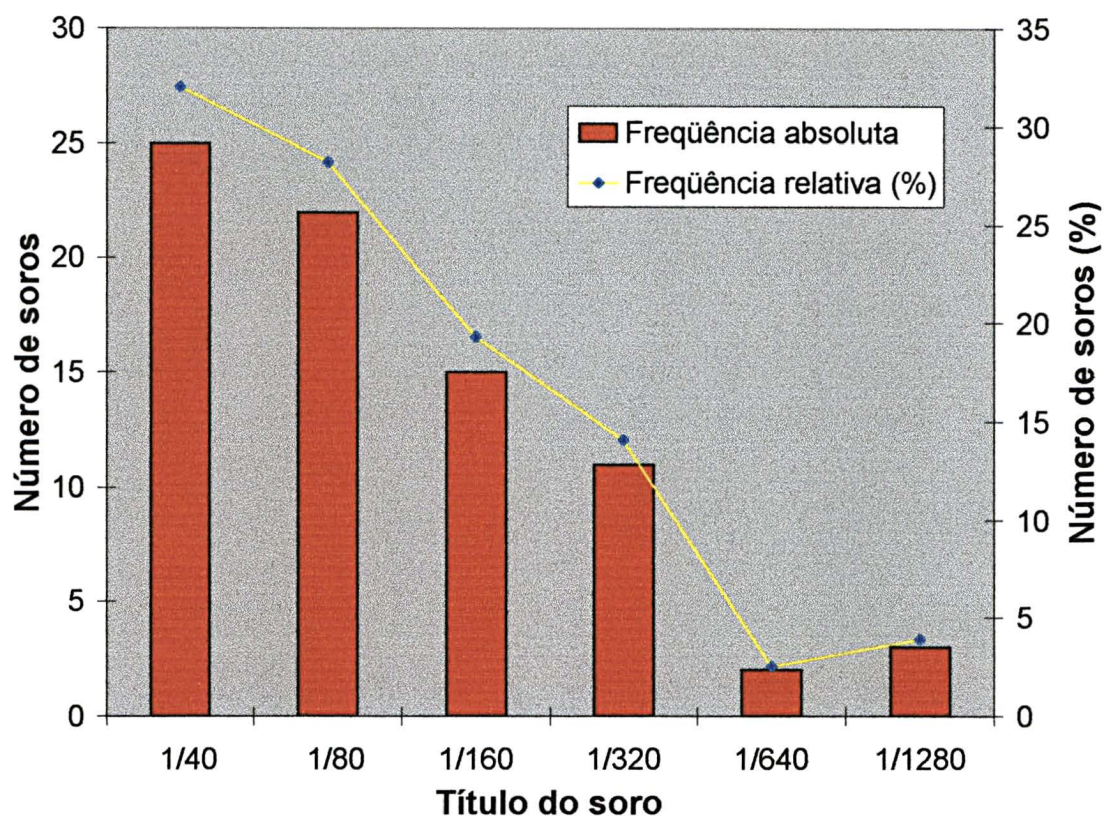
O título reagente final dos 78 soros de cães positivos, de acordo com as diluições analisadas pelo método de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de Imunoglobulina G anti – *T. gondii* podem ser observados na TABELA 5 e GRÁFICO 10. Um total de 14 soros apresentaram reatividade somente na diluição de 1/20 não sendo considerados como positivos e portanto, foram excluídos da análise.

**TABELA 5** -DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS,SC, REAGENTES NO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI), PARA PESQUISA DE IgG ANTI – *Toxoplasma gondii* DE ACORDO COM O TÍTULO REAGENTE FINAL. CURITIBA, PARANÁ, 2001

<b>Título</b>	<b>Freqüência absoluta</b>	<b>Freqüência relativa (%)</b>	<b>Freqüência acumulada</b>
1/40	25	32	25
1/80	22	28,2	47
1/160	15	19,3	62
1/320	11	14,1	73
1/640	02	2,5	75
1/1280	03	3,9	78
<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>---</b>

A maior proporção dos soros se apresentaram reagentes nas diluições de 1/40 e 1/80. A maior diluição na qual foram obtidos soros reagentes foi a diluição de 1/1280.

**GRÁFICO 10** –NÚMERO DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS REAGENTES NO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IgG) PARA O ANTÍGENO DE *Toxoplasma gondii* CONSIDERANDO OS TÍTULOS DOS SOROS. CURITIBA, PARANÁ, 2001



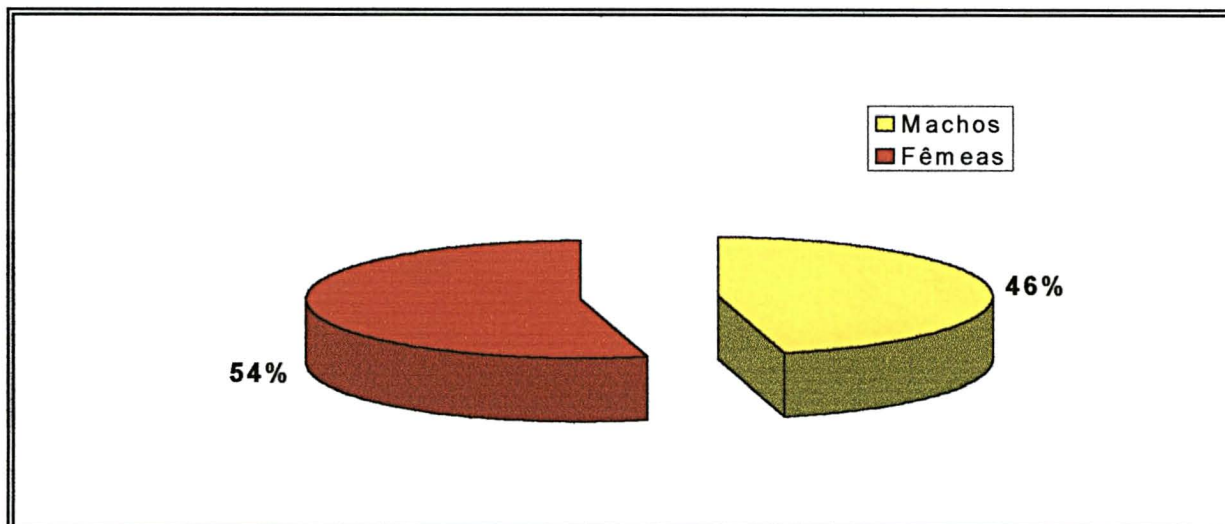
Os dados referentes a distribuição dos animais sororeagentes segundo o sexo, encontram-se na TABELA 6 e GRÁFICO 11. Foi observado que 45 (46,8%) dos 96 machos e 34 (54,8%) das 62 fêmeas foram sororeagentes pelo método de Enzimaímunensaio Indireto frente ao antígeno de *T. gondii*. Na análise estatística, não houve diferença significativa entre os sexos na ocorrência de reagentes ( $\chi^2=0,66^{ns}$ ).

**TABELA 6** – ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES DE CANOINHAS SEGUNDO O SEXO, QUANDO ANALISADOS PELO MÉTODO DE ENZIMAÍMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI -*Toxoplasma gondii*. CURITIBA, PARANÁ, 2001

	REAGENTES	NÃO REAGENTES	TOTAL
<b>MACHOS</b>	45	51	96
<b>FÊMEAS</b>	34	28	62
	79	79	158

#( $\chi^2= 0,66^{ns}$ ,  $p= 0,415$ ).

**GRÁFICO 11 – PERCENTUAL DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS REAGENTES AO ANTÍGENO DE *Toxoplasma gondii* NO MÉTODO DE ELISA INDIRETO (IgG), DE ACORDO COM O SEXO. CURITIBA, PARANÁ, 2001**



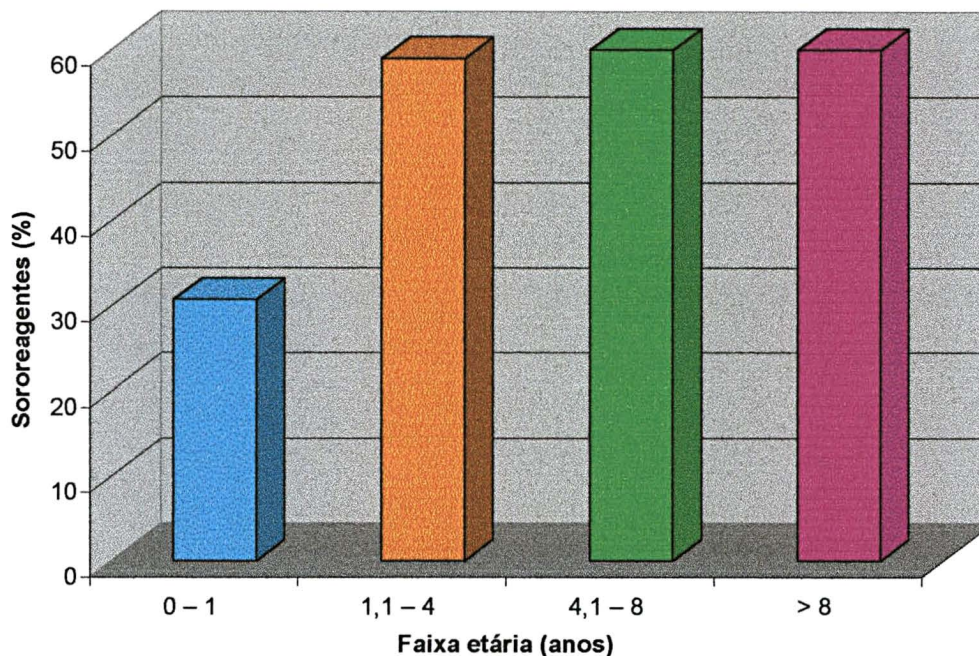
De acordo com os dados obtidos e conforme a análise estatística, foi encontrada diferença significativa entre os soropositivos e a idade ao nível de 5% de probabilidade ( $\chi^2 = 9,555^*$ ,  $p = 0,023$ ) (TABELA 7 e GRÁFICO 12).

**TABELA 7 – DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES DE CANOINHAS REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI *Toxoplasma gondii*, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA. CURITIBA, PARANÁ, 2001**

	REAGENTES	NÃO REAGENTES	TOTAL
0 – 1 ano	16	34	50
1,1 – 4 anos	39	29	68
4,1 – 8 anos	18	12	30
> 8 anos	06	04	10
	79	79	158

# ( $\chi^2 = 9,55^*$ ,  $p = 0,023$ )

**GRÁFICO 12** – SOROPREVALÊNCIA DOS CÃES DE CANOINHAS NA PROVA DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI *Toxoplasma gondii*, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA. CURITIBA, PARANÁ, 2001



Foi observado que 50 (50%) dos 100 animais sem raça definida e 29 (50%) dos 58 animais com raça definida foram reagentes pelo método de Enzimaimunoensaio Indireto (TABELA 8). Na análise estatística, não houve diferença significativa entre a ocorrência de soreagentes e a raça do animal ( $\chi^2 = 0,0272^{ns}$ ) (GRÁFICO 13).

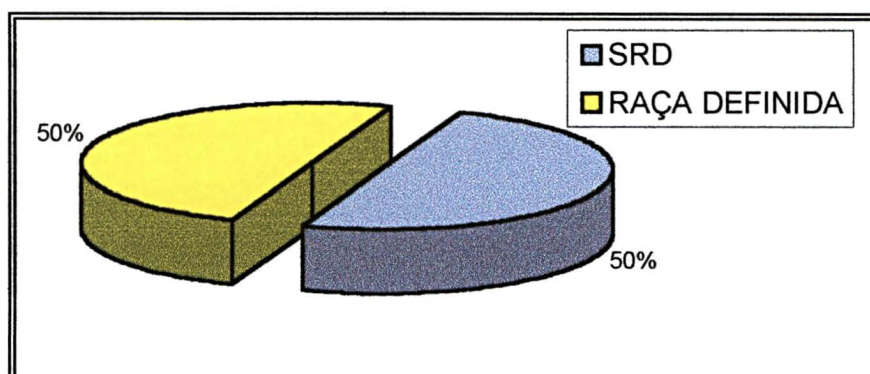
**TABELA 8** – DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES DE CANOINHAS REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI *Toxoplasma gondii*, DE ACORDO COM A RAÇA. CURITIBA, PARANÁ, 2001

	REAGENTES	NÃO REAGENTES	TOTAL
SRD	50	50	100
RAÇA PURA	29	29	58
	79	79	158

#( $\chi^2 = 0,0272^{ns}$ ,  $p = 0,868$ ).



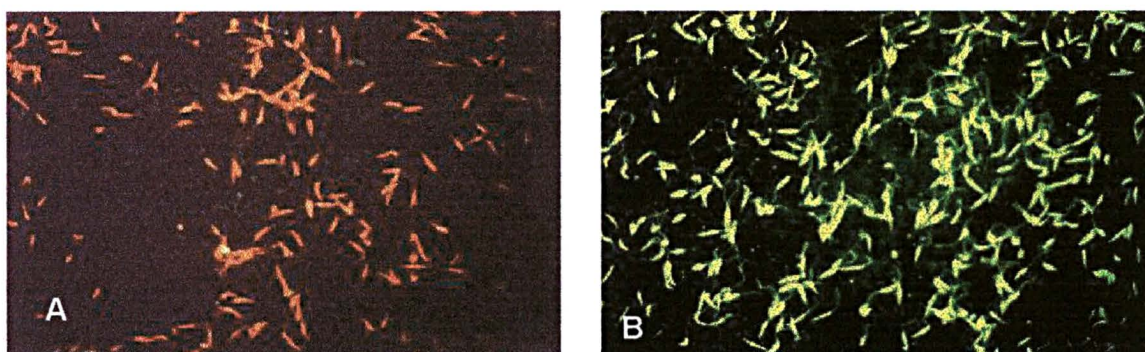
**GRÁFICO 13** – PERCENTUAL DE SOROS DE CÃES DE CANOINHAS REAGENTES AO ANTÍGENO DE *Toxoplasma gondii* NO MÉTODO DE ELISA INDIRETO (IgG), DE ACORDO COM A RAÇA. CURITIBA, PARANÁ, 2001



#### 4.2.8. Resultados do método de Imunofluorescência Indireta para detecção de imunoglobulina G anti-*Leishmania* spp.

Dos soros usados para a padronização do Enzimaimunoensaio indireto para pesquisa de anticorpos anti - *T. gondii*, 158 destes foram analisados também frente ao antígeno de *Leishmania* spp., com o objetivo de verificar se havia reação cruzada com outro protozoário. No procedimento técnico, uma melhor discriminação entre os soros controles positivos e negativos (FIGURA 13), foi obtida com conjugado diluído 1/40, deste modo, esta diluição do conjugado passou a ser usada nas análises. Os soros foram analisados nas diluições de 1/40 e 1/80 para pesquisa de imunoglobulinas G anti - *Leishmania* spp. Não foram observados soros reagentes ao antígeno de *Leishmania* spp. Dentre os soros de cães que foram reagentes ao antígeno de *T. gondii*, nenhum se mostrou reagente ao antígeno de *Leishmania* spp. (ANEXO 10).

**FIGURA 13** – IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CANINA



Legenda: A=resultado negativo (400x)

FONTE: Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFPR.

