^{BS}
JOSÉ LUIZ D'ANGELINO

Ø

TOXOPLASMOSE SUÍNA: ... CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO

Tese apresentada ao
Departamento de Epidemiologia da
Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor.

Orientador:
Prof. Dr. José Maria Pacheco de Souza

SÃO PAULO
1983

À

minha mãe
e à memória
de meu pai

À

Alzira

e aos meus filhos,
Ana Paula
José Luiz
Rubens Henrique
Ana Carolina

Agradecemos

Ao Professor Doutor JOSÉ MARIA PACHECO DE SOUZA, pela orientação e amizade que sempre nos ofereceu.

À Professora Doutora MASAIO MIZUNO ISHIZUKA, pela orientação, amizade e inestimável colaboração em todas as fases deste trabalho.

Aos Professores Doutor EDUARDO HARRY BIRGEL e Doutor LEONARDO MIRANDA DE ARAÚJO, pelo constante estímulo, sugestões apresentadas e cuidadosa revisão dos originais.

Aos Professores Doutor GIL VIANNA PAIM, Doutor JOÃO PESSOA DE PAULA CARVALHO e Doutor MARIO E. CAMARGO, pela revisão dos originais e valiosas sugestões e críticas apresentadas.

Ao Professor Doutor EDMUNDO JUAREZ, pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao Doutor VICENTE DO AMARAL, demais colegas, funcionários e estagiários da Seção de Parasitologia Animal do Instituto Biológico de São Paulo, pela cessão da amostra de *T. gondii* utilizada na inoculação experimental.

Ao SERVIÇO MÉDICO-CIRÚRGICO E HOSPITALAR DA FMVZ-USP e à SOCIL PRÓ-PECUÁRIA S/A pela cessão de rações para suínos.

Aos Professores Doutor VICENTE BORELLI e Doutor EDUARDO HARRY BIRGEL, pelas facilidades na obtenção e ma nutenção dos animais utilizados na inoculação experimental.

Ao LABORATÓRIO DAIICHI SEYAKU CO. do Japão, pela cessão do antígeno para a prova de hemaglutinação e do papel de filtro de Nobuto.

As bibliotecárias ANA MARIA SILVEIRA BARONE e DAISY PI RES NORONHA, pela colaboração na obtenção, revisão e ordenação das referências bibliográficas.

À Professora DEISE RAMOS FIGUEIRA, pela paciente revi são gramatical.

Í N D I C E

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 - INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL	20
2.1.1 - SELEÇÃO DOS ANIMAIS	20
2.1.2 - INÓCULO	21
2.1.3 - CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS	22
2.1.4 - COLHEITA DE SANGUE	22
2.2 - ESTUDO DA CONCORDÂNCIA DOS RESULTADOS DAS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E HEMAGLUTINAÇÃO	23
2.3 - PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA EM RE BANHOS SUÍNOS COM DIFERENTES MODALIDADES DE EXPLORAÇÃO ZOOTÉCNICA	24
2.4 - PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	
2.4.1 - ANTÍGENO	27
2.4.2 - CONJUGADO ANTI-GLOBULINA SUÍNA-FLUORES- CEÍNA	28
2.4.3 - ANTI-GLOBULINA DE SUÍNO	28
2.4.4 - MARCAÇÃO DAS ANTI-GLOBULINAS	28
2.4.5 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FLUORESCENTE ESPECÍFICA	29
2.4.6 - SOROS TESTEMUNHAS	29
2.4.7 - TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA..	29
2.5 - PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO	
2.5.1 - ANTÍGENO	31

	PÁGINA
2.5.2 - ELUIÇÃO DO SORO	32
2.5.3 - PREPARO DO ANTÍGENO PARA HEMAGLUTINAÇÃO ...	32
2.5.4 - TÉCNICA DA PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO	32
2.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3. RESULTADOS	35
3.1 - INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL	35
3.2 - ESTUDO DA CONCORDÂNCIA DE RESULTADOS ENTRE AS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) E HEMAGLUTINAÇÃO (HA); CÁLCULO DA CO-POSITIVIDA DE E DA CO-NEGATIVIDADE DE HA EM RELAÇÃO A IFI	45
3.3 - PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA EM REBA- NHOS SUÍNOS SEGUNDO AS PROVAS DE IMUNOFLUORES CÊNCIA INDIRETA (IFI) E HEMAGLUTINAÇÃO (HA)...	47
4. DISCUSSÃO	59
4.1 - INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL	60
4.2 - ESTUDO DA CONCORDÂNCIA DE RESULTADOS ENTRE AS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) E HEMAGLUTINAÇÃO (HA); CÁLCULO DA CO-POSITIVIDA DE E DA CO-NEGATIVIDADE DE HA EM RELAÇÃO A IFI	63
4.3 - PREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE EM REBANHOS SUÍ- NOS SEGUNDO AS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) E HEMAGLUTINAÇÃO (HA)	65
5. CONCLUSÕES	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

RESUMO

O presente trabalho foi realizado visando:

a) o acompanhamento da dinâmica da evolução dos anticorpos revelados pelas provas de imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação (HA); b) o estudo da concordância de resultados das duas provas, mediante a estatística Kappa e da co-positividade e co-negatividade; c) e a avaliação da prevalência da infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pertencentes a diferentes modalidades de exploração zootécnica (intensiva e semi-intensiva) pelas provas de IFI e HA.