B=resultado positivo (400x)

#### 4.2.9. Prevalência de anticorpos IgG anti – *Toxoplasma gondii* no soro de cães de Curitiba, PR.

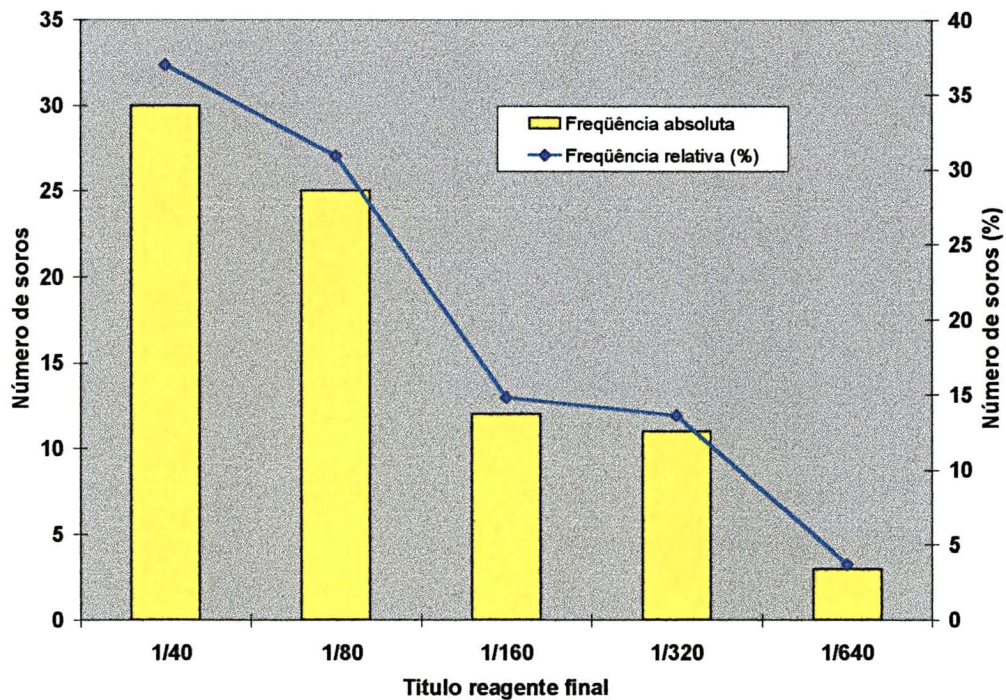
Das 513 amostras de soros de cães de Curitiba, 231 amostras foram avaliadas por ambos os métodos, Imunofluorescência Indireta e Enzimaimunoensaio Indireto. Como os métodos se mostraram equivalentes e o objetivo do trabalho era estudar a prevalência de título de anticorpos anti-*T. gondii*, a totalidade dos soros (513), foram analisados pelo ELISA indireto padronizado no presente trabalho, para que fosse determinada a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*.

Dos 231 soros analisados pelo método de Imunofluorescência Indireta, 81 apresentaram-se reativos frente ao antígeno de *T. gondii*. O título reativo final dos 81 soros de cães reagentes, de acordo com as diluições analisadas pelo método de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de imunoglobulina G anti – *T. gondii* encontram-se na TABELA 9 e GRÁFICO 14. Um total de 62 soros apresentaram reatividade somente na diluição de 1/20 não sendo considerados como positivos. Uma maior proporção de soros se apresentaram como reagentes nas diluições de 1/40 e 1/80. A maior diluição na qual foram obtidos soros reagentes foi a diluição de 1/640.

**TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE SOROS DE CÃES DE CURITIBA, PR, REAGENTES NO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI), PARA PESQUISA DE IgG ANTI – *Toxoplasma gondii* DE ACORDO COM O TÍTULO REAGENTE FINAL. CURITIBA, PARANÁ, 2001**

<b>Título</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>	<b>Frequência acumulada</b>
1/40	30	37	30
1/80	25	30,9	55
1/160	12	14,8	67
1/320	11	13,6	78
1/640	03	3,7	81
<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>100</b>	<b>---</b>

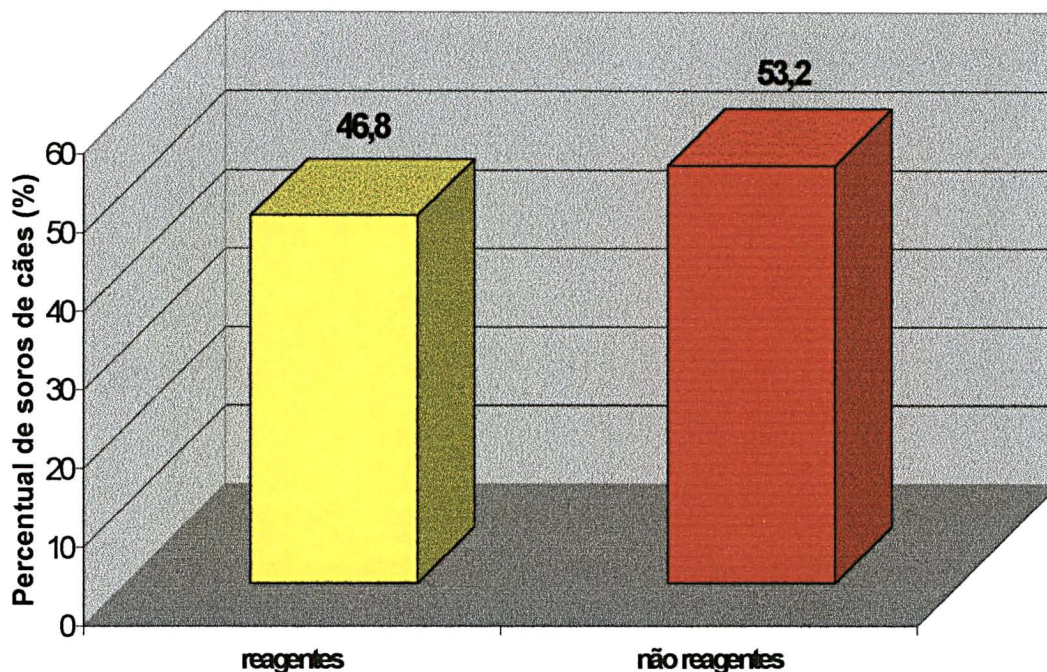
**GRÁFICO 14** – NÚMERO DE SOROS DE CÃES DE CURITIBA REAGENTES, NO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IgG), PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI - *Toxoplasma gondii*, CONSIDERANDO OS TÍTULOS FINAIS DOS SOROS. CURITIBA, PARANÁ, 2001



Após a realização do método de Enzimaimunoensaio padronizado nas 513 amostras de soros dos cães provenientes de Curitiba, PR, a presença de anticorpos anti – *T. gondii* foi detectada em 46,8% das amostras (GRÁFICO 15 e ANEXO 12).

Um total de 116 (45,1%) dos 257 machos e 124 (48,4%) das 256 fêmeas foram sororeagentes pelo método de enzimaimunoensaio indireto frente ao antígeno de *T. gondii* (TABELA 10). Na análise estatística, não houve diferença significativa entre os sexos na ocorrência de sororeagentes ( $\chi^2 = 0,436^{ns}$ ).

**GRÁFICO 15** - PERCENTUAL DE SOROS DE CÃES DE CURITIBA,PR, REAGENTES E NÃO REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – *Toxoplasma gondii*. CURITIBA, PARANÁ, 2001



**TABELA 10** – DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES DE CURITIBA REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI –*Toxoplasma gondii*, SEGUNDO O SEXO. CURITIBA, PARANÁ, 2001

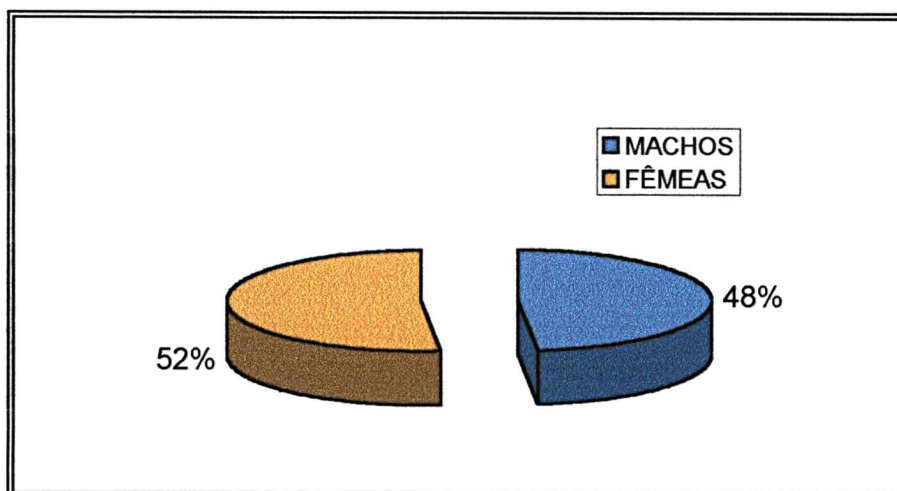
	REAGENTES	NÃO REAGENTES	TOTAL
<b>MACHOS</b>	116	141	257
<b>FÊMEAS</b>	124	132	256
	240	273	513

#( $\chi^2= 0,436^{ns}$ ,  $p= 0,508$ ).

Com relação a idade estimada dos cães, foram observados 31 (35,2%) dos 88 animais jovens sororeagentes e 209 (49,2%) dos 425 animais adultos sororeagentes ao antígeno de *T. gondii* (TABELA 11 e GRÁFICO 17).

De acordo com os dados obtidos e conforme a análise estatística, foi encontrada diferença significativa entre os sororeagentes e a idade ao nível de 5% de probabilidade ( $\chi^2= 5,51^*$ ,  $p= 0,023$ ).

**GRÁFICO 16** – PERCENTUAL DE CÃES DE CURITIBA SOROREAGENTES AO ANTÍGENO DE *Toxoplasma gondii* NO MÉTODO DE ELISA INDIRETO (IgG), DE ACORDO COM O SEXO. CURITIBA, PARANÁ, 2001



**TABELA 11** – DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES DE CURITIBA REAGENTES NO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI *-Toxoplasma gondii*, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA. CURITIBA, PARANÁ, 2001

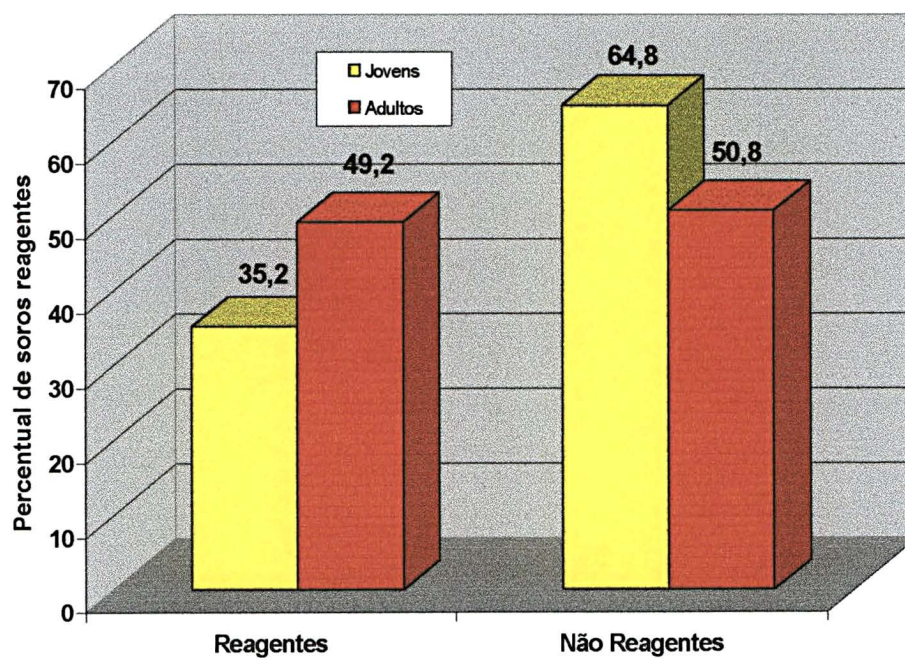
	REAGENTES	NÃO REAGENTES	TOTAL
Adulto	209	216	425
Jovem	31	57	88
	240	273	513

# ( $\chi^2 = 5,51^*$ ,  $p = 0,023$ )

#### 4.2.10. Estimativa da Prevalência de Toxoplasmose em cães de Curitiba, PR.

Com a utilização da fórmula de Prevalência corrigida, levando em consideração a sensibilidade (copositividade) e especificidade (conegatividade) do método de Enzimaimunoensaio padronizado no presente trabalho e usado nas análises, a prevalência estimada de Toxoplasmose em cães de Curitiba, PR foi de 42,7%.

**GRÁFICO 17** – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IgG ANTI *Toxoplasma gondii* NO SORO DE CÃES DE CURITIBA, NO MÉTODO DE ELISA INDIRETO, DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA. CURITIBA, PARANÁ, 2001



## **5. DISCUSSÃO**

Apesar de decorrido quase um século da descrição original do protozoário *T. gondii* por NICOLLE e MANCEAUX (1909) e de extensa bibliografia já existente, a toxoplasmose apresenta-se ainda como campo aberto para a investigação. Inúmeros são os problemas que permanecem para serem resolvidos, dentre estes o desenvolvimento e padronização de metodologias eficientes, sensíveis e de baixo custo para o diagnóstico clínico e epidemiológico da toxoplasmose tanto em humanos quanto em animais.

A prova de Sabin-Feldman foi durante muito tempo considerada prova padrão para a determinação de anticorpos anti-*T. gondii* em soros humanos e animais (ISHIZUKA, MIGUEL, BROGLIATO; 1974a). Tendo em vista as dificuldades para sua execução e a necessidade de usar parasitas vivos, o método de Imunofluorescência Indireta foi padronizado no Brasil por CAMARGO (1964) para a pesquisa de anticorpos em soros humanos. Para sua utilização em soros de cães, o método foi padronizado por MARTIN (1972) e seus resultados foram comparados com a prova de Sabin-Feldman por ISHIZUKA, MIGUEL E BROGLIATO (1974b), encontrando uma correlação de 79% entre os resultados. Desde então, pesquisas a respeito da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães tem sido realizadas basicamente através do método de imunofluorescência indireta.

Diversos autores (ISHIZUKA & YASUDA, 1981; GERMANO *et al.*, 1985; FREIRE *et al.*, 1992; GUIMARÃES *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1997; CABRAL *et al.*, 1998) realizaram estudos soropidemiológicos de prevalência de anticorpos anti – *T. gondii* em cães, usando técnicas sorológicas como a Reação de Sabin-Feldman, a de Hemaglutinação Indireta ou Imunofluorescência Indireta. Normalmente estes estudos têm sido realizados avaliando os resultados obtidos com apenas uma técnica sorológica. Quando a associação de técnicas sorológicas é usada, os índices de equivalência, como a sensibilidade ou copositividade, a especificidade ou conegatividade do método e a correlação entre os resultados obtidos não têm sido avaliados.

Sendo assim, uma comparação válida entre as prevalências de anticorpos específicos para *T. gondii* observadas em cães em diferentes regiões do Brasil não tem sido possível, principalmente pelas diferenças de sensibilidade e especificidade



dos métodos sorológicos usados e também pelas diferenças na realização das metodologias em cada laboratório.

Embora o método de Enzimaimunoensaio tenha sido desenvolvido na década de 70, no Brasil este método é usado no diagnóstico da toxoplasmose como rotina apenas em alguns laboratórios de diagnóstico para humanos. Apesar de ser um método rápido, barato, sensível e que permite o processamento de vários soros simultaneamente, o mesmo ainda não é usado em estudos soropidemiológicos de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães. Existia a necessidade de padronização do método para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose em cães. Então, com o objetivo de minimizar as variações na realização do método de enzimaensaio, o mesmo foi padronizado neste trabalho para que possa ser usado no diagnóstico sorológico da toxoplasmose em cães e para que os resultados possam ser comparados pelos diversos pesquisadores que o utilizem. Após a padronização, foi realizada a validação do método padronizado através da comparação dos resultados e índices epidemiológicos obtidos com os do método padrão comumente usado, neste caso com a Imunofluorescência Indireta.

Inicialmente, foi estabelecida uma população de cães para a padronização do método de Enzimaimunoensaio, composta por animais provenientes dos municípios de Curitiba, PR e Canoinhas, SC. Numa primeira etapa de trabalho, as amostras de soros dos cães foram analisadas pelo método de Imunofluorescência Indireta, para que fosse obtido um resultado referência para cada um dos soros. As amostras foram consideradas positivas, quando a demonstração de fluorescência era obtida na diluição de 1:40 ou em diluição superior. Na leitura das reações de Imunofluorescência Indireta, aqueles soros onde os taquizoítos apresentavam apenas fluorescência na região apical, não foram considerados como positivos, pois esta fluorescência é considerada como reação inespecífica causada por infecção cruzada com outros parasitas do subfilo Apicomplexa, devido a antígenos comuns nas rotrias e micronemas (MINEO *et al.*, 2001). Numa segunda etapa, foram realizados os ensaios para a padronização e validação do Enzimaimunoensaio Indireto para detecção de imunoglobulina G anti-*T. gondii*.

O método de Enzimaimunonsaio indireto padronizado, apresentou 96,85% de copositividade (sensibilidade), 90,43% de conegatividade (especificidade), 93% de

Classificação Correta e 6,94% de Classificação Incorreta. Os indicadores epidemiológicos obtidos neste trabalho, concordam parcialmente com os descritos por UCHÔA *et al.* (1999), quando da padronização de uma técnica de Enzimaimunoensaio para pesquisa de IgG anti – *T. gondii* em humanos. A sensibilidade obtida por UCHÔA *et al.* (1999), foi de 96,7% e a especificidade foi de 75%. REY & RAMALHO (1999), obtiveram 98,6% de sensibilidade e 88,3% de especificidade no método de enzimaímunoensaio para pesquisa de IgG anti – *T. gondii* em humanos, tendo sensibilidade semelhante a obtida neste trabalho e especificidade inferior.

O método de enzimaímunoensaio para diagnóstico da toxoplasmose em cães no Brasil, foi usado somente por SILVA *et al.* (1997); DOMINGUES *et al.* (1998) e por MINEO *et al.* (2001). Porém, SILVA *et al.* (1997) e MINEO *et al.* (2001) usaram a mesma metodologia e não realizaram validação do método, este método foi adaptado de uma padronização para diagnóstico de toxoplasmose humana. Os indicadores epidemiológicos obtidos por DOMINGUES *et al.* (1998) foram, 51,3% de conegatividade e 81% de copositividade. São inferiores aos obtidos no presente trabalho, o que leva a sugerir, que nossa padronização do enzimaímunoensaio apresenta uma boa qualidade de resultados. Por outro lado, os índices obtidos concordam parcialmente com os obtidos por LIN (1998), que obteve especificidade de 98,9% e sensibilidade de 100% em pesquisa de toxoplasmose em cães em Taiwan.

O Valor Preditivo Positivo (VPP) do método de Enzimaímunoensaio indireto padronizado foi de 87,5%, enquanto que o Valor Preditivo Negativo (VPN) foi de 97,65%, concordando parcialmente com os valores de 83,3% de VPP e 94,7% de VPN obtidos por UCHÔA *et al.* (1999).

O índice de Classificação Correta ou concordância bruta entre os métodos foi de 93%, superando a de 88,3% obtida por UCHÔA *et al.* (1999), e sendo semelhante a de 92,6% obtida por REY e RAMALHO (1999). Muitas vezes observa-se que a concordância entre os resultados obtidos por Imunofluorescência indireta e Enzimaímunoensaio não é absoluta. Provavelmente, estas diferenças sejam devido ao uso de antígenos distintos: íntegro na Imunofluorescência indireta e solúvel no Enzimaímunoensaio, detectando, neste último, anticorpos de aparecimento mais

tardio. Além da diferença de qualidade entre os fabricantes de conjugados fluorescentes e enzimáticos (VAN KNAPEN, 1984; UCHÔA *et al.*, 1999).

A correlação entre os resultados obtidos nos métodos usados no presente trabalho, foi alta e positiva (0,87), sendo superior as correlações de 0,67, obtida por DOMINGUES *et al.* (1998) e de 0,69 obtida por SILVA *et al.* (1997) em sua metodologia. Estas menores correlações observadas pelos autores, podem ser decorrente dos valores definidos para o *cut-off*. DOMINGUES *et al.* (1998) usaram a diluição 1/40 como *cut-off* na IFI e 0,165 nm no teste ELISA e SILVA *et al.* (1997) usaram a diluição 1/64 na IFI e 0,128 nm no ELISA. O valor de *cut-off* da IFI é semelhante ao do presente trabalho (1/40), entretanto o *cut-off* do ELISA foi superior ao deste trabalho (0,115) em ambos os trabalhos. Outro fator pode ser a diluição do soro para o ELISA, DOMINGUES *et al.* (1998) usaram soro diluído 1/200 e no presente trabalho o soro foi diluído 1/400. SILVA *et al.* (1997) usaram apenas 40 soros para realizar as comparações, podendo ser este um dos fatores que mais contribuiu para uma baixa correlação dos resultados, uma vez que amostras maiores diminuem a possibilidade de erros amostrais.

O valor obtido para o indicador Kappa (K) foi de 0,86, classificado como ótimo. Este valor é superior ao de 0,708 obtido por UCHÔA *et al.* (1999), indicando que o método padronizado no presente trabalho apresentou maior proporção de concordâncias entre os resultados obtidos nos dois métodos.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de reações inespecíficas com outros protozoários, as 158 amostras de soros usadas na padronização do ensaio imunológico indireto, foram analisados também frente ao antígeno de *Leishmania* spp., através do método de Imunofluorescência Indireta. Não foram observadas reações cruzadas frente ao antígeno de *Leishmania* spp. e nenhum dos soros analisados apresentou reação ao antígeno de *Leishmania* spp. Porém, seria prudente que estes soros fossem analisados frente a outros antígenos, como *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp., para avaliação da possibilidade de reações cruzadas com outros esporozoários.

Um dos grandes problemas das provas sorológicas de diagnóstico, é que mesmo com a utilização das melhores metodologias, sempre haverá uma certa proporção de falsos positivos e falsos negativos. Entretanto, existem maneiras de

reduzir os resultados falsos positivos e falsos negativos de um método. A repetição ou combinação de provas em paralelo ou em série, é uma destas estratégias, embora aumente os custos. Quando os resultados dos testes são iguais em ambos os métodos, deve-se considerar o resultado; se o resultado for conflitante, os testes devem ser repetidos. Uma outra alternativa é alternar amostras de soro e repetir a prova após um intervalo de duas semanas.

Após a validação do método de enzimaímunensaio indireto no presente trabalho, duas populações de cães foram estudadas para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*. A primeira, correspondeu a uma população de cães do município de Canoinhas, SC. A segunda população, era formada por cães provenientes de Curitiba, PR.

Numa população de 158 cães de Canoinhas, SC; foi detectada presença de anticorpos anti-*T. gondii* em 49,36% das amostras pelo método de Imunofluorescência indireta e em 50% das amostras pelo método de Enzimaímunensaio indireto. Diferenças observadas no percentual de positivos nos métodos de Imunofluorescência indireta e Enzimaímunensaio, podem ser devidas ao valor estabelecido para o *cut-off* dos métodos e a maior sensibilidade do método de Enzimaímunensaio em soros com títulos baixos (CALAMEL & DUFOUR, 1985; SILVA *et al.*, 1997). Podem também ser devidas a maior especificidade do método de Imunofluorescência indireta, o que diminui a possibilidade de reações falso-positivas e pelo fato da diluição de 1/40 ser considerada a determinante de reação positiva na Imunofluorescência indireta. DOMINGUES *et al.* (1998) avaliou comparativamente as técnicas de Enzimaímunensaio e Imunofluorescência indireta, e encontrou 62,5% de positivos no Enzimaímunensaio e 46,01% na Imunofluorescência indireta, diferenças maiores entre os resultados nos dois métodos, mas que também demonstram diferenças entre as percentagens de positivos em ambos os testes.

Com o objetivo de determinar a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* usando o ELISA indireto que foi padronizado no presente trabalho, foram escolhidos animais de Curitiba, PR. Curitiba foi eleita por ser uma cidade com grande população humana (1.586.898 habitantes) e conseqüentemente com grande população de cães, o que dificultaria um estudo soroepidemiológico usando a prova de Imunofluorescência indireta, porque esta exige diagnóstico individual. Além destes

fatores, existem dados a respeito de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães de Curitiba apenas do ano de 1958. A totalidade dos soros foi analisada através do método de Enzimaimunoensaio Indireto padronizado no presente trabalho, devido ao grande número de amostras (n=513) e porque os indicadores obtidos revelaram uma alta correlação entre a IFI e o Enzimaimunoensaio Indireto.

ISHIZUKA e YASUDA (1981); GERMANO, ERBOLATO, ISHIZUKA (1985); GUIMARÃES *et al.* (1992) demonstraram freqüências de anticorpos anti-*T. gondii* em cães de 68,3%, 91% e 47,3% respectivamente, pelo método de imunofluorescência indireta, considerando 1:16 como título inicial positivo. Como pode ser observado, mesmo utilizando um método similar, existem variações consideráveis nas freqüências observadas de anticorpos anti-*T. gondii* em cães. Estas variações podem ser devidas as diferenças regionais, critérios utilizados nas leituras, tamanho da amostra e idade dos cães usados para compor a amostra.

Na amostragem de cães de Canoinhas estudada no presente trabalho, a maioria dos soros se mostraram reagentes até as diluições de 1:40 e 1:80. Em 231 amostras de soros de cães de Curitiba, analisadas através do método de IFI, um maior número de amostras foi observada como reagente até as diluições de 1:40 e 1:80. Estas observações concordam com àquelas observadas na amostragem de cães de Canoinhas e concordam com os resultados encontrados por DOMINGUES *et al.* (1998), caracterizando que grande parte dos animais se encontra em uma fase que pode ser classificada como latente ou inicial da doença (GARCIA *et al.*, 1999a). CABRAL *et al.* (1998) pesquisando anticorpos anti-*T. gondii* em cães de Uberlândia, encontrou maiores freqüências de anticorpos nos títulos de 1:20 e 1:40.

Na grande maioria dos trabalhos realizados com cães para pesquisa de IgG anti-*T. gondii*, usando o método de imunofluorescência indireta, os autores usaram o título de 1: 16 como título inicial de positivos (ISHIZUKA & YASUDA, 1981; GERMANO, ERBOLATO, ISHIZUKA, 1985; GUIMARÃES *et al.*, 1992; GARCIA *et al.*, 1999a). Em consequência deste fato, obtiveram altas taxas de soroprevalência. Se o título inicial de 1:20 fosse determinante de reação positiva, a soroprevalência de anticorpos em cães de Canoinhas passaria de 49,36% para 58,22%, e nas 231 amostras de cães de Curitiba, passaria de 35% para 61,9%. Este fato demonstra que a soroprevalência de anticorpos está estritamente relacionada com o título inicial para

reações positivas. A opção de elevação do título inicial de positivos para 1:40, foi para que fosse diminuída a possibilidade de altos índices de reações falso-positivas.

Após análise estatística; os dados revelaram não haver diferença significativa na ocorrência da infecção entre machos e fêmeas, tanto na população de cães de Canoinhas, quanto na de Curitiba. Este fato é facilmente compreendido, visto estar a transmissão do *T. gondii* relacionada com a ingestão de alimentos ou água contaminados com *T. gondii* ou via infecção pré-natal. Entretanto, sabe-se que fêmeas de roedores são mais suscetíveis que machos ao *T. gondii* (LIN, 1998). Estudos realizados nas espécies suína, eqüina, ovina e bovina por GARCIA *et al.* (1999b) também não verificaram diferenças significativas entre o sexo e a porcentagem de soroprevalência. As observações de nosso trabalho referentes ao sexo dos cães, são similares as obtidas por ISHIZUKA e YASUDA (1981); GERMANO, ERBOLATO, ISHIZUKA (1985); SILVA *et al.* (1997), CABRAL *et al.* (1998); GARCIA *et al.* (1999b), o que nos leva a supor que animais de ambos os sexos apresentam as mesmas oportunidades de aquisição de infecção pelo *T. gondii*.

Foram observadas diferenças estatísticas significantes em relação às faixas etárias em ambas as populações estudadas, com aumento da soropositividade com o aumento da idade dos animais. Na população de cães de Canoinhas, verificou-se que os animais com até um ano de idade apresentaram uma soroprevalência menor (32%) que as outras faixas etárias (acima de 55%). Nos animais de Curitiba, separados em dois grupos: adultos e jovens, os animais jovens apresentaram menor proporção de reagentes (35,2%) em relação aos animais adultos (49,2%). Esta maior soroprevalência em animais mais velhos, se deve ao fato de que, uma vez que o animal tenha sido infectado, os anticorpos da classe IgG permanecem por muitos anos, provavelmente por toda a vida do hospedeiro (LIN, 1998). Também porque animais mais velhos estiveram por maior tempo expostos as fontes de contaminação. Reforçam estes resultados, os trabalhos de ISHIZUKA e YASUDA (1981); GERMANO, ERBOLATO, ISHIZUKA (1985), GUIMARÃES *et al.* (1992) que encontraram resultados similares e o trabalho de GARCIA *et al.* (1999a) onde a soroprevalência foi maior nos animais acima de oito meses de idade. No município de Belo Horizonte, GUIMARÃES *et al.* (1992) observaram 47,3% de animais sororeagentes. Os autores observaram que a soroprevalência de anticorpos

aumentava de acordo com a idade, chegando a 62% nos cães acima de 5 anos de idade.

LIN (1998) em Taiwan e CABRAL *et al.* (1998) em Minas Gerais, encontraram maiores taxas de soroprevalência para *T. gondii* em cães sem raça definida (SRD) que em cães de raça pura. O autor atribuiu esta diferença, ao maior cuidado normalmente dispensado aos animais de raça pura, principalmente condições de higiene, alimentação somente com ração comercial e viverem dentro de casa, diminuindo suas possibilidades de contaminação. No presente trabalho, nos cães de Canoinhas, não foram detectadas diferenças significativas entre a raça dos cães e a soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii*. Os cães de Curitiba eram todos animais sem raça definida. Como no Brasil, os cães são os principais animais de estimação e normalmente tem um contato íntimo muito grande com seus proprietários, os mesmos recebem tratamentos similares não importando se o animal é ou não de raça pura. Na maioria das vezes, estes animais vivem fora do domicílio ou passam apenas a noite dentro dos domicílios; são alimentados com rações comerciais e com restos de alimentação humana, mas como vivem nos pátios das casas podem ainda ter acesso a roedores. Com base nestes aspectos, ocorreu de acordo com o esperado, não existindo diferença entre a proporção de animais soropositivos e a raça dos mesmos. Os resultados obtidos neste trabalho concordam com os obtidos por AGANGA e ORTESE (1984) na Nigéria.

Após a utilização da fórmula para o cálculo de prevalência corrigida, levando em consideração a copositividade (sensibilidade) e conegatividade (especificidade) do Enzimaimunoensaio indireto padronizado, a prevalência estimada de toxoplasmose em cães de Canoinhas, SC foi de 46,5%. A prevalência estimada de toxoplasmose em cães de Santa Catarina não havia sido previamente estudada, sendo portanto estes os primeiros dados referentes a toxoplasmose em cães no estado. Em Curitiba, PR a presença de anticorpos anti – *T. gondii* foi detectada pelo método de Enzimaimunoensaio em 46,8% das amostras de soros de cães. Após a utilização da fórmula para o cálculo de prevalência corrigida, a prevalência estimada de toxoplasmose em cães de Curitiba, PR foi de 42,7%.