Foi realizada a inoculação experimental de 20 suínos com a forma infectante de taquizoítos do *Toxoplasma gondii* e mantidos 7 outros como controle. Os animais ficaram sob observação durante um período de 84 dias (12 semanas). No 7º dia pós-inoculação, 74,0% dos suínos apresentaram anticorpos revelados pela prova de IFI, enquanto que HA detectou em 21,0% dos animais. Os anticorpos persistiram durante todo o período de observação, com a primeira prova revelando títulos mais altos. Ambas as provas apresentaram sensibilidade e especificidade de 100%, a partir do 10º dia, já que todos os animais inoculados revelaram anticorpos, enquanto que os do grupo controle permaneceram negativos durante todo o experimento.

No estudo de concordância das duas provas foram examinados soros de 273 suínos, abatidos em matadouros,

verificando-se que o grau de concordância medido por Kappa foi de 69,24%. O Índice de co-positividade de HA em relação à IFI foi de 72,78% e o de co-negatividade, 100%.

A prevalência da infecção, considerando todas as idades em rebanhos suínos segundo a prova de IFI, foi de 54,0% para o sistema de criação intensiva e 49,2% para a criação semi-intensiva, enquanto que para a prova de HA foi de 46,6% e 42,7%, respectivamente.

Os valores das prevalências observadas segundo o tipo de criação (intensiva e semi-intensiva) não diferiram estatisticamente.

No que se refere às taxas de infecção toxoplásmica segundo as diferentes idades estudadas, observou-se na queda dos valores do grupo de até 2 meses de idade para o de 2 a 4 meses, para a partir deste haver um incremento com o progredir da idade.

SUMMARY

The present work was done aiming: a) the following of the dynamics of antibodies response revealed by Indirect Fluorescent Antibodies (IFA) and Hemagglutination (HA) techniques; b) the study of the agreement between the results of the two tests by means of Kappa statistics as well as co-positivity and co-negativity indices; c) the evaluation of the prevalence of toxoplasmic infection in swine herds belonging to different types of pig-raising (intensive and semi-intensive) by the IFA and HA tests.

For the experimental infection study, a group of twenty swines were inoculated with the infecting form of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*; and seven additional ones were maintained as the control group. The animals were observed during a period of 84 days (12 weeks). On the 7th day post-inoculation, 74,0% of sera of experimentally inoculated animals presented antibodies for the IFA technique, while HA revealed antibodies in 21,0%. With the infected group, antibodies were detected through all period of observation, but the IFA technique showed higher antibody titers than the HA. Both methods presented 100% of sensitivity and specificity, starting from the 10th day of observation. All animals of the control group were negative for the antibody detection during the observed period.

Two hundred and seventy three swine sera

collected from a slaughter-house were used for the study of the agreement between the two tests. Kapps statistics showed 69,24% of agreement and the rate of co-positivity of HA test in relation to the IFA test was 72,78, and the rate of co-negativity was 100%.

The prevalence rates considering all the ages in the swine herds tested according to the method of IFA was 54,0% for the intensive-raised animals and 49,2% for animals of the semi-intensive system, while the HA test showed respectively 46,6% and 42,7%. The prevalence rates observed according to the type of pig-raising (intensive or semi-intensive) did not differ statistically. As for the rates of the toxoplasmic infection according to the different ages studies, it was observed a decrease in the values from group "until 2 months" in relation to the group "2 to 4 months", and then an increase with the advance of age.

1. INTRODUÇÃO

O termo toxoplasmose é usado para designar as condições de infecção e algumas vezes doença, causadas pelo *Toxoplasma gondii*, que acometem tanto os animais como o homem. Constitui-se numa antroponose de distribuição geográfica cosmopolita, considerada por APT e cols.⁴ (1973) como a parasitose mais frequente no homem, e talvez nos animais homeotérmicos.

O agente causal da toxoplasmose foi observado pela primeira vez em São Paulo por SPLENDORE⁹⁰ (1908), em coelhos doentes. Poucos meses mais tarde, NICOLLE & MANCEAUX⁷² (1908), na Tunísia, encontraram o parasita num pequeno roedor silvestre, o *Ctenodactylus gundi* (Gray, 1830), denominando-o "toxoplasma", pois sua forma sugere um arco. LEVINE e cols.⁶² (1980) classificou o *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) como pertencente ao sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoea, sub-classe Coccidia, ordem Eucoccidiida, sub-ordem Eimeriina, família Eimeriidae e gênero *Toxoplasma*.

O *Toxoplasma gondii* apresenta dois ciclos de desenvolvimento: o isosporiano ou enteroepitelial e o toxoplásmico ou extra-intestinal. O primeiro ciclo ocorre nos hospedeiros definitivos, enquanto o segundo ciclo é de ocorrência nos hospedeiros intermediários ou acidentais e nos definitivos (HOARE⁴¹, 1972; FRENKEL³⁴, 1974).

Pelo que se conhece atualmente, apenas os felídeos são considerados hospedeiros definitivos do *Toxoplasma gondii*, pois somente nestes animais ocorre o ciclo enteroepitelial que abrange um estágio caracterizado por reprodução sexuada do parasita, seguida de formação de oocistos de eliminação fecal (LARSSON⁶⁰, 1976). Os hospedeiros intermediários, onde ocorre o ciclo extra-intestinal, são representados por um grande número de mamíferos e aves, nos quais há somente o desenvolvimento asexuado com formação de taquizoítos e bradizoítos (FRENKEL³⁴, 1974).