Quando comparadas, as soroprevalências de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de cães de Canoinhas e Curitiba, 50% e 46,8% respectivamente, observamos

maior soroprevalência em cães de Canoinhas. Uma vez que os animais de Canoinhas possuíam proprietários (e em conseqüência melhores cuidados) enquanto os de Curitiba eram animais sem dono, recolhidos pela prefeitura e mantidos no Canil municipal, a expectativa era de que em Curitiba fosse observada uma prevalência superior. Mas os resultados revelaram uma maior prevalência em animais de Canoinhas, levando a supor que sejam os restos de alimentação humana uma das principais fontes de contaminação para os cães. Porque, a dieta alimentar dos cães de Canoinhas era baseada na grande maioria das vezes exclusivamente de restos da alimentação humana e em outras vezes, de uma mistura de ração comercial e restos de alimentação humana. Esta maior prevalência observada nos animais de Canoinhas, também pode ser devida as diferenças no tamanho das amostras (158 cães de Canoinhas contra 513 cães de Curitiba).

No estado do Paraná, a prevalência de título de anticorpos anti-*T. gondii* em cães é conhecida na região metropolitana de Curitiba, em Londrina e em Jaguapitã. Na região metropolitana de Curitiba, a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães foi analisada por GIOVANNONI (1958) através da reação de Sabin-Feldman, encontrando 51,5% de sororeagentes. Desde 1958, nenhum outro trabalho havia sido conduzido na região de Curitiba, para avaliar como se encontra o perfil sorológico da toxoplasmose nos cães. Neste trabalho, com uma amostragem de 513 animais a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* foi de 46,8%. Provavelmente a menor prevalência seja devido ao fato da utilização de uma amostra maior no presente trabalho (513 contra 66 animais), diminuindo assim a probabilidade de erros amostrais, e ao uso de técnicas sorológicas diferentes. O alto índice de prevalência de anticorpos anti - *T. gondii* observado em cães de Curitiba, sugere que o parasita continua disseminado no ambiente. Trabalho realizado por FREIRE *et al.* (1992), estudou a prevalência de anticorpos anti - *T. gondii* em cães que deram entrada no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, observando 75,98% de sororeagentes no método de Imunofluorescência Indireta. Já na região de Jaguapitã, GARCIA *et al.* (1999a) observaram prevalência de 84,1% em cães provenientes de propriedades rurais da região, usando também o método de imunofluorescência indireta. Estas prevalências observadas no Paraná são superiores as obtidas no presente trabalho, pelo fato do título de 1/16 ser



considerado positivo por FREIRE *et al.* (1992) e por GARCIA *et al.* (1999a) enquanto no presente trabalho o título de 1/40 era considerado como positivo.

No Brasil, a prevalência de anticorpos anti – *T. gondii* cães é conhecida nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Amapá, Goiás e Rondônia (TABELA 12). As prevalências observadas, varia de acordo com a região estudada, o tamanho da amostra, as técnicas utilizadas (com sensibilidade e especificidade diferentes) e o manejo da população estudada (VIDOTTO, 1992).

Os estudos soroepidemiológicos realizados com cães no Brasil, tem demonstrado que a infecção por *T. gondii* é muito freqüente. As taxas de soropositividade variam de 3,1 até extremos de 94% de sororeagentes (TABELA 12).

As grandes variações na porcentagem de animais sororeagentes ao *T. gondii*, podem ser explicadas pelas diferenças de sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos usados, valor do ponto de corte para separar os animais reagentes dos não reagentes, se os animais apresentam ou não sinais clínicos de toxoplasmose, variações regionais, hábitos alimentares e variações no manejo da população que está sendo estudada.

A importância do conhecimento da prevalência de cães sororeagentes à toxoplasmose, reside no fato de que, provavelmente, o cão e o homem adquirem a infecção toxoplásmica através das mesmas fontes (GARCIA *et al.*, 1999a), já que participam do mesmo habitat (FREIRE *et al.*, 1992). As fontes mais prováveis de contaminação pós-natal do homem com *T. gondii* são a água ou alimentos contaminados com oocistos provenientes de fezes de felinos ou, a ingestão de carne crua ou mal cozida com cistos tissulares do parasita (DUBEY, 1998), sendo estas também as prováveis fontes de contaminação dos cães. JACKSON *et al.* (1987) e CABRAL *et al.* (1998) relataram que uma prevalência elevada da toxoplasmose em cães, pode demonstrar um ambiente altamente contaminado, visto que a infecção é facilitada pelos seus hábitos alimentares e estreito contato com o solo.

Então os cães, funcionariam como indicadores do risco a que o homem está exposto de adquirir infecção por *T. gondii*, pelos seus hábitos alimentares e pelas condições do ambiente onde vive.

**TABELA 12- PREVALÊNCIAS DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Toxoplasma gondii* EM CÃES REGISTRADAS EM DIVERSOS INQUÉRITOS SOROLÓGICOS NO BRASIL NO PERÍODO DE 1958 A 2001. CURITIBA, PARANÁ, 2001**

Estado	Teste Sorológico	n <sup>o</sup> de animais	% de reagentes	Referência
São Paulo	IFI	80	94,0	Ishizuka <i>et al.</i> , 1974
São Paulo	IFI	210	72,0	Ishizuka <i>et al.</i> , 1974
São Paulo	SF	20	90,0	Sogorb <i>et al.</i> , 1976
São Paulo	IFI	1256	63,8	Ishizuka, Yasuda; 1981
São Paulo	IFI	47	63,8	Salata <i>et al.</i> , 1985
São Paulo	IFI	657	91,0	Germano <i>et al.</i> , 1985
São Paulo	IFI	276	46,1	Domingues <i>et al.</i> , 1998
São Paulo	ELISA	276	62,5	Domingues <i>et al.</i> , 1998
Minas Gerais	IFI	243	47,3	Ribeiro <i>et al.</i> , 1992
Minas Gerais	HAI	40	22,0	Silva <i>et al.</i> , 1997
Minas Gerais	IFI	40	35,0	Silva <i>et al.</i> , 1997
Minas Gerais	ELISA	40	35,0	Silva <i>et al.</i> , 1997
Minas Gerais	HAI	218	52,7	Cabral <i>et al.</i> , 1998
Minas Gerais	IFI	327	55,0	Cabral <i>et al.</i> , 1998
Minas Gerais	HAI	168	36,0	Mineo <i>et al.</i> , 2001
Minas Gerais	IFI	168	36,0	Mineo <i>et al.</i> , 2001
Minas Gerais	ELISA	168	36,0	Mineo <i>et al.</i> , 2001
Rio Grande do Sul	HAI	64	3,1	Chaplin <i>et al.</i> , 1980*
Rio Grande do Sul	HAI	43	21,0	Chaplin, Silva; 1984*
Rio de Janeiro	SF	101	79,2	Coutinho, 1968
Goiás	SF	35	57,1	Fernandes, Barbosa; 1972
Amapá/Rondônia	HAI	19	68,4	Ferrarone, Marzochi; 1978
Paraná	SF	66	51,5	Giovanoni, 1958
Paraná	IFI	254	75,98	Freire <i>et al.</i> , 1992
Paraná	IFI	189	84,1	Garcia <i>et al.</i> , 1999
Paraná	IFI	231	35,0	Presente trabalho
Paraná	ELISA	513	46,8	Presente trabalho
Santa Catarina	IFI	158	49,36	Presente trabalho
Santa Catarina	ELISA	158	50	Presente trabalho

\*Citado por VIDOTTO, 1992.

Legenda: HAI=hemaglutinação indireta, SF=reação de Sabin-Feldman, IFI=imunofluorescência indireta; ELISA=enzimaimunoensaio indireto.

## **6. CONCLUSÕES**

1. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o método de IFI e o método de ELISA indireto (IgG) padronizado são equivalentes e que a correlação entre os resultados obtidos com estes métodos é alta e positiva (0,87).
2. O método de ELISA indireto (IgG) padronizado mostrou-se eficiente para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose em cães.
3. Não foram observadas reações cruzadas com o antígeno de *Leishmania* spp.
4. O ELISA indireto (IgG) padronizado deve ser indicado para processos de triagem sorológica e em estudos soropidemiológicos, enquanto a IFI (IgG) deve ser indicada principalmente como método de diagnóstico individual em cães que manifestem sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose.
5. As freqüências de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas populações de cães dos municípios de Canoinhas (n=158) e Curitiba (n=231) foram de 49,36% e 35% respectivamente, no método de Imunofluorescência Indireta.
6. As freqüências de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas populações caninas dos municípios de Canoinhas (n=158) e Curitiba (n=513) foram de 50% e 46,8% respectivamente, pelo do método de ELISA indireto.
7. Após a correção das frequências de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, de acordo com a copositividade e conegatividade do método de ELISA usado para a sorologia, observamos uma prevalência estimada de toxoplasmose em cães dos municípios de Canoinhas e Curitiba de 46,5% e 42,7% respectivamente.
8. Na população canina de Canoinhas, a prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* observada no método de ELISA indireto (IgG) apresentou um perfil crescente de sororeagentes com o avançar da idade dos animais. Nesta mesma população de cães, não foram observadas diferenças estatisticamente

significantes entre as proporções de reagentes, quando considerados o sexo e a raça dos animais.

9. Na população de cães de Curitiba, os animais adultos apresentaram maior proporção de sororeagentes em relação aos animais jovens, pelo método de ELISA indireto (IgG). Não foram observadas diferenças significativas em relação ao sexo dos animais e a porcentagem de sororeagentes.
10. Pelo presente estudo, foi verificado que o *Toxoplasma gondii* se encontra amplamente distribuída na população canina dos municípios de Canoinhas, SC e Curitiba, PR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO NETO, V. Toxoplasmose: aspectos clínicos, diagnósticos, terapêuticos e profiláticos. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 77, p. 151-156, 1971.

AMATO NETO, V.; CAMPOS, R.; BARUZZI, R.G.; DUARTE, M.I.S. **Toxoplasmose**. São Paulo: Sarvier, 1982. 155p.

AGANGA, A.O.; ORTESE, A.A. A serological survey of *Toxoplasma gondii* in pets dogs in Nigéria. **British Veterinary Journal**, London, n.104, p.207-209, 1984.

BITTENCOURT, A.L. Frequência da transmissão congênita. *In*: Bittencourt AL (ed) **Infecções congênitas transplacentárias**, Revinter, Rio de Janeiro, p.3-7, 1995.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico, Rio de Janeiro, p.107-117, 2000.

BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; TONIOLLO, G.H.; SABATINI, G.A.; MORAES, F.R.; PAULILLO, A.C.; FERRAUDO, A.S. Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam.86, p.143-145, 1999.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K.; BORTOLIERO, A.L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.30, n.1, p.21-25, 1997.

CABRAL, D.D.; SILVA, D.A.O.; MINEO, F.A.; FERREIRA, F.A.; DURAN, F.P. Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Uberlândia – MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 87-90, 1998.

CABRAL, D.D.; SILVA, D.A.O.; MIRANDA, E.O.; CUNHA, L.; FUKUSSIMA, A.C.; STUTZ, W.; BASTOS, J.E.D.; FERREIRA, F. A. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* specific antibodies in dogs in the rural areas of Uberlândia, MG, Brazil. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.4, n.1, p.15-19, 1998.

CALAMEL, M., DUFOUR, P. Sérodiagnostic de la toxoplasmose: comparaison des titres d'unités internationales obtenus par l'IFI en dilution finale et par ELISA en dilution unique selon un modèle informatisé. **Révue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 136, p. 645-651, 1985.

CAMARGO M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.6, p.117-118, 1964.

CANTOS, G.A.; PRANDO, M.D.; SIQUEIRA, M.V.; TEIXEIRA, R.M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.46, n.4, p.335-341, 2000.

CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, Paris, v.4, p.518-519, 1911.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. 375p.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 843p.

COUTINHO, S.G.; ANDRADE, C.M.; LOPES, A.C.; CHIARINI, C.; FERREIRA, L.F. Observações sobre a presença de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em cães da área suburbana do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 6, p.285-295, 1968.

DE ANDRADE CHIARI, C.; PEREIRA NEVES, D. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n.79, p.337-340, 1984.

DEROUIN, F.; THULLIEZ; P. Diagnostic Biologique de la Toxoplasmose. **Laborama**, Paris, n.33, p.2-17, 1995.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J.; THULLIEZ, Ph.; SAINT-JOIGNY, C. Sérodiagnostic de la toxoplasmose acquise. Des méthodes simples pour des questions précises. **Concours Medical**, Paris, v.107, n.3, p.227-234, 1985.

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**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 79-85, 1998.

DUBEY J.P. Toxoplasmosis in dog. **Canine Practice**, Mission Viejo, v. 12, p. 7-28, 1985.

DUBEY J.P. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 17, p. 1389 – 1404, 1987.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of animals and man**. New York: CRC Press, p.28-29, 1988.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative Assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, Bethesda, v.8, p.871, 1971.

FERRARONI, J.J.; MARZOCHI, M.C.A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos humanos da Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.75, p.99-109, 1980.

FERNANDES, W.J.; BARBOSA, W. Toxoplasmose – Notas sobre sua ocorrência em animais domésticos em Goiânia (1970). **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v.1, n.2, p.259-265, 1972.

FREIRE, R. L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; TUDURY, E. A., VIANNA, C. C. Prevalência de anticorpos anti - *Toxoplasma gondii* em cães atendidos no Hospital Veterinário da UEL-PR. **Semina**, Londrina, v. 13, n. 1, p.66-69, 1992.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmose. *In*: Veronesi. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. São Paulo: Atheneu, p. 1290-1305, 1997.

FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis: mechanisms of infection, laboratory diagnosis and management. **Current Topics in Pathology**, Berlin, v.54,p.28-75, 1971.

FRENKEL, J.K; HASSANEIN, K.M.; HASSANEIN, R.S.; BROWN, E.; THLLIEZ, P.; QUINTERO-NUÑEZ, R. Transmission of *Toxoplasma* in Panamá City, Panamá: a five year prospective study of children, cats, rodents, birds and soil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, North Brook, v.53, p.458-468, 1995.

FRENKEL, J.K; LINDSAY, D.S.; PARKER, B.B. O papel dos cães na transmissão mecânica da Toxoplasmose. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v.23, n.2, p.55, 1995.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n1, p.99-104, 1999a.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine, bovine, ovine and equine, and their correlation with human, felines and canines, from farms in north region of Paraná State, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n1, p.91-97, 1999b.

GERMANO, P. M. L.; ERBOLATO, E. B.; ISHIZUKA, M. M. Serological survey of toxoplasmosis in dogs with the Indirect Immunofluorescence test in Campinas city, 1981. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 53-58, 1985.

GIOVANONI, M. Considerações gerais sobre *Toxoplasma* e a toxoplasmose. Isolamento do agente etiológico e pesquisa de anticorpos em cães. Curitiba, 1958. 64p. **Tese de Cátedra**. Escola Superior de Agricultura e Veterinária do Paraná.



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, v. 20, n. 1, p.55-58, 1987.

ISHIZUKA, M.M. Comparative study of the Sabin-Feldman and indirect immunofluorescence tests for the detection of anti-*Toxoplasma* antibodies in serum samples from dogs. II. Comparison with haemagglutination test. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, São Paulo, v. 11, p.127-138, 1974.

ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O.; BROGLIATO, D.F. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de cães do município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, São Paulo, v. 11, p.115-125, 1974a.

ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O.; BROGLIATO, D.F. Estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e Imunofluorescência indireta para avaliação de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de cães. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, São Paulo, v. 11, p.127-132, 1974b.

ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O.; BROGLIATO, D.F. Estudo comparativo das provas de Sabin-Feldman (SF) e Imunofluorescência indireta (IFI) com a de Hemaglutinação (HAI) para a avaliação de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de cães. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, São Paulo, v. 11, p.133-138, 1974.

ISHIZUKA, M.M.; YASUDA, P.N. Incidência de infecção por *Toxoplasma gondii* em cães no município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, São Paulo, v. 18, p.161-165, 1981.

ISRAELSKI, D.M.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clinical Infectious Disease**, v.17, n.2, p.423-435, 1993.

JACKSON, M.H.; HUTCHISON, W.M.; SIIM, J.C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in meat animals, cats and dogs in central Scotland. **British Veterinary Journal**, London, v.143, n.2, p.159-165, 1987.

JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of the macula lutea in na eye of normal dimensions and in a microphthalmic eye with parasites inthe retina. **Casopis Lekarů Ceskych**, Prague, v.62, p.1021-1052, 1923.

KAVINSKI, L.C. Lesões oculares em cães clinicamente suspeitos de cinomose. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v.2, p.67-70, 1980.

KNOLL,L.J.; BOOTHROYD, J.C. Molecular biology's lessons about *Toxoplasma* development: Stage-speciic homologs. **Parasitology Today**, Cambridge, v.14, p.490-493. 1998.

LAPPIN, M.R. Doenças Infecciosas. *In*: LORENZ, M.D.; CORNELIUS, L.M.; FERGUSON, D.C. **Terapêutica clínica em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Interlivros, p.269-270, 1996.

LEVINE, N.D. Taxonomy of *Toxoplasma*. **Journal of Protozoology**, Lawrence, v.24, p.36-41, 1977.

LIN, D.S. Seroprevalences to *Toxoplasma gondii* in privately-owned dogs in Taiwan. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.35, p.21-27, 1998.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; BUTLER, J.M.; BLAGBURN, B.L. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.73, p.27-33, 1997.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCAS, S.R.R.; HAGIWARA, M.K.; RECHE, A.J.; GERMANO, P.M.L. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Seropédica, v.35, n.1, 41-45, 1998.

MARTIN, C. Recherche de l'infection toxoplasmique du chien par méthode de l'immunofluorescence. Toulouse, **Tese**, 1972 .

MELLO, G. Un cas de toxoplasmose du chien observé à Turin. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, Paris, v.3, p.359-363, 1910.

MINEO, T.W.P.; SILVA, D.A.O.; COSTA, G.H.N.; VON ANCKEN, A.C.B.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.98, p.239-245, 2001.

MINOZZO, J.C. Padronização da técnica de ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina. **Tese de Mestrado**. Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, 1997.

MITSUKA, R.; NAVARRO, I.T.; BECKNER DA SILVA, A.C.; BREGANÓ, J.W.; ALFIERI, A.; JANKEVICIUS, J.V.; VIDOTTO, O. *Toxoplasma gondii*: II. Caracterização antigênica de taquizoítos de oito amostras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Seropédica, v.35, n.3, 1998.

MIURA, E. Infecções congênitas e perinatais. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, n.69, p.80-96, 1993.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organimes voisins) du gondi. **Clinical Reviews of Academic Science**, v. 147, p. 763 – 766, 1909.

NOGUEIRA, S.A.; MOREIRA, R.B.; PEREIRA, N.G. Toxoplasmose. Diagnóstico e Tratamento. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v.71, n.2, p.38-44, 1996.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 596p.

PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 872p.

PIMENTA, A. L.; PIZA, E. T.; CARDOSO, Jr; DUBEY, J. P. Visceral toxoplasmosis in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.45, p.323-326, 1993.

PINNILA, N.E.M.; DUBEY, J.P.; CHOROMANSKI, L.; WIEGEL, R.M. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.85, n.5, p.855-860, 1999.

PIPPER, R.C. Natural and experimental ocular toxoplasmosis in animals. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v.69, p.662-668, 1970.

REICHE, E.M.; MORIMOTO, H.K.; FARIAS, G.N.; HISATSUGU, K.R.; GELLER, L.; GOMES, A.C.L.F.; INOUE, H.I.; RODRIGUES, G.; MATSUO, T. Prevalence of american trypanosomiasis, syphilis, toxoplasmosis, rubella, hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency virus infection, assayed through serological tests among pregnant patients, from 1996 to 1998, of the Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (Londrina State University, Paraná, Brazil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.33, n.6, p.519-527, 2000.

REY, L. **Parasitologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731p.

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

RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; SPIEWAK, G.; CURY, M.C.. Frequência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.44, n.1, p.67-68, 1992.

ROGAN, M.T. Analytical Parasitology. **Springer Verlag Berlin Heidelberg**, New York, p.338-345, 1997.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalites in children. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.116, p.801-807, 1941.

SACKS, J.J.; ROBERTO, R.R.; BROOKS, N.F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, n.248, p.1728-1732, 1982.

SALATA, E.; YOSHIDA, E.L.A.; PEREIRA, E.; CORRÊA, F.M.A. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.27, n1, p.20-22, 1985.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SAWCHUCK, S.A. Acute CNS toxoplasmosis in a dog. **Canine Practice**, Mission Viejo, v. 8, p.37-40, 1981.

SCHLOGEL, F. Ocorrência de toxoplasmose em cães suspeitos de raiva. **Revista do Instituto de Medicina Tropical da USP**, São Paulo, v.9, p.304-308, 1967.

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, v. 92, n. 6, p 785-789, 1997.

SOGORB, S.F.; JAMRA, L.F.; GUIMARÃES, E.C. Toxoplasmose em cães de São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.18, n.1, p.36-41, 1976.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molto punti il Kalauzar dell'uomo. **Revista da Sociedade Científica**, São Paulo, v.3, p.109-112, 1908.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, New York, v.30, p.1217-1258, 2000.

VIDOTTO O. Toxoplasmose: Epidemiologia e Importância da doença na saúde animal. **Semina**, Londrina, v.13, n.1, p.69-75, 1992.

UCHÔA, C.M.A.; DUARTE, R.; LAURENTINO – SILVA, V.; ALEXANDRE, G.M.C.; FERREIRA, H.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de Imunofluorescência indireta. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, p. 661-669, 1999.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 247-251.

VAN KNAPEN, F.V. Immunodiagnosis of Toxoplasmosis. **Drukkerij Veenman BV**, Wageningen, 1984.

WOLF, A.; COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to a protozoan (*Toxoplasma or Encephalitozoon*). I. Identification of a case from the literatura. **Bulletin of the Institute Neurology of the New York**, New York, v.7, p.266-283, 1938.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

**AUTORIZAÇÃO PARA COLHEITA DE SANGUE.**

Eu abaixo assinado, proprietário do (a) doador  
(a) \_\_\_\_\_, da raça  
\_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_,

idade \_\_\_\_\_; autorizo a Dra DANIELA PEDRASSANI, ou qualquer outra  
pessoa que ela designar como seu assistente, a colher sangue do referido animal.

Certifico que li e compreendi a autorização acima e a razão pelos quais os mesmos  
são necessários, suas vantagens e possíveis complicações, assim como possíveis  
alterações, as quais para foram explicadas. Também certifico que nenhuma garantia  
ou certeza foram dadas quanto aos resultados.

Proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

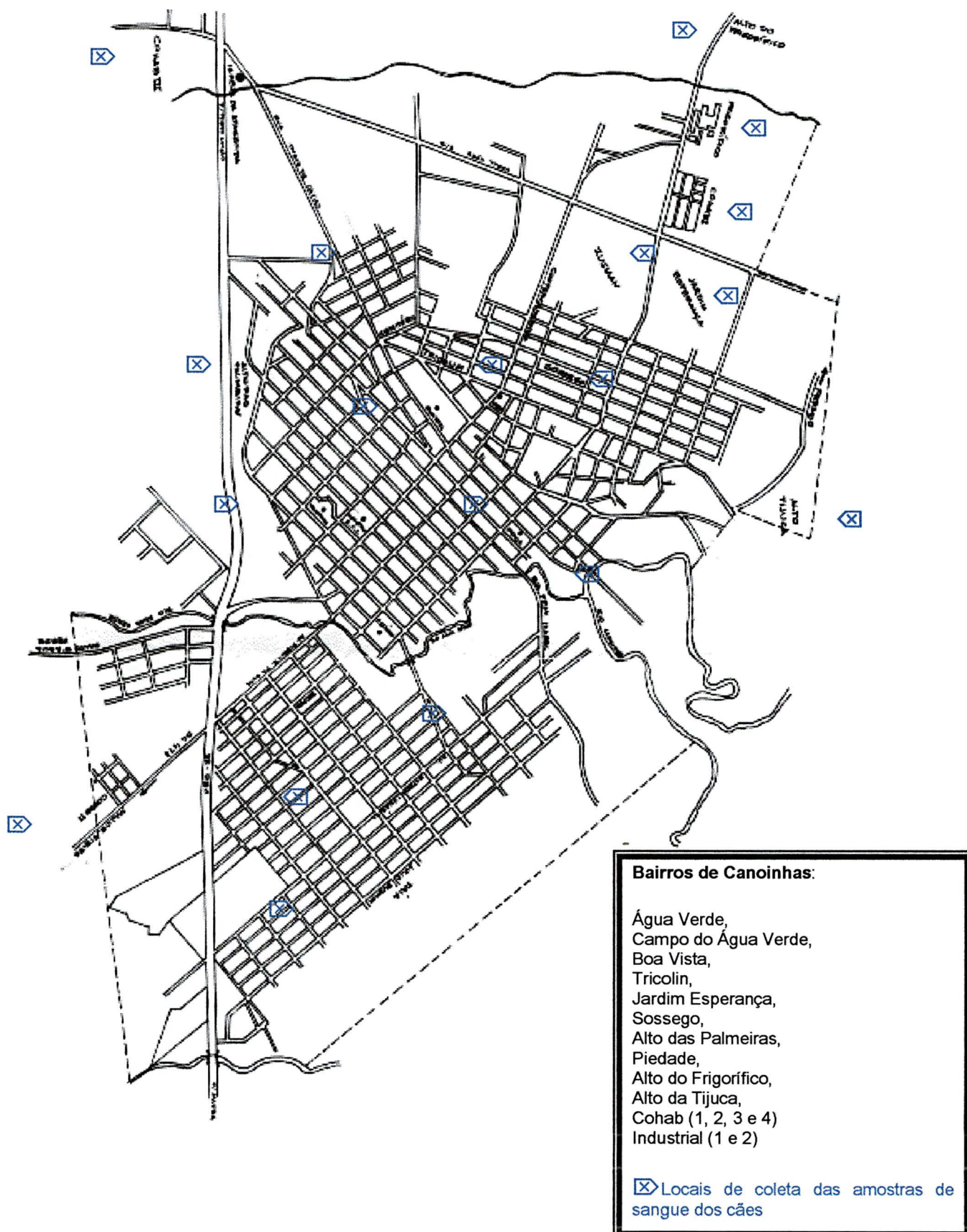
Fone: \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Proprietário

**ANEXO 2**

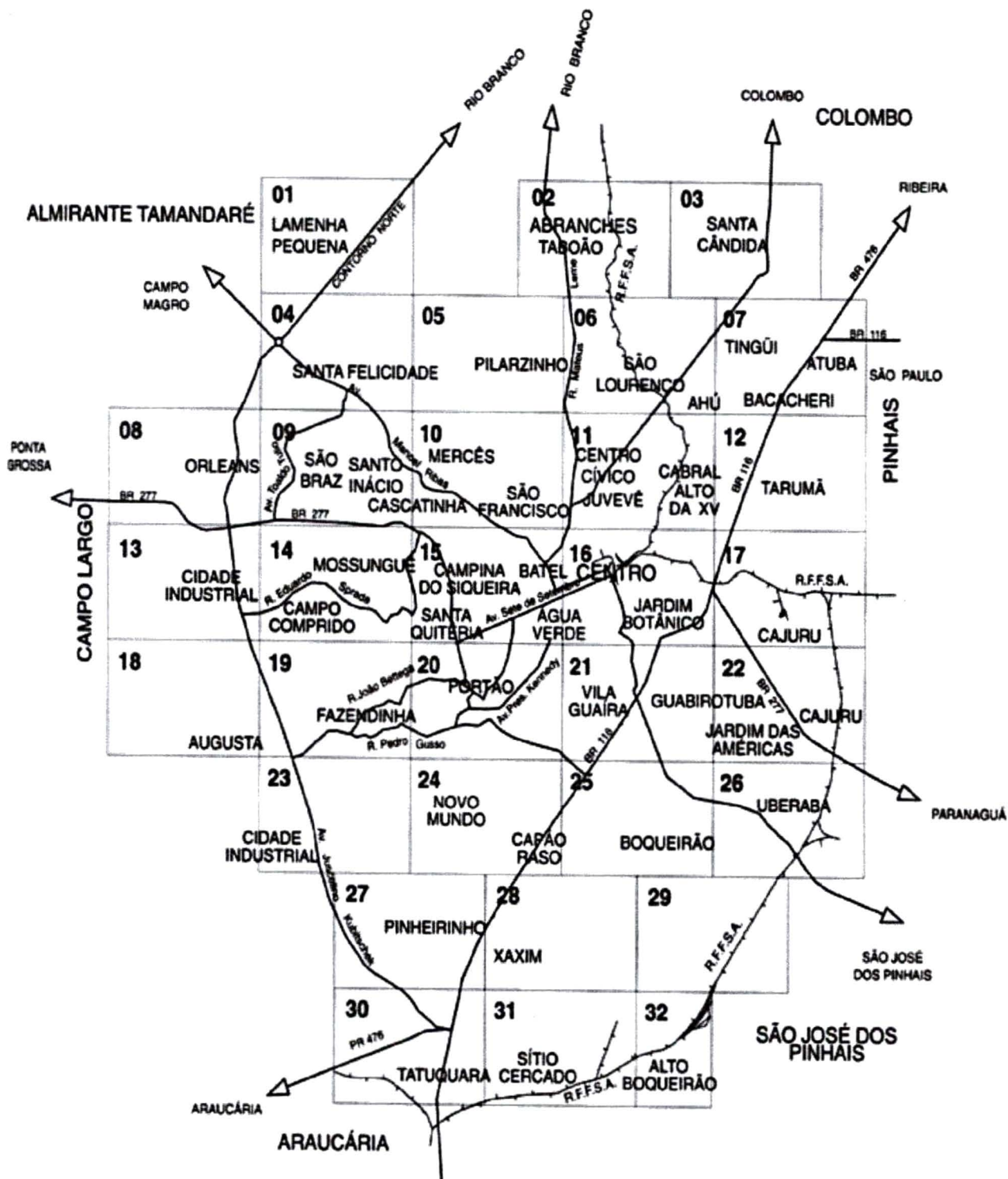
LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS BAIRROS DO MUNICÍPIO DE CANOINHAS/SC, INDICANDO LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE SOROS DOS CÃES.





**ANEXO 3**

LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS BAIRROS DO MUNICÍPIO DE CURITIBA/PR, INDICANDO OS BAIRROS DE PROCEDÊNCIA DOS CÃES USADOS PARA A OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOROS.



## ANEXO 4

### MÉTODO DE CONTAGEM DE PARASITAS PELA CÂMARA DE THOMA

1. Usar o antígeno diluído em PBS (pH 7,2).
2. Verificar a mobilidade dos parasitas.
3. Realizar contagem do número de parasitas em Hemocitômetro no aumento de 400 vezes.
4. Diluir os parasitas na proporção de 1/10 da concentração observada.
5. Realizar contagem do número de parasitas em Câmara de Thoma.
6. Colocar uma gota da solução antigênica diluída na câmara de Thoma e deixar que a mesma penetre por capilaridade entre a lâmina e a lamínula.
7. Contar o número de parasitas observados em 16 cubos de tamanho intermediário (volume de cada cubo= $1/250 \text{ mm}^3$ ).
8. Fazer uma média do número de parasitas por cubo da câmara.
9. Repetir os procedimentos 7 e 8 por quatro vezes.
10. Determinar a média final do número de parasitas observados por cubo intermediário da Câmara de Thoma e multiplicar esta média por  $250 \times 10^3$ .