O hospedeiro definitivo infecta-se pela ingestão de cistos teciduais (contendo bradizoítos) ou formas proliferativas (taquizoítos) presentes nos tecidos durante uma infecção aguda, ou pela ingestão de oocistos esporulados originários de fezes de felinos. A multiplicação se processa nas células epiteliais do intestino delgado, com a eventual formação de oocistos, que se destacam e são eliminados com as fezes (TURNER⁹², 1978). Os oocistos podem ser eliminados aos milhões numa só evacuação, permanecendo viáveis no meio ambiente por aproximadamente um ano em climas quentes ou úmidos, ou mesmo por mais tempo em climas frios (JONES⁵⁵, 1973).

Os hospedeiros intermediários, por sua vez, infectam-se, à semelhança do hospedeiro definitivo, tanto pela ingestão de oocistos esporulados, ou de cistos

teciduais, como também pela via transplacentária, através das formas proliferativas (taquizoítos) (HOARE⁴¹, 1972). Após a penetração do parasito no organismo do susceptível, instala-se uma parasitemia com posterior desenvolvimento de imunidade e formação de cistos em diversos tecidos (JONES⁵⁵, 1973). Os cistos são característicos da infecção crônica, persistindo meses ou anos, frequentemente durante toda a vida do hospedeiro (FRENKEL³⁵, 1976).

O homem pode adquirir a infecção, principalmente, por três vias: a) ingestão de oocistos já esporulados no meio ambiente (solo, areia, latas de lixo), após terem sido eliminados do trato digestivo dos felídeos, disseminando-se através de hospedeiros transportadores, tais como moscas, baratas e minhocas; b) ingestão de cistos teciduais que podem estar presentes na carne crua ou mal cozida; c) infecção transplacentária (FRENKEL³⁵, 1976).

A importância da infecção no âmbito da Saúde Pública reside no fato dessa zoonose representar uma apreciável causa de nati-mortalidade e, principalmente, de morbidade neo-natal, considerando-se as lesões oculares de intensidade variável e as alterações cerebrais graves (FRENKEL³³, 1973).

FRENKEL³³ (1973), nos Estados Unidos da América, estimou em 3000 o número de crianças que, anualmente, nascem com toxoplasmose, sendo de 5 a 15% os ca-

sos fatais, de 8 a 10% os que apresentam lesões oculares e cerebrais graves, de 10 a 13% os portadores de alteração visual com intensidade variável e de 58 a 72% os que não apresentam sintomatologia clínica ao nascer, mas que posteriormente são acometidos de retinocoroidite. No Brasil, CASTILHO²² (1976) estimou em 16 por 1000 nascidos vivos a taxa de infecção toxoplásmica congênita e em 5 por 1000 a taxa de toxoplasmose doença. O custo total da toxoplasmose congênita, para os Estados Unidos da América, oscila entre 31 a 39 milhões de dólares, incluindo-se os gastos de hospitalização, previdência social, educação especial e escolarização para os portadores de deficiências visuais (FRENKEL³³, 1973).

Do ponto de vista clínico, FRENKEL³⁵ (1976) considera como principais manifestações da toxoplasmose a forma febril aguda, a linfadenopatia, a toxoplasmose na gravidez e a neo-natal.

Provas sorológicas têm revelado que a população adulta de diferentes países apresenta uma prevalência entre 30 a 60%, apesar da toxoplasmose raramente se manifestar com quadro sintomático típico (FRENKEL³², 1971; WATSON⁹⁸, 1972).

A elevada frequência de infecções inaparentes e baixa magnitude de ocorrência de casos de doença são relatados, porque o parasita caracteriza-se por apresentar alta infectividade e baixa patogenicidade, mor

bidade e letalidade (KROGSTAD e cols.⁵⁹, 1972; FRENKEL³³, 1973; ROBINSON⁷⁶, 1973). Além disso, exposições à infecção são suficientes para garantir, na maioria dos casos, a persistência do parasita no organismo do hospedeiro pela capacidade que o protozoário manifesta em formar cistos nos diversos tecidos da economia animal (McKINNEY⁶⁸, 1973; JONES⁵⁵, 1973).

A despeito do elevado poder imunogênico do *Toxoplasma* e da capacidade dos anticorpos limitarem a população de taquizoítos livres, os cistos não são atingidos por tal imunidade. Estas características inerentes à patogenia e à imunidade deste agente etiológico permitem a aplicação criteriosa de provas sorológicas em amostras de soros de animais suspeitos, com vistas à identificação de portadores de infecção aguda ou crônica (SINGH e cols.⁸⁸, 1967; FRENKEL³², 1971).

Entre as provas imunológicas mais frequentemente utilizadas no estudo epidemiológico da toxoplasmose destacam-se, segundo ARAÚJO⁵ (1964), CAMARGO¹⁷ (1964) e SOLTYS & WOO⁸⁹ (1972), a reação de fixação do complemento (FC), a reação de Sabin-Feldman (SF) ou teste do corante, a reação de hemaglutinação (HA) e a de imunofluorescência indireta (IFI).

A tradicional prova de Sabin-Feldman (SABIN & FELDMAN⁸², 1948) foi, durante muito tempo, utilizada em soros de animais, sendo paulatinamente substituída

pela prova de imunofluorescência indireta (KELEN e cols.⁵⁷, 1962) que não prescinde do microscópio de fluorescência, mas apresenta elevada sensibilidade e especificidade; ou pela prova de hemaglutinação (JACOBS & LUNDE⁵², 1957), menos sofisticada, que exige para a sua execução apenas placas e pipetas apropriadas.

JACOBS⁵¹ (1973) afirmou que a reação de imunofluorescência indireta foi o progresso mais notável na sorologia da toxoplasmose, considerando-a, ainda, de aceitação universal, tanto para o diagnóstico da doença no homem como nos animais. O autor considerou a reação de imunofluorescência indireta como de fácil realização, de grande sensibilidade, bastante econômica e, praticamente, isenta de problemas de infecção acidental de laboratoristas, recomendando-a para uso rotineiro no diagnóstico da toxoplasmose.

Por outro lado, a partir da primeira utilização no diagnóstico desta protozoonose (JACOBS & LUNDE⁵², 1957), a reação de hemaglutinação vem gradativamente assumindo um importante papel na imunoserologia toxoplasmica (McILWAIN⁶⁷, 1969; ISHIZUKA e cols.⁴⁸, 1974). Segundo ARAÚJO⁵ (1964), a reação de hemaglutinação apresenta maior facilidade de execução e interpretação, não proporcionando riscos de acidentes laboratoriais e permitindo a armazenagem do antígeno em geladeira por muito tempo.

Mais tarde, BEHYMER e cols.⁶ (1973) propuseram que a reação de hemaglutinação para o diagnóstico da toxoplasmose fosse de uso rotineiro nas clínicas e hospitais veterinários, pois que para sua execução necessita de pouca quantidade de soro ou sangue, além de utilizar um antígeno de fácil obtenção no comércio e de apresentar com maior rapidez os resultados.

APT e cols.⁴ (1973), BEHYMER e cols.⁶ (1973), JONES⁵⁵ (1973), McKINNEY⁶⁸ (1973) e SEAH⁸⁷ (1973) estudaram o comportamento das provas sorológicas anteriormente referidas, relacionando-as à imunopatogenia da infecção toxoplásmica. Relatam que, no decurso de uma infecção ou doença, anticorpos de natureza diversa são mensuráveis, pois, na fase inicial, evidenciam-se elevados teores de imunoglobulina do tipo IgM, que se caracteriza por desaparecer também precocemente. Um segundo anticorpo, imunoglobulinas do tipo IgG, medido pela prova de imunofluorescência indireta, caracteriza-se por persistir no organismo do animal parasitado por tempo indefinido. Um terceiro tipo de anticorpo é também uma imunoglobulina do tipo IgG, porém passível de ser medida pela prova de hemaglutinação.

A reação de imunofluorescência revela anticorpos da fração IgM ou IgG das imunoglobulinas, bastando para tanto substituir-se o respectivo conjugado anti-gama-globulina (APT e cols.⁴, 1973; SEAH⁸⁷, 1973). A IFI-IgG evi-

dencia anticorpos dirigidos para os antígenos de superfície de *Toxoplasma gondii* (JACOBS⁵¹, 1973; RIEMANN e cols.⁷⁵, 1974), enquanto que a reação de hemaglutinação revela anticorpos relacionados a constituintes citoplasmáticos de origem protéica, bastante solúveis (APT e cols.⁴, 1973; BEHYMER e cols.⁶, 1973; JACOBS⁵¹, 1973; JONES⁵⁵, 1973; McKINNEY⁶⁸, 1973; RIEMANN e cols.⁷⁵, 1974).

Devido à natureza do antígeno de *Toxoplasma gondii*, a reação de hemaglutinação reage mais tardiamente na evolução da infecção, enquanto que a de imunofluorescência fornece os resultados mais precocemente, ao redor da segunda semana de infecção. Os títulos de anticorpos evidenciados pela hemaglutinação mantêm-se por um longo período de tempo, enquanto que os títulos revelados pela reação de IFI-IgG persistem indefinidamente em níveis baixos (KROGSTAD e cols.⁵⁹, 1972; APT e cols.⁴, 1973; JONES⁵⁵, 1973; LEVINE⁶¹, 1973; McKINNEY⁶⁸, 1973; SEAH⁸⁷, 1973; RIEMANN e cols.⁷⁵, 1973).

JACOBS & LUNDE⁵² (1957) referem-se à reação de hemaglutinação como apresentando incontestáveis vantagens quando comparada às provas de Sabin-Feldman e imunofluorescência indireta, pelo menos para a espécie humana. Assim, com relação à primeira, tem a vantagem de dispensar o fator acessório e o antígeno vivo e em relação à segunda, dispensa o microscópio de fluorescência, o que aliado à elevada praticidade, torna-a recomendável

também para fins de inquéritos epidemiológicos.

SATO e cols.⁸⁴ (1962) revelaram a impossibilidade de aplicação da hemaglutinação original de JACOBS & LUNDE⁵² (1957) em soros de suínos e, por isso, propuseram modificações com o intuito de adaptá-la adequadamente. Este objetivo é alcançado substituindo o soro normal de coelho pelo soro normal de suíno e realizando todos os procedimentos como a lavagem e ressuspensão dos eritrócitos pelo ácido tânico a 0°C, após o que a prova de hemaglutinação passou a ser exequível, fornecendo resultados comparáveis (90% de concordância) aos obtidos pela prova de Sabin-Feldman. Posteriormente foram sendo introduzidas outras modificações à técnica original de JACOBS & LUNDE⁵² (1957). Hanaki e cols. (1964), citado por KATSUBE e cols.⁵⁶ (1967), substituíram o ácido tânico pelo bis-diazo-benzidina, no tratamento dos eritrócitos sensibilizados e introduziram o papel de filtro especial para a colheita de amostras de sangue, conhecido mais tarde como papel de Nobuto (NOBUTO e cols.⁷⁴, 1969).