**ANEXO 5****SOLUÇÕES USADAS PARA A DOSAGEM DE PROTEÍNA****(LOWRY *et al.*, 1951).****REATIVOS:**

- a) 20 g de carbonato de sódio anidro;  
4 g de hidróxido de sódio;  
água destilada q.s.p. para 1000 mL.
  
- b) 2 g de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>)  
água destilada q.s.p. para 100 mL.
  
- c) 4 g de tartarato de sódio;  
água destilada q.s.p. para 100 mL.
  
- d) Reativo de Folin – Ciocalteau (Comercial).
  
- e) Solução padrão de Soroalbumina Bovina (BSA), para a curva padrão.  
20 mg de BSA em balão volumétrico de 100 mL;  
1 a 2 gotas de hidróxido de sódio diluído;  
água destilada q.s.p. para 100 mL.  
Esta solução contém 100 µg de albumina por 0,5 mL.

**PROCEDIMENTO TÉCNICO:**

1. Ligar o espectrofotômetro.
2. Preparar o reagente A

2mL de tartarato de sódio e potássio a 4%;  
2mL de sulfato de cobre a 2%;  
diluir em 100mL de carbonato de sódio anidro a 3% em NaOH 0,1N.

## 3. Preparar o reagente B

1 volume do Reagente de Folin – Ciocalteau
--

2 volumes de água destilada.
------------------------------

4. Homogeneizar em vórtex o tubo com a solução de antígeno.
5. Adicionar água destilada em cada tubo e, a seguir, a amostra do antígeno (sempre em duplicata) ou o padrão de BSA. A quantidade final deverá ser sempre de 500 $\mu$ l.
6. Acrescentar 500 $\mu$ l de água destilada no tubo Branco.
7. Homogeneizar em vórtex.
8. Adicionar 5 mL da solução A em cada tubo, homogeneizar em vórtex. Aguardar 10 minutos.
9. Adicionar 0,5 mL da solução B em cada tubo, homogeneizar em vórtex. Aguardar 10 minutos.
10. Proceder a leitura em espectrofotômetro imediatamente em 660nm.
11. Anotar a densidade ótica de cada amostra.
12. Fazer o cálculo da concentração protéica da amostra, de acordo com a equação da curva padrão de BSA.

### CURVA PADRÃO DE SOROALBUMINA BOVINA (LOWRY *et al.*, 1951).

**OBJETIVO:** obter uma curva padrão com 5 pontos de concentração de uma proteína pura conhecida (BSA): 20 $\mu$ g, 40 $\mu$ g, 60 $\mu$ g, 80 $\mu$ g e 100 $\mu$ g em 500 $\mu$ l de solução.

Tubo	BSA ( $\mu$ g)	Padrão( $\mu$ l) (0,2mg/ml)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	ReagenteA (ml)	ReagenteB (ml)	Densidade Ótica
1	20	100	400	5	0,5	0,030
2	20	100	400	5	0,5	0,020
3	40	200	300	5	0,5	0,047
4	40	200	300	5	0,5	0,042
5	60	300	200	5	0,5	0,067
6	60	300	200	5	0,5	0,077
7	80	400	100	5	0,5	0,090
8	80	400	100	5	0,5	0,092
9	100	500	0	5	0,5	0,098
10	100	500	0	5	0,5	0,109
11	Branco	0	500	5	0,5	0,000

Tubo	Amostra( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	ReagenteA (ml)	ReagenteB (ml)	Densidade Ótica
1	50	450	5	0,5	0,060
2	50	450	5	0,5	0,048

$$Y=0,001X + 0,0061$$

$$0,054=0,001X+ 0,0061$$

$$X=47,9$$

$$47,9\mu\text{g} - 50\mu\text{l}$$

$$95,8\mu\text{g} - 100\mu\text{l}$$

$$958\mu\text{g} - 1000\mu\text{l ou } 0,958\text{mg/mL}$$

**ANTÍGENO= 0,958mg/mL**

**ANEXO 6****SOLUÇÕES USADAS PARA O TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA****1.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
- 1000 mL água destilada (q.s.p.)

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

**2.SOLUÇÃO DE AZUL DE EVANS A 1/1000****3.SOLUÇÃO DE AZUL DE EVANS DILUÍDA**

- 0,5 mL de PBS pH 7,2
- 49,5 mL de Solução mãe de Azul de Evans.

**4.GLICERINA TAMPONADA A 90%.**

**ANEXO 7****SOLUÇÕES USADAS PARA O TESTE DE ELISA****1. 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 2 mg
- Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
- Tween 20

**2. SOLUÇÃO TAMPÃO CARBONATO 0,005 M (COATING BUFFER)**

- Solução A: 1,1g de  $Na_2CO_3$  para 200mL de  $H_2O$  deionizada
- Solução B: 4,2g de  $NaHCO_3$  para 1 litro de  $H_2O$  deionizada  
Acertar o pH para 9,6 adicionando a solução A em B

**3. SOLUÇÃO DE LAVAGEM**

- 9 g de  $NaCl$
- 0,5 mL de Tween 20
- $H_2O$  (destilada) q.s.p. 1 litro

Adicionar Tween 20 após dissolver o  $NaCl$ . É necessário aquecer o Tween em banho maria para facilitar a pipetagem do volume de 0,5 mL.

#### 4.SOLUÇÃO DE BLOQUEIO DA PLACA

- Caseína 2% em PBS - aquecer para facilitar a dissolução.
- 2 gramas de caseína para 100 mL de PBS pH 7,4.
- 0,05% de Tween20 – com o objetivo de diminuir reações ionospecíficas.

Colocar primeiro o PBS no becker, e só depois colocar a caseína.

#### 5.PBS pH 7,4

Constituição do PBS 0,05 M com 0,15 M de NaCl pH 7,4:

##### Solução A

- 7,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ou 17,85 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ou 13,40 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 8,8 g NaCl
- $\text{H}_2\text{O}$  (destilada) q.s.p. 1 litro

##### Solução B

- 1,4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ou 1,61 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Monohidratado.
- 1,88 g NaCl
- $\text{H}_2\text{O}$  (destilada) q.s.p. 0,2 litros

**Acertar o pH para 7,4 adicionando a solução B em A**

#### 6.TAMPÃO DE INCUBAÇÃO

##### Preparação A

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

##### Preparação B

Tampão de incubação a partir da solução de bloqueio

62,5 mL de solução de bloqueio

0,25 mL de Tween 20

PBS q.s.p. 500 mL

Alicotar em volumes de 10mL e congelar



**7. TAMPÃO CITRATO - pH 5,0**

- 7,10 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ou 13,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 5,19 g de ácido cítrico
- $\text{H}_2\text{O}$  (d) q.s.p. 1 litro

**8. SOLUÇÃO SUBSTRATO - OPD 2 mg**

- Orto-fenileno-diamino (OPD) –2 mg
- 2  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$
- 10 mL 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 o 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.

**9. SOLUÇÃO DE PARADA DA REAÇÃO**

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

## ANEXO 8

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CANOINHAS/SC, ANALISADOS PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI – *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001.

NÚMERO DO SORO DE CANOINHAS	TÍTULO NA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
1	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
5a	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5b	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
7	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
11	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
17	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
19	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
20	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
21	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
24	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
25	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
26	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
27	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
28	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
29	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
30	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
31	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
32	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
34a	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
34b*	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
35	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
36	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
37	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
38	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
39	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
40	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CANOINHAS/SC, ANALISADOS PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI – *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001 – CONTINUAÇÃO.

41	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
41b	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
42	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
43	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
44	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
45	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
46	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
48	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
47	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
49	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
50	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
51	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
52	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
53	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
54	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
55a	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
55b	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
56	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
57	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
58	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
59	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
60	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
61	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
62	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
63	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
64	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
65	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
66	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
67	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
68	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
69	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
70	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
71	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
72	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
73	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
74	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
75	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
76	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
77	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
78	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
79	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
80	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CANOINHAS/SC, ANALISADOS PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI – *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001 – CONTINUAÇÃO.

81	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
82	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
83	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
84	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
85	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
86	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
87	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
88	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
89	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
90	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
91	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
92	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
93	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
95	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
96	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
97	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
98	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
99	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
100	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
101	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
103	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
104	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
105	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
106	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
107a	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
107b	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
108	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
109	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
110	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
111	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
112	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
113a	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
113b	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
114	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
115	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
116	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
117	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
118	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
119	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
120	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
121	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
122	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CANOINHAS/SC, ANALISADOS PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI – *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001-CONCLUSÃO.

123	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
124	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
125	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
126	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
127	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
128	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
129	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
130	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
131	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
132	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
133	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
134	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
135	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
136	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
137	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
138	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
139	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
140	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
141	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
142	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
143	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
144	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
145	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
146	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
147	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
148	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
149	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
150	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
151	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
152	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
153	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
154	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
155a	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
155b	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
156	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

## ANEXO 9

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE IFI E ELISA INDIRETA PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI – *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001

IFI Cães Curitiba	IFI 1:20	IFI 1:40	IFI 1:80	IFI 1:160	IFI 1:320	IFI 1:640	ELISA	DO
33	pos	pos	neg	neg	neg	neg	Pos	0,258
40	pos	pos	pos	neg	neg	neg	Pos	0,244
62	pos	pos	neg	neg	neg	neg	Pos	0,255
72	pos	pos	neg	neg	neg	neg	Pos	0,236
102	pos	pos	pos	pos	neg	neg	Pos	0,252
01v	pos	pos	pos	pos	pos	neg	Pos	0,898
06v	pos	pos	pos	neg	neg	neg	Pos	0,254
12v	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	0,071
14f	pos	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	0,468
15f	pos	pos	neg	neg	neg	neg	Pos	0,165
25v	pos	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	0,070
26f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	Pos	0,296
27f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,157
2f	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	0,470
33v	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	0,654
3f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,255
43v	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,048
48f	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,101
4f	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,174
51v	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,099
52v	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,096
60v	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,056
60v	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,204
62v	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,221
64v	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,047
65v	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,248
68v	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,107
68v	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,101
71v	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	0,212
73v	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,253
75v	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,447
70f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,062
20f	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,490
41f	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,110
76f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,063
08f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,055
09f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,614
42f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,094
66f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,076
32f	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,173
40f	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,113

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE IFI E ELISA INDIRETA PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI – *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001-CONTINUAÇÃO.

IFI Cães Curitiba	IFI 1:20	IFI 1:40	IFI 1:80	IFI 1:160	IFI 1:320	IFI 1:640	ELISA	DO
10f	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,104
39f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,094
38f	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	0,396
35f	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	0,274
21f	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,165
53f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,097
37f	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,111
76v	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,059
5f	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	0,398
69f	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,232
24f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,063
34f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,353
46f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,064
29f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,379
74f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,063
13f	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	0,506
47f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,278
72f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,081
36f	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,156
7f	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,104
61f	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,366
59f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,292
17f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,082
28f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,090
18f	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,163
23f	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	0,503
67f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,042
58f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,183
19f	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	0,490
16f	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,361
77f	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	0,093
50f	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,031
31f	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,091
11f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,019
22f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,110
30f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,090
54f	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,016
b9801-1-1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,018
b11203	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,418
tiuly 17005	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,258
b8104	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,380

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE IFI E ELISA INDIRETA PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI - *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001-CONTINUAÇÃO.

IFI Cães Curitiba	IFI 1:20	IFI 1:40	IFI 1:80	IFI 1:160	IFI 1:320	IFI 1:640	ELISA	DO
b16102	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,103
b7804	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,468
b504	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	0,685
b8504	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,089
b14005	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,072
b2505	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,038
44f	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,197
b18601-1-1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,026
b16202	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,040
b804	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,590
catucha43-05	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,270
b20703	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,043
lumi13604-71	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,380
b13201	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,614
b23004	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,016
b3003	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,495
b16705	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,059
b6202	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,031
piu214	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,224
b12410-7	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,405
b10403	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,036
b1305	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,067
b14204	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,467
b17205	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,056
b0774	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,629
b2184	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	0,237
b2002	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,546
b018495	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,080
b18201-1-1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,070
b10901	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,049
b8212	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,119
b8705	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,201
b21603	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,183
b7004	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,229
b5101	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,028
b13102	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,010
b13602	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,029
b14304	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,348
b19703	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,057
b9402	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,027
b11510-7	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,037



RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE IFI E ELISA INDIRETA PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI - *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001-CONTINUAÇÃO.

IFI Cães Curitiba	IFI 1:20	IFI 1:40	IFI 1:80	IFI 1:160	IFI 1:320	IFI 1:640	ELISA	DO
b3612	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,319
b10601	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,047
b130-04	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,492
b13702	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,239
b ruffo4205	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,509
b 9104	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,202
b9002	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,106
b6803	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,108
b4803	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,025
b5701	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,049
b6301	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,018
b4002	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,097
b7004	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,358
b5302	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,215
b4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,066
b5501	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,068
b30.09(31)	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,089
b5701	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,053
b266.08(4)	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	0,173
b266.08(3)	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,254
23	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,154
83	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,012
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,101
95	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,038
21	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,018
90	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,395
80	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	1,111
35	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,007
73	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,106
12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,101
48	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,022
99	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,071
91	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,085
100	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,039
53	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,075
96	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,065
82	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,005
31	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,055
3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,070
56	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,097
4	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,282

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE IFI E ELISA INDIRETA PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI - *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001-CONTINUAÇÃO.