ISHIZUKA⁴⁴ (1978) adaptou a prova de imunofluorescência indireta para soros de suínos e demonstrou uma concordância de 96,4% quando comparou aos resultados obtidos pela técnica de Sabin-Feldman, bem como uma estreita correlação entre os títulos de anticorpos medidos por uma e por outra prova, avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman ($S = 0,93$), recomendando ,

ainda, a utilização da imunofluorescência indireta para fins de inquérito epidemiológico.

Com base nos conceitos de Thorner e Reimein (1961), citados por VECCHIO⁹⁵ (1966), na avaliação de uma prova utilizada no diagnóstico de uma enfermidade deve ser considerada a sua validade, que é determinada por sua sensibilidade e especificidade. Sensibilidade é definida como a capacidade de um teste qualificar de positivos aqueles indivíduos que realmente tem a doença, enquanto que especificidade é a capacidade do teste apresentar resultados negativos para aqueles que estão livres da doença.

Por analogia a sensibilidade e especificidade BUCK e GART¹⁵ (1966) definiram co-positividade e co-negatividade como a probabilidade de um determinado teste detectar os positivos e os negativos, respectivamente, dentre os resultados positivos e negativos de uma prova utilizada como referência.

Animais da espécie suína tem merecido especial atenção dos epidemiologistas, pelo fato de se constituírem em importantes reservatórios de *Toxoplasma gondii* a outros animais e mormente ao homem, quando ingere carne crua ou insuficientemente submetida ao calor (DESMONTS²⁷, 1962; JACOBS⁵⁰, 1967; KATSUBE e cols.⁵⁶, 1967; GALOUZO³⁶, 1968; FELDMAN³⁰, 1968; WALLS & SCHULTZ⁹⁶, 1968; CĂTĂR e cols.²³, 1969; NOBUTO e cols.⁷⁴, 1969;

FRENKEL³², 1971; BRAVENY e cols.¹⁴, 1977).

No que se refere à inoculação experimental de suínos, pode-se deparar na literatura com vários trabalhos visando a diferentes objetivos. MOLLER e cols.⁷¹ (1970) e WORK e cols.¹⁰² (1970) inocularam porcas gestantes, visando ao estudo da toxoplasmose congênita nessa espécie.

DURFEE & CHIEN²⁸ (1971) administraram oralmente a um suíno adulto ratos infectados com a cepa Beverley de *Toxoplasma gondii*, por aproximadamente 20 dias. A prova de hemaglutinação indireta e o teste da pele tornaram-se positivos passados 15 e 30 dias, respectivamente da primeira administração, embora o animal não tivesse qualquer sintomatologia clínica.

ITO e cols.⁴⁹ (1974) procurando estudar o grau de patogenicidade da cepa 0-1 de *Toxoplasma gondii*, inocularam por via oral oito leitões com oocistos originários de gatos naturalmente infectados. Esses suínos foram agrupados dois a dois, recebendo diferentes quantidades do material infectante. O grupo I recebeu $1,7 \times 10^5$ oocistos; o grupo II, $1,7 \times 10^4$; o grupo III, $1,7 \times 10^3$ e o grupo IV, recebeu $1,7 \times 10^2$ oocistos. O grupo V foi constituído com outros dois que não foram inoculados, mas colocados dois dias após o início do experimento, um com os animais do grupo I e outro com os do grupo II. Todos os animais, inclusive os do grupo V, adoeceram do 39

ao 7º dia e todos morreram entre o 9º e 14º dias após a inoculação.

MEUTER e cols.⁶⁹ (1978) procurando verificar a capacidade de diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* de formar cistos em suínos, administraram oralmente ratos inoculados ou cérebros de ratos contendo cistos, a 8 animais de 8 meses e 18 de 11 meses de idade. Vários suínos morreram a partir do 6º dia após a administração com parasitemia aguda mas em nenhum animal houve o desenvolvimento de cistos.

ROUDNÁ⁸⁰ (1981) ao inocular dois porcos de dois meses e meio de idade, um por via oral e outro por via subcutânea com 10^3 cistos de *Toxoplasma gondii*, constatou, embora sem sintomas clínicos, o aparecimento da parasitemia a partir do 11º dia do experimento.

A avaliação da presença do protozoário em suínos tem-se baseado no seu isolamento a partir de fragmentos de carcaças e vísceras obtidas em matadouro (JACOBS e cols.⁵³, 1960; ISHII e cols.⁴², 1962; RUIZ⁸¹, 1966; BOCH¹¹, 1967; WORK¹⁰⁰, 1967; AMARAL & MACRUZ¹, 1969; CĂTĂR e cols.²³, 1969; JAMRA e cols.⁵⁴, 1969; DURFEE e cols.²⁹, 1974; SCHENK e cols.⁸⁶, 1977). O isolamento consiste na inoculação de material suspeito convenientemente tratado em camundongos albinos, e na avaliação clínica dos mesmos por um período de três a quatro semanas. Tal metodologia é, sem dúvida, pouco prática pela duração

prolongada, tornando-a, muitas vezes, inviável.

WORK¹⁰¹ (1968) inoculou camundongos com diferentes fragmentos de carne verde provenientes de de zoito suínos reagentes à prova de Sabin-Feldman, conse guindo o isolamento do parasito em 81% dos casos, quan do avaliados pelo soro-conversão e visualização de cis tos nos cê re bro s dos camundongos inoculados. CÄTÄR e cols.²³ (1969) confirmaram os achados de WORK¹⁰¹ (1968), acrescentando que as possibilidades de isolamento do *Toxoplasma gondii* em camundongos são maiores quanto mais elevados forem os títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma* no suíno infectado. Resultados semelhantes foram obti dos por BERENGO e cols.⁷ (1969) e por HELLESNESS e cols.⁴⁰ (1978), acrescidos do fato de terem conseguido o isola mento do *Toxoplasma gondii* a partir de suínos que apre sentaram resultados da prova de Sabin-Feldman tão bai xos quanto 1:10, e não isolaram o protozoário a partir de suínos negativos ao mesmo tempo teste.

Katsube & Oguihara, citados por NOBUTO & TSUTSUMI⁷³ (1974), isolaram o *Toxoplasma gondii* de suí nos experimentalmente inoculados, verificando uma estreí ta associação entre os resultados positivos à prova de hemaglutinação e os de inoculação em camundongos. Conclu em que suínos reagentes à prova de hemaglutinação são presumivelmente portadores de cistos em seu organismo, pelo fato de que, em se tratando de infecção natural,

não estando os cistos presentes em elevado número, a sua visualização ou isolamento torna-se difícil, oferecendo, desta maneira, resultados falsos negativos à prova de isolamento em camundongos ou à visualização do *Toxoplasma gondii* em cortes histológicos ou decalques.

Neste sentido, as pesquisas de levantamentos sorológicos a nível de matadouros ou em rebanhos são utilizadas não só para estimar a frequência de ocorrência da infecção toxoplásmica em suínos, como também para se avaliar o risco de infecção a que se expõe a população humana que se alimenta de carne de origem suína, notadamente quando ingerida crua ou parcialmente submetida à cocção. Encontra-se, também, suficientemente documentado o fato de que o manuseio de animais infectados, de carcaças e vísceras contaminadas, representam um risco de infecção ao homem (BEVERLEY & BEATTIE¹⁰, 1954; LEVINE⁶¹, 1973; ISHIZUKA⁴⁶, 1978).

Relativamente a levantamentos de prevalência em matadouros, a literatura especializada apresenta alguns autores que, em diferentes países e valendo-se de diversas provas sorológicas, obtiveram valores variáveis como se depreende da TABELA 1.

No tocante à toxoplasmose em rebanhos suínos, sem distinção de grupo etário, pode-se compilar na literatura vários levantamentos, apresentados por diferentes autores, utilizando-se diversas provas sorolôgi-

cas. · Esses dados acham-se inseridos na TABELA 2.

Na maioria dos trabalhos consultados, relacionados a inquēritos sorolōgicos realizados em rebanhos suīnos, verifica-se que os autores nāo levaram em consideraçaō as variāveis idade e sistema de criaçaō (extensiva ou intensiva). Essas variāveis devem ser consideradas na avaliaçaō da prevalēncia da toxoplasmose, pois observa-se um aumento da ocorrēncia desta zoonose, diretamente proporcional ao desenvolvimento etārio, tanto no homem (WALTON e cols.⁹⁷, 1966; ROEVER-BONNET e cols.⁷⁹, 1969; FRENKEL³², 1971; RIEMANN e cols.⁷⁵, 1974), como nōs animais (BOCH & ROMMEL¹², 1963; NOBUTO e cols.⁷⁴, 1969 ; CAMPANA-ROUGET e cols.¹⁹, 1974).

Segundo GARRIDO e cols.³⁷ (1972), o tipo de criaçaō de suīnos pode ser causa de variabilidade na prevalēncia da toxoplasmose, pois nas criaçōes intensivas, em recintos fechados, embora submetidos a regime de vigilāncia sanitāria e boas condiçōes de manejo, os animais podem ingerir ratos e dejetos, aumentando assim as possibilidades de se infectarem.

TABELA 1 - Frequência de toxoplasmose (%) em suínos abatidos em matadouros, por diferentes provas sorológicas, em diversos países. Vários autores em diferentes anos.