IFI Cães Curitiba	IFI 1:20	IFI 1:40	IFI 1:80	IFI 1:160	IFI 1:320	IFI 1:640	ELISA	DO
74	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,005
52	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,054
79	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,084
84	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,109
11	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,162
10	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,109
44	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,075
94	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,047
87	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,099
Nicol 14305	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	0,528
15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,004
97	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,172
89	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,364
93	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,153
88	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	0,928
8	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,114
58	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,100
6	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,057
78	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,089
54	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,492
63	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,069
22	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,167
36	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,109
77	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,098
47	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	0,654
59	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,059
61	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,041
29	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,111
51	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,025
34	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	0,154
9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,107
16	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	0,578
98	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,044
39	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,022
25	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	0,518
92	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,075
66	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,071
18	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,081
85	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0,004
55	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,165
38	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	0,173



## ANEXO 10

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CANOINHAS, SC; REAGENTES NO MÉTODO DE IFI, PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI – *Toxoplasma gondii*; ANALISADOS PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE ANTICORPOS IgG ANTI – *Leishmania* spp. CURITIBA, PARANÁ,2001

Amostra	IFI (1/40)	IFI (1/80)	Amostra	IFI (1/40)	IFI (1/80)
02	negativo	negativo	81	negativo	negativo
04	negativo	negativo	82	negativo	negativo
06	negativo	negativo	83	negativo	negativo
07	negativo	negativo	90	negativo	negativo
10	negativo	negativo	93	negativo	negativo
17	negativo	negativo	95	negativo	negativo
26	negativo	negativo	96	negativo	negativo
28	p/n	negativo	97	negativo	negativo
29	negativo	negativo	103	negativo	negativo
31	negativo	negativo	105	p/n	negativo
32	negativo	negativo	107b	p/n	negativo
34a	negativo	negativo	108	negativo	negativo
34b	negativo	negativo	109	negativo	negativo
36	negativo	negativo	110	negativo	negativo
37	negativo	negativo	112	p/n	negativo
38	negativo	negativo	113a	negativo	negativo
40	negativo	negativo	115	p/n	negativo
41b	negativo	negativo	118	negativo	negativo
42	negativo	negativo	119	negativo	negativo
44	negativo	negativo	123	negativo	negativo
47	negativo	negativo	124	p/n	negativo
49	negativo	negativo	125	negativo	negativo
50	negativo	negativo	127	negativo	negativo
51	negativo	negativo	128	negativo	negativo
53	negativo	negativo	132	negativo	negativo
58	negativo	negativo	134	negativo	negativo
60	negativo	negativo	139	negativo	negativo
63	negativo	negativo	140	negativo	negativo
64	negativo	negativo	141	negativo	negativo
66	negativo	negativo	142	negativo	negativo
67	negativo	negativo	143	negativo	negativo
69	negativo	negativo	145	negativo	negativo
70	negativo	negativo	147	negativo	negativo
71	negativo	negativo	148	p/n	negativo
72	negativo	negativo	149	negativo	negativo
73	negativo	negativo	150	negativo	negativo
76	negativo	negativo	152	negativo	negativo
79	negativo	negativo	153	negativo	negativo
80	negativo	negativo	155b	negativo	negativo

**ANEXO 11 -RELAÇÃO DOS SOROS DE CÃES DE CANOINHAS DE ACORDO COM A RAÇA, IDADE E SEXO. CURITIBA, PR, 2001.**

N.º DO SORO	NOME DO ANIMAL	SEXO	IDADE	RAÇA
1	Deik	macho	6m	SRD
2	Dino	macho	8a	SRD
3	Toby	macho	4a	Cocker Inglês
4	Cartucho	macho	8a	Daschound
5 <sup>a</sup>	Íris	fêmea	8a	Pastor Alemão
5b	Duda	fêmea	6m	SRD
6	Duquesa	fêmea	2a	Poodle
7	Sansão	macho	1a9m	São Bernardo
9	Lion	macho	8m	Boxer
10	Dereck II	macho	5a	Akita
11	Pituco	macho	4a	Poodle
12	Pit	fêmea	2a	Pinscher
13	Kika	fêmea	5a	Daschound
14	Magda	fêmea	3a	Cocker Inglês
15	Zelito	macho	8m	Cocker Inglês
16	Ira	fêmea	5m	Pit Bull
17	Latino	macho	4a	Pequinês
19	Soró	macho	1a	Poodle
20	Índian	macho	4a	Dog Alemão
21	Sharon Stone	fêmea	9m	Fila Brasileiro
23	Sophia	fêmea	5m	Pit Bull
24	Shana	fêmea	10a	Collie
25	Pufa	fêmea	7a	SRD
26	Peggy	fêmea	3a	Cocker Inglês
27	Shana Mota	fêmea	4a	Cocker Inglês
28	Juju	macho	3a	Poodle
29	Cindy	fêmea	3a	Poodle
30	Tiquinho	macho	1a5m	Poodle
31	Rambo	macho	3a	Poodle
32	Rabito	macho	4a	Boxer
33	Robin	macho	4a	Cocker Inglês

N.º DO SORO	NOME DO ANIMAL	SEXO	IDADE	RAÇA
34 <sup>a</sup>	Pretinho	macho	1a3m	SRD
34b	Laika	fêmea	3a	SRD
35	Tabata	fêmea	8m	Boxer
36	Uike	macho	3a	Poodle
37	Loba	fêmea	6m	Husky Siberiano
38	Whisky	macho	3a	Husky Siberiano
39	Quimba	fêmea	9m	SRD
40	Bradock	macho	11a	SRD
41 <sup>a</sup>	Lulu	macho	6,5a	SRD
41b	Lula	macho	2a	SRD
42	Raysa	fêmea	1a	Samoeida
43	Gaspar	macho	6m	Pointer
44	BRAD	fêmea	12a	SRD
45	Tobias	macho	7m	Cocker Inglês
46	Pituxa	fêmea	6a	SRD
47	Shade	fêmea	2a	SRD
48	Chiquinho	macho	2a	SRD
49	Cindy	fêmea	2a	Cocker Inglês
50	Sara	fêmea	6m	Pequinês
51	Dunga	macho	4,5a	SRD
52	Doly	fêmea	6a	Cocker Inglês
53	Haydye	fêmea	10a	Pastor Alemão
54	Preta	fêmea	10m	Basset
55 <sup>a</sup>	Tiger	macho	9m	Pitt Bull
55b	Feroz	macho	8a	SRD
56	Toby II	macho	1a	SRD
57	Tiazinha	fêmea	3,5a	SRD
58	Susi	fêmea	7a	SRD
59	Paquito	macho	3a	SRD
60	Urso	macho	8a	SRD
61	Pitti	fêmea	9m	SRD

N.º DO SORO	NOME DO ANIMAL	SEXO	IDADE	RAÇA
62	Boby	macho	8m	SRD
63	Nino	macho	2a	SRD
64	Black	macho	4a	Pastor Alemão
65	Fofinha	fêmea	4m	SRD
66	Negruska	fêmea	6a	Husky Siberiano
67	Bingo	macho	1a9m	SRD
68	Cocozinho	macho	5a	SRD
69	Fredy	macho	5a	Cocker Inglês
70	Madonna	fêmea	7a	Cocker Inglês
71	Yankee	fêmea	2a6m	SRD
72	Duma	fêmea	2a	Akita
73	Bethowell	macho	6m	SRD
74	Sara II	fêmea	9m	SRD
75	Pretall	fêmea	9m	SRD
76	Dara	fêmea	5a	SRD
77	Pretinho/nino	macho	2a	Poodle
78	Teco	macho	5a	SRD
79	Tigre	macho	5a	SRD
80	Jhuly	fêmea	6a	SRD
81	Boby III	macho	1a7m	Poodle
82	Bodeguito	macho	6a	SRD
83	Black	macho	5a	Poodle
84	Luda	fêmea	4a	Poodle
85	Dada	fêmea	3a	Poodle
86	Matie	macho	4a	Collie
87	Lupy	macho	1a	SRD
88	Bethowen III	macho	1a3m	SRD
89	Rambo	macho	8m	SRD
90	Kelly III	fêmea	5,5a	SRD
91	Pintado	macho	1a	SRD
92	Choinho	macho	2a4m	SRD
93	Alf	macho	3a	SRD
95	Snoop	macho	1a4m	SRD

N.º DO SORO	NOME DO ANIMAL	SEXO	IDADE	RAÇA
96	Piazinho	macho	1a6m	Dasch
97	Ycaho	macho	4a	Fox Paulistinha
98	Boby III	macho	7m	SRD
99	Bolinha III	fêmea	1a	SRD
100	Pantera	fêmea	8m	SRD
101	Mancuso	macho	4a	SRD
102	Upe	macho	6a	SRD
103	Fofa	fêmea	2a	SRD
104	Guri	macho	6m	SRD
105	Boneca	fêmea	4a	SRD
106	Ruko	macho	1a5m	SRD
107 <sup>a</sup>	SEM NOME1	macho	4,5a	SRD
107b	Lassie	fêmea	3a	Dasch
108	Tchuk	macho	10a	SRD
109	Bambi	macho	12a	SRD
110	Sali	fêmea	15a	SRD
111	Rock	macho	9a	SRD
112	Pufa	fêmea	6a	SRD
113 <sup>a</sup>	Totó	macho	8m	SRD
113b	LULA	fêmea	12m	SRD
114	Luby	macho	7,5a	SRD
115	Thor	macho	9m	Collie
116	Susi II	fêmea	2a	SRD
117	Beltove	macho	1a	SRD
118	Rex	macho	1a5m	SRD
119	Kika II	fêmea	7m	SRD
120	Negrinho	macho	6a	SRD
121	Chiquinha	fêmea	10m	SRD
122	Tzio	macho	12m	Poodle
123	Tófi	macho	1a	SRD
124	Kika III	fêmea	1a	SRD
125	Eva	fêmea	1a	SRD
126	Totó II	macho	2a	SRD

N.º DO SORO	NOME DO ANIMAL	SEXO	IDADE	RAÇA
127	Rambo	macho	6m	SRD
128	Jack	macho	3a	Dogue
129	Pingo	macho	9a	SRD
130	Gugu	macho	3a	SRD
131	Seco	macho	4a	SRD
132	Pinkll	fêmea	1a	SRD
133	Loboll	macho	1a6m	SRD
134	Açu	macho	1a6m	SRD
135	Tigrinho	macho	7m	SRD
136	Bira	macho	1a	SRD
137	Pingo III	macho	4a	SRD
138	Xuxinha	fêmea	9a	SRD
139	PretinhoIV	macho	2a	SRD
140	BobIVII	macho	2a	Dasch
141	Keity	fêmea	7a	SRD
142	Dungall	macho	1a3m	SRD
N.º DO SORO	NOME DO ANIMAL	SEXO	IDADE	RAÇA
143	Mico	macho	1a5m	SRD
144	Negrinho	macho	4m	SRD
145	Açull	macho	2a	SRD
146	NegrinhoIII	macho	2a	SRD
147	Peca	fêmea	4a	SRD
148	Draco	macho	1a	SRD
149	Purga	macho	3a	SRD
150	Mica	fêmea	3a	SRD
151	Pluto	macho	6m	SRD
152	Chispita	fêmea	3a	SRD
153	Maradona	macho	1,5a	SRD
154	Micall	fêmea	2a	SRD
155 <sup>a</sup>	Mickey	macho	1a	SRD
155b	LIA	fêmea	1a	SRD
156	Killer	macho	2a	Pit Bull

## ANEXO 12

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CANOINHAS/SC, ANALISADOS PELO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI – *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001

Número do Soro	Densidade Ótica	Número do Soro	Densidade Ótica	Número do Soro	Densidade Ótica	Número do Soro	Densidade Ótica
1	0,081	41b	0,145	80	0,296	120	0,062
2	0,336	42	0,399	81	0,165	121	0,070
3	0,083	43	0,066	82	0,159	122	0,052
4	0,134	44	0,120	83	0,247	123	0,151
5a	0,079	45	0,054	84	0,056	124	0,132
5b	0,065	46	0,072	85	0,043	125	0,154
6	0,123	48	0,086	86	0,092	126	0,077
7	0,125	47	0,238	87	0,099	127	0,243
9	0,050	49	0,123	88	0,047	128	0,131
10	0,151	50	0,135	89	0,052	129	0,026
11	0,032	51	0,307	90	0,117	130	0,063
12	0,072	52	0,099	91	0,086	131	0,060
13	0,027	53	0,167	92	0,054	132	0,346
14	0,062	54	0,026	93	0,145	133	0,015
15	0,016	55a	0,078	95	0,248	134	0,563
16	0,065	55b	0,076	96	0,221	135	0,096
17	0,158	56	0,067	97	0,057	136	0,118
19	0,104	57	0,084	98	0,045	137	0,069
20	0,050	58	0,126	99	0,035	138	0,022
21	0,045	59	0,099	100	0,042	139	0,458
23	0,095	60	0,280	101	0,050	140	0,156
24	0,020	61	0,064	103	0,500	141	0,171
25	0,102	62	0,081	104	0,082	142	0,124
26	0,162	63	0,119	105	0,827	143	0,156
27	0,058	64	0,181	106	0,062	144	0,074
28	0,148	65	0,085	107a	0,061	145	0,396
29	0,141	66	0,126	107b	0,217	146	0,056
30	0,031	67	0,145	108	0,170	147	0,395
31	0,150	68	0,115	109	0,153	148	0,168
32	0,133	69	0,122	110	0,192	149	0,120
33	0,036	70	0,189	111	0,045	150	0,248
34 a	0,239	71	0,336	112	0,260	151	0,085
34 b	0,318	72	0,205	113a	0,514	152	0,215
35	0,118	73	0,203	113b	0,025	153	0,124
36	0,163	74	0,094	114	0,103	154	0,043
37	0,137	75	0,051	115	0,124	155a	0,082
38	0,075	76	0,461	116	0,039	155b	0,134
39	0,106	77	0,083	117	0,061	156	0,067
40	0,203	78	0,075	118	0,377		
41	0,078	79	0,129	119	0,150		



## ANEXO 13

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, ANALISADOS PELO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI - *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001

ELISA 7	ELISA 8	ELISA 13	ELISA 14	ELISA 16	ELISA 17	ELISA 18
0,178	0,898	0,454	0,661	0,885	1,111	0,405
0,161	0,654	0,366	0,647	0,725	0,858	0,254
0,144	0,614	0,292	0,605	0,588	0,840	0,248
0,114	0,590	0,278	0,578	0,277	0,772	0,201
0,107	0,506	0,261	0,563	0,225	0,738	0,179
0,070	0,503	0,258	0,518	0,163	0,654	0,176
0,059	0,490	0,247	0,501	0,157	0,626	0,131
0,056	0,468	0,237	0,467	0,147	0,597	0,109
0,041	0,398	0,232	0,361	0,122	0,574	0,087
0,027	0,396	0,223	0,351	0,119	0,512	0,074
0,025	0,379	0,221	0,350	0,110	0,511	0,070
0,023	0,353	0,212	0,337	0,106	0,492	0,067
0,022	0,296	0,204	0,331	0,099	0,447	0,067
0,022	0,284	0,197	0,294	0,096	0,269	0,065
0,022	0,280	0,143	0,282	0,090	0,255	0,060
0,018	0,274	0,141	0,258	0,081	0,236	0,059
0,018	0,255	0,131	0,244	0,078	0,229	0,057
0,018	0,254	0,127	0,206	0,073	0,203	0,057
0,018	0,204	0,120	0,173	0,071	0,185	0,056
0,017	0,201	0,118	0,167	0,071	0,178	0,053
0,016	0,174	0,110	0,166	0,068	0,165	0,050
0,014	0,173	0,109	0,158	0,065	0,144	0,049
0,013	0,170	0,106	0,154	0,061	0,136	0,049
0,010	0,169	0,101	0,150	0,061	0,136	0,049
0,010	0,165	0,097	0,129	0,056	0,127	0,048
0,010	0,163	0,096	0,123	0,056	0,115	0,047
0,008	0,160	0,096	0,118	0,052	0,111	0,043
0,008	0,157	0,094	0,118	0,046	0,107	0,042
0,007	0,156	0,093	0,116	0,044	0,106	0,038
0,007	0,148	0,081	0,111	0,042	0,103	0,037
0,007	0,131	0,076	0,101	0,037	0,098	0,036
0,007	0,119	0,064	0,101	0,035	0,097	0,036
0,007	0,115	0,063	0,097	0,032	0,091	0,031
0,006	0,115	0,063	0,081	0,031	0,088	0,031
0,005	0,104	0,063	0,079	0,029	0,084	0,028
0,005	0,094	0,062	0,069	0,028	0,078	0,027
0,004	0,090	0,048	0,063	0,025	0,075	0,023
0,004	0,082	0,047	0,056	0,021	0,060	0,023
0,004	0,063	0,042	0,055	0,012	0,059	0,020
0,001	0,019	0,011	0,046	0,002	0,054	0,016

RESULTADOS DOS SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, ANALISADOS PELO MÉTODO DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO PARA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINA G ANTI - *Toxoplasma gondii*, CURITIBA, PR, 2001-CONCLUSÃO.

ELISA 20	ELISA 21	ELISA 22	ELISA 24	ELISA 25	ELISA 26
1,127	0,580	0,685	0,131	0,928	0,445
0,805	0,511	0,629	0,130	0,448	0,440
0,757	0,421	0,614	0,069	0,395	0,252
0,582	0,348	0,590	0,067	0,364	0,172
0,484	0,250	0,566	0,067	0,359	0,157
0,432	0,239	0,546	0,066	0,321	0,153
0,328	0,231	0,528	0,064	0,314	0,100
0,316	0,231	0,509	0,063	0,301	0,095
0,262	0,230	0,503	0,063	0,173	0,090
0,253	0,224	0,495	0,056	0,165	0,089
0,206	0,215	0,490	0,055	0,157	0,084
0,201	0,208	0,470	0,053	0,153	0,072
0,177	0,205	0,468	0,049	0,144	0,067
0,175	0,197	0,418	0,049	0,143	0,065
0,170	0,174	0,401	0,049	0,137	0,064
0,162	0,174	0,380	0,048	0,134	0,057
0,160	0,173	0,380	0,044	0,128	0,051
0,157	0,166	0,358	0,044	0,099	0,047
0,126	0,154	0,350	0,041	0,091	0,046
0,124	0,139	0,319	0,040	0,089	0,044
0,124	0,123	0,308	0,039	0,085	0,039
0,123	0,122	0,278	0,037	0,084	0,039
0,117	0,122	0,270	0,036	0,080	0,038
0,115	0,118	0,257	0,036	0,077	0,038
0,112	0,117	0,229	0,030	0,076	0,029
0,108	0,115	0,204	0,026	0,075	0,024
0,106	0,113	0,202	0,025	0,073	0,024
0,104	0,112	0,200	0,024	0,070	0,022
0,104	0,107	0,183	0,023	0,064	0,021
0,098	0,102	0,183	0,021	0,064	0,014
0,071	0,094	0,181	0,019	0,064	0,010
0,071	0,094	0,176	0,017	0,051	0,004
0,068	0,084	0,158	0,017	0,045	0,003
0,066	0,082	0,157	0,016	0,043	
0,065	0,079	0,144	0,011	0,036	
0,062	0,075	0,130	0,007	0,033	
0,056	0,063	0,101	0,006	0,030	
0,048	0,054	0,097	0,005	0,029	
0,041	0,051	0,089	0,004	0,028	
0,036	0,051	0,086	0,003	0,011	

ANEXO 14 - SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, AVALIADOS PELO MÉTODO DE ELISA INDIRETO IgG ANTI *T. gondii* DE ACORDO COM A IDADE E SEXO DOS ANIMAIS.  
CURITIBA, PR, 2001

ELISA 7	Idade	Sexo	ELISA 8	Idade	Sexo	ELISA 13	Idade	Sexo	ELISA 14	Idade	Sexo	ELISA 16	Idade	Sexo	ELISA 17	Idade	Sexo	ELISA 18	Idade	Sexo
0,178	A	F	0,898	A	M	0,454	A	M	0,661	A	M	0,885	A	F	1,111	A	F	0,405	A	M
0,161	A	M	0,654	A	M	0,366	A	M	0,647	A	F	0,725	A	F	0,858	A	F	0,254	A	M
0,144	A	M	0,614	A	M	0,292	A	F	0,605	A	F	0,588	A	F	0,840	A	F	0,248	A	M
0,114	A	F	0,590	A	M	0,278	A	F	0,578	A	F	0,277	A	F	0,772	A	M	0,201	A	M
0,107	A	M	0,506	A	M	0,261	A	M	0,563	A	F	0,225	A	M	0,738	A	M	0,179	J	M
0,070	A	F	0,503	A	F	0,258	A	F	0,518	A	M	0,163	A	M	0,654	A	F	0,176	A	F
0,059	A	M	0,490	J	M	0,247	A	F	0,501	A	F	0,157	J	F	0,626	A	M	0,131	A	F
0,056	A	F	0,468	J	F	0,237	A	M	0,467	A	M	0,147	J	M	0,597	A	M	0,109	A	F
0,041	A	M	0,398	J	F	0,232	A	F	0,361	A	M	0,122	A	F	0,574	A	F	0,087	A	F
0,027	A	F	0,396	A	F	0,223	A	F	0,351	A	M	0,119	A	M	0,512	A	F	0,074	A	F
0,025	A	M	0,379	A	M	0,221	A	M	0,350	A	F	0,110	A	M	0,511	A	M	0,070	J	F
0,023	A	M	0,353	A	F	0,212	A	F	0,337	A	F	0,106	J	F	0,492	A	M	0,067	A	F
0,022	A	F	0,296	A	M	0,204	A	M	0,331	A	F	0,099	A	F	0,447	A	M	0,067	J	M
0,022	A	M	0,284	A	F	0,197	A	M	0,294	A	M	0,096	A	F	0,269	A	M	0,065	J	F
0,022	A	M	0,280	A	M	0,143	J	F	0,282	A	F	0,090	A	M	0,255	A	F	0,060	A	F
0,018	A	F	0,274	A	M	0,141	A	F	0,258	J	M	0,081	A	M	0,236	A	F	0,059	A	F
0,018	A	M	0,255	J	F	0,131	A	M	0,244	J	M	0,078	A	F	0,229	A	M	0,057	J	M
0,018	A	F	0,254	A	F	0,127	A	F	0,206	A	F	0,073	J	M	0,203	A	M	0,057	J	M
0,018	A	F	0,204	A	M	0,120	A	F	0,173	A	M	0,071	J	F	0,185	J	M	0,056	A	F
0,017	A	F	0,201	A	F	0,118	A	F	0,167	J	M	0,071	A	M	0,178	A	F	0,053	A	M
0,016	A	M	0,174	A	M	0,110	J	M	0,166	A	M	0,068	A	F	0,165	A	M	0,050	A	M
0,014	A	M	0,173	A	M	0,109	A	M	0,158	A	F	0,065	A	M	0,144	A	F	0,049	A	F
0,013	A	F	0,170	A	F	0,106	A	F	0,154	A	F	0,061	A	M	0,136	A	M	0,049	A	M
0,010	A	F	0,169	A	F	0,101	A	F	0,150	J	M	0,061	A	M	0,136	A	F	0,049	J	M
0,010	A	M	0,165	J	F	0,097	A	M	0,129	A	F	0,056	A	M	0,127	J	M	0,048	J	F
0,010	A	F	0,163	A	M	0,096	A	F	0,123	A	M	0,056	A	M	0,115	J	F	0,047	A	F
0,008	J	M	0,160	A	M	0,096	A	F	0,118	J	F	0,052	A	M	0,111	A	M	0,043	A	M
0,008	J	M	0,157	A	F	0,094	J	M	0,118	A	M	0,046	A	F	0,107	A	M	0,042	A	M
0,007	A	F	0,156	J	F	0,093	A	M	0,116	A	M	0,044	J	F	0,106	J	F	0,038	A	M
0,007	A	F	0,148	A	F	0,081	J	F	0,111	A	F	0,042	J	F	0,103	A	F	0,037	A	F
0,007	A	M	0,131	A	M	0,076	A	M	0,101	A	F	0,037	J	F	0,098	A	M	0,036	A	M
0,007	A	M	0,119	A	F	0,064	A	F	0,101	A	F	0,035	J	F	0,097	A	F	0,036	A	M
0,007	J	M	0,115	A	M	0,063	A	F	0,097	A	M	0,032	A	F	0,091	A	F	0,031	J	M
0,006	J	M	0,115	A	M	0,063	A	F	0,081	A	M	0,031	J	F	0,088	A	M	0,031	J	F
0,005	J	M	0,104	A	F	0,063	A	F	0,079	A	F	0,029	A	F	0,084	A	M	0,028	J	F

SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, AVALIADOS PELO MÉTODO DE ELISA INDIRETO IgG ANTI *T. gondii* DE ACORDO COM A IDADE E SEXO DOS ANIMAIS. CURITIBA, PR, 2001 - CONTINUAÇÃO

ELISA 7	Idade	Sexo	ELISA 8	Idade	Sexo	ELISA 13	Idade	Sexo	ELISA 14	Idade	Sexo	ELISA 16	Idade	Sexo	ELISA 17	Idade	Sexo	ELISA 18	Idade	Sexo
0,005	J	M	0,094	A	F	0,062	A	F	0,069	J	F	0,028	A	F	0,078	A	F	0,027	J	F
0,004	A	M	0,090	A	M	0,048	A	M	0,063	A	M	0,025	A	M	0,075	A	M	0,023	A	F
0,004	A	F	0,082	A	F	0,047	A	M	0,056	A	M	0,021	A	M	0,060	A	F	0,023	J	F
0,004	A	F	0,063	A	M	0,042	A	M	0,055	A	M	0,012	J	M	0,059	A	M	0,020	A	F
0,001	A	F	0,019	A	F	0,011	A	M	0,046	A	F	0,002	A	M	0,054	A	F	0,016	A	M

SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, AVALIADOS PELO MÉTODO DE ELISA INDIRETO IgG ANTI *T. gondii* DE ACORDO COM A IDADE E SEXO DOS ANIMAIS. CURITIBA, PR, 2001

ELISA 20	Idade	Sexo	ELISA 21	Idade	Sexo	ELISA 22	Idade	Sexo	ELISA 24	Idade	Sexo	ELISA 25	Idade	Sexo	ELISA 26	Idade	Sexo
1,127	A	M	0,580	A	F	0,685	A	M	0,131	A	F	0,928	A	M	0,445	A	M
0,805	J	M	0,511	A	M	0,629	A	M	0,130	A	F	0,448	A	F	0,440	A	F
0,757	A	M	0,421	A	F	0,614	A	F	0,069	A	M	0,395	A	F	0,252	A	F
0,582	A	M	0,348	A	M	0,590	A	F	0,067	A	M	0,364	A	F	0,172	J	F
0,484	A	M	0,250	A	F	0,566	A	F	0,067	A	F	0,359	A	M	0,157	A	M
0,432	A	F	0,239	A	M	0,546	A	M	0,066	A	M	0,321	A	M	0,153	A	M
0,328	A	F	0,231	A	F	0,528	A	F	0,064	A	F	0,314	J	M	0,100	A	M
0,316	A	F	0,231	A	M	0,509	A	F	0,063	A	M	0,301	A	F	0,095	A	M
0,262	A	M	0,230	A	F	0,503	A	F	0,063	A	F	0,173	A	F	0,090	A	F
0,253	A	M	0,224	A	M	0,495	A	F	0,056	A	F	0,165	A	M	0,089	A	F
0,206	J	F	0,215	A	M	0,490	A	M	0,055	A	M	0,157	A	M	0,084	A	M
0,201	A	M	0,208	A	M	0,470	A	M	0,053	J	M	0,153	A	F	0,072	J	F
0,177	A	F	0,205	A	F	0,468	A	M	0,049	J	M	0,144	J	F	0,067	A	M
0,175	A	M	0,197	A	F	0,418	J	M	0,049	J	M	0,143	J	F	0,065	A	F
0,170	A	M	0,174	J	F	0,401	J	M	0,049	A	F	0,137	A	M	0,064	J	F
0,162	A	M	0,174	J	F	0,380	A	F	0,048	A	F	0,134	A	F	0,057	J	F
0,160	J	M	0,173	A	M	0,380	A	F	0,044	A	F	0,128	A	M	0,051	A	M
0,157	A	F	0,166	A	M	0,358	A	F	0,044	A	M	0,099	A	M	0,047	A	M
0,126	A	M	0,154	A	F	0,350	A	F	0,041	J	F	0,091	A	M	0,046	A	M
0,124	A	F	0,139	A	F	0,319	J	M	0,040	A	M	0,089	A	F	0,044	A	M
0,124	A	F	0,123	A	F	0,308	A	F	0,039	A	F	0,085	A	M	0,039	A	F
0,123	A	F	0,122	A	M	0,278	A	M	0,037	A	F	0,084	A	F	0,039	A	F
0,117	A	M	0,122	J	F	0,270	A	F	0,036	J	F	0,080	A	M	0,038	A	M
0,115	A	F	0,118	A	M	0,257	A	F	0,036	A	M	0,077	A	M	0,038	J	M
0,112	A	M	0,117	A	F	0,229	A	M	0,030	A	M	0,076	A	M	0,029	J	M

SOROS DE CÃES DE CURITIBA/PR, AVALIADOS PELO MÉTODO DE ELISA INDIRETO IgG ANTI *T. gondii* DE ACORDO COM A IDADE E SEXO DOS ANIMAIS. CURITIBA, PR, 2001-CONCLUSÃO

ELISA 20	Idade	Sexo	ELISA 21	Idade	Sexo	ELISA 22	Idade	Sexo	ELISA 24	Idade	Sxo	ELISA 25	Idade	Sexo	ELISA 26	Idade	Sexo
0,108	A	F	0,115	A	F	0,204	A	M	0,026	A	M	0,075	J	F	0,024	A	M
0,106	A	M	0,113	A	F	0,202	A	F	0,025	A	F	0,073	J	F	0,024	A	M
0,104	A	M	0,112	A	F	0,200	A	F	0,024	A	F	0,070	A	F	0,022	A	F
0,104	A	M	0,107	A	M	0,183	A	F	0,023	A	M	0,064	J	F	0,021	A	F
0,098	A	M	0,102	J	M	0,183	A	F	0,021	A	M	0,064	A	F	0,014	A	F
0,071	A	F	0,094	A	M	0,181	A	F	0,019	J	F	0,064	A	M	0,010	A	M
0,071	A	M	0,094	J	F	0,176	A	F	0,017	J	F	0,051	A	M	0,004	A	M
0,068	J	M	0,084	J	F	0,158	A	F	0,017	A	F	0,045	A	M	0,003	A	M
0,066	J	M	0,082	A	M	0,157	A	M	0,016	A	M	0,043	A	M			
0,065	J	M	0,079	A	F	0,144	A	M	0,011	A	M	0,036	A	M			
0,062	J	M	0,075	A	F	0,130	A	F	0,007	A	M	0,033	A	F			
0,056	A	M	0,063	A	M	0,101	A	M	0,006	A	M	0,030	A	F			
0,048	A	M	0,054	A	M	0,097	A	F	0,005	A	F	0,029	A	F			
0,041	J	F	0,051	J	F	0,089	A	M	0,004	A	F	0,028	A	F			
0,036	A	F	0,051	J	F	0,086	A	F	0,003	A	M	0,011	A	M			

**ANEXO 15****RELAÇÃO DOS BAIRROS DO MUNICÍPIO DE CURITIBA, PARANÁ.**

01 Centro
02 São Francisco
03 Centro Cívico
04 Alto da Glória
05 Alto da Rua XV
06 Cristo Rei
07 Jardim Botânico
08 Rebouças
09 Água Verde
10 Batel
11 Bigorilho
12 Mercês
13 Bom Retiro
14 Ahú
15 Juvevê
16 Cabral
17 Hugo Lange
18 Jardim Social
19 Tarumã
20 Capão da Imbuia
21 Cajuru
22 Jardim das Américas
23 Guabirota
24 Prado Velho
25 Parolin
26 Guaíra
27 Portão
28 Vila Izabel
29 Seminário
30 Campina do Siqueira
31 Vista Alegre
32 Pilarzinho
33 São Lourenço
34 Boa Vista
35 Bacacheri
36 Bairro Alto
37 Uberaba
38 Hauer

39 Fanny
40 Lindóia
41 Novo Mundo
42 Fazendinha
43 Santa Quitéria
44 Campo Comprido
45 Mossunguê
46 Santo Inácio
47 Cascatinha
48 São João
49 Taboão
50 Abranches
51 Cachoeira
52 Barreirinha
53 Santa Cândida
54 Tingüi
55 Atuba
56 Boqueirão
57 Xaxim
58 Capão Raso
59 Orleans
60 São Braz
61 Butiatuvinha
62 Lamenha Pequena
63 Santa Felicidade
64 Alto Boqueirão
66 Pinheirinho
67 São Miguel
68 Augusta
69 Riviera
70 Caximba
71 Campo de Santana
72 Ganquinho
73 Umbará
74 Tatuquara
75 Cidade Industrial