Autor	Ano	País	%	Prova
FOLKERS e PERIE ³¹	1963	HOLANDA	35,9	SF
BOCH e cols. ¹³	1964	ALEMANHA	65,6	SF
ROCH e VARELA ⁷⁷	1966	MÉXICO	42,0	SF
MATSUI e cols. ⁶⁵	1967	JAPÃO	10,3	HA
ROEVER-BONNET ⁷⁸	1967	SURINAME	31,0	SF
ZARDI e cols. ¹⁰³	1967	ITÁLIA	54,6	SF
CALLOT e cols. ¹⁶	1970	FRANÇA	18,9	IFI
GILL e PRAKASH ³⁸	1971	ÍNDIA	19,2	SF
GARRIDO e cols. ³⁷	1972	ESPANHA	43,4	IFI
ISHII e cols. ⁴³	1972	JAPÃO	35,1	HA
VANDERWAGEN e cols. ⁹³	1974	ESTADOS UNIDOS	26,5	HA
AMARAL e cols. ²	1975	BRASIL	22,8	HA
SCHENK e cols. ⁸⁵	1976	BRASIL	29,9	IFI
KRAFT e cols. ⁵⁸	1976	ALEMANHA	37,0	SF
CARROZ ²¹	1977	SUIÇA	55,4	SF
HANSEM e cols. ³⁹	1977	SUÉCIA	40,3	SF
MANUEL e TUBONGBANUA ⁶³	1977	FILIPINAS	19,6	HA
MARTINI e MARTIN ⁶⁴	1977	ARGENTINA	77,8	HA
AMARAL e cols. ³	1978	BRASIL	18,9	HA
HELLESNESS e cols. ⁴⁰	1978	NORUEGA	10,1	SF
ISHIZUKA ⁴⁵	1978	BRASIL	32,3	IFI
CHHABRA e MAHAJAN ²⁴	1979	ÍNDIA	32,0	HA

SF - Sabin-Feldman

IFI - imunofluorescência indireta

HA - hemaglutinação

TABELA 2 - Frequência de toxoplasmose (%) em rebanhos suínos, por diferentes provas sorológicas, em diversos países. Vários autores em diferentes anos.

AUTOR	ANO	PAÍS	%	PROVA
WENDE e DIENS ⁹⁹	1961	ESTADOS UNIDOS	68,8	SF
Mc CULLOCH e cols. ⁶⁶	1964	ESTADOS UNIDOS	15,6	SF
SINGH e cols. ⁸⁸	1967	SINGAPURA	27,7	HA
		MALÁSIA	12,5	HA
Mc ILWAIN ⁶⁷	1969	ESTADOS UNIDOS	57,7	HA
SANTOS e cols. ⁸³	1978	BRASIL	24,7	HA
TIZARD e cols. ⁹¹	1978	CANADÁ	45,0	SF
VASCONCELOS e cols. ⁹⁴	1979	BRASIL	47,0	IFI

SF - Sabin-Feldman

IFI - Imunofluorescência indireta

HA - Hemaglutinação.

Devido à ocorrência de infecções inaparentes, aliadas à dificuldade de um diagnóstico clínico correto pela semelhança com outros quadros mórbitos, e por ser o suíno, sabidamente um animal de difícil manejo seriológico, assume significância o uso de reações sorológicas para estabelecer-se um diagnóstico mais preciso.

Levando-se em conta o importante papel do suíno na epidemiologia da toxoplasmose e a conveniência da utilização de um método diagnóstico para fins de levantamentos sorológicos, que apresente vantagens como facilidade de obtenção de amostras para exame, rapidez de resultados, sem a necessidade de equipamentos sofisticados; considerando-se ainda, em nosso meio, a ausência de pesquisas nesse sentido, idealizou-se o presente trabalho com o intuito de contribuir para o estudo epidemiológico da toxoplasmose suína, dentro de uma visão abrangente de Saúde Pública. Os objetivos da presente pesquisa são:

1. estudo da inoculação experimental de suínos, acompanhando a dinâmica da evolução dos anticorpos revelados pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta, durante as primeiras semanas de infecção;

2. estudo da concordância de resultados das provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação e cálculo dos índices de co-positividade e co-negatividade;

3. avaliação da prevalência da infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pertencentes a diferentes modalidades de exploração zootécnica, pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL

2.1.1 - SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Com a finalidade de estudar a dinâmica da evolução dos anticorpos anti-*Toxoplasma*, utilizaram-se a animais da espécie suína, com idade aproximada de 180 di as, e pesos variando de 60 a 80 kg., de diversas raças (Duroc, Landrace e Large White). Estes suínos, devidamente identificados por números, foram mantidos em boxes , formando lotes de 5 animais. Esses locais, bem como os comedouros e bebedouros, eram higienizados diariamente impedindo-se o acesso de roedores. Durante todo o experimento, utilizaram-se ração comercial balanceada* e ã gua "ad libitum".

Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de adaptação ao manejo e alimentação e somente foram incluídos no experimento após exames clínicos, controles hematológicos e coproparasitológicos, medicando-se com tetramisol (cloridrato de tetramisol), na dose de 8 mg/kg, aqueles infestados por helmintos. Foi realizada, também, a pesquisa de anticorpos anti - *Toxo-*
plasma pelas técnicas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação.

Os lotes experimentais foram formados por

* Ração Socil para suínos, gentilmente cedida pelo Serviço Médico-Cirúrgico e Hospitalar da FMVZ-USP e pela Socil Prô-Pecuária S.A.

animais considerados clinicamente sadios, sem alterações hematológicas, com exames parasitológicos negativos e livres de anticorpos anti - *Toxoplasma*, segundo os resultadados das provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. Desta forma, selecionou-se 27 suínos para compor os lotes deste experimento.

2.1.2 - INÓCULO

A cepa de *Toxoplasma gondii*, utilizada na inoculação dos suínos, proveio da Seção de Parasitologia Animal do Instituto Biológico da Secretaria de Negócios da Agricultura do Estado de São Paulo.*

A amostra M.S. - 1-20, designada por cepa "A", foi isolada por AMARAL & MACRUZ¹ (1969), a partir de suínos de matadouro e mantida no laboratório daquela instituição por passagens em camundongos albinos, através de inoculações a cada 4 dias. O preparo do inóculo obedeceu ao seguinte critério: injetava-se 1,0 ml de solução fisiológica estéril, procedendo-se ao lavado peritoneal de camundongos inoculados há 2 ou 3 dias; a seguir, diluía-se a 1/10 o lavado peritoneal, lavava-se em solução fisiológica e ressuspendia-se em 4,0 ml de solução salina fosfatada (pH 7,4), procedendo-se a quatro contagens em câmara hematómica de Neubauer, considerando-se o valor médio. Em seguida completava-se o volume para 30,0 ml com solução salina fosfatada (pH 7,4), para facili

* Cedidas gentilmente pelo Dr. Vicente Amaral.

litar a inoculação dos animais.

2.1.3 - CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS

Os suínos foram dispostos em três grupos. O primeiro deles (Grupo I), composto de 10 animais, 7 machos e 3 fêmeas, previamente selecionados e submetidos às normas anteriormente citadas. Cada animal foi inoculado com 1,0 ml da suspensão de *Toxoplasma gondii* da cepa "A", na forma infectante de taquizoítos, aproximadamente $2,5 \times 10^6$, por via intraperitoneal.

O grupo II, também constituído por 10 animais, 7 machos e 3 fêmeas, selecionados e preparados de forma idêntica aos animais do grupo I, foi inoculado por via intraperitoneal com 2,0 ml da suspensão de *Toxoplasma gondii*, aproximadamente $5,0 \times 10^6$ de taquizoítos.

O grupo III, constituído por 7 animais, 4 machos e 3 fêmeas, foi mantido como controle, sem inoculação.

2.1.4 - COLHEITA DE SANGUE

2.1.4.1 - PARA A TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

As amostras de sangue dos três grupos experimentais foram colhidas em tubos de centrifuga, por punção da veia cava anterior, segundo CARLE & DEWHIRST

²⁰ (1942), imediatamente antes do momento da inoculação e 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 42, 56 e 84 dias após a referida inoculação.

No laboratório, procedeu-se à separação dos soros sanguíneos, que foram estocados em frascos de vidro a -20°C, até o momento da execução da prova.

2.1.4.2 - PARA A PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO

Amostras de sangue foram colhidas em papel de filtro próprio* até a absorção total da área correspondente.

Uma vez no laboratório, para se processar a secagem, os papéis de filtro foram dispostos em suportes apropriados, à temperatura ambiente, mas protegidos da ação da radiação solar direta, após o que foram guardados em congelador, até o momento do uso.

2.2 - ESTUDO DA CONCORDÂNCIA DOS RESULTADOS DAS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E HEMAGLUTINAÇÃO.

Para o estudo da concordância dos resultados entre as provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, foram colhidas amostras de sangue de 273 suí-

* O papel de filtro foi doação da Daiichi-Seyaku Co. do Japão, com dimensões segundo ilustração abaixo:

nos, em matadouros, durante a rotina de sangria, uma em tubo de centrífuga, para a realização da prova de imunofluorescência indireta, e outra em papel de filtro especial, para a prova de hemaglutinação, observando-se os mesmos cuidados descritos anteriormente.

2.3 - PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA EM REBANHOS SUÍNOS COM DIFERENTES MODALIDADES DE EXPLORAÇÃO ZOOTÉCNICA.

Foram selecionados dois rebanhos do município de Pirassununga, Estado de São Paulo, diferenciados quanto ao sistema de exploração zootécnica, sendo um de modalidade intensiva e o outro semi-intensiva. Do primeiro rebanho, população de tamanho 401, foram selecionados 163 animais para a constituição da amostra, obedecendo-se à estratificação amostral segundo os grupos etários de interesse zootécnico. Do segundo rebanho, população de tamanho 576, foram selecionados 185 suínos, obedecendo-se aos mesmos critérios de estratificação (TABELAS 3 e 4).

Os tamanhos das amostras em cada estrato foram obtidos mediante a utilização da seguinte fórmula para cálculo de amostragens de populações finitas, (MIGUEL⁷⁰, 1982):

$$n = \frac{no}{1 + \frac{no - 1}{N}}$$

$$\text{onde: } no = \frac{p \cdot q \cdot Z_{\alpha/2}^2}{d^2}$$

$$Z_{\alpha/2} = 1,65 \text{ para } \alpha = 5\%$$

$$p = 0,5 \text{ (valor populacional na proporção de reagentes)}$$

$$q = \text{complemento de } p = (1-p)$$

$$d = 0,05 \text{ (erro de amostragem)}$$

$$no = \text{tamanho da amostra com população infinita}$$

$$N = \text{tamanho da população finita}$$

$$n = \text{tamanho da amostra com população finita}$$

TABELA 3 - Amostragem de suínos de criação intensiva segundo os grupos etários.

Grupos etários (meses)	Nº de animais no rebanho	Nº de animais na amostra
0 ▶ 2	79	32
2 ▶ 4	85	35
4 ▶ 6	93	38
> 6	144	58
TOTAL	401	163

TABELA 4 - Amostragem de suínos de criação semi-intensiva segundo os grupos etários.

Grupos etários (meses)	Nº de animais no rebanho	Nº de animais na amostra
0 ▶ 2	101	32
2 ▶ 4	133	43
4 ▶ 6	147	47
> 6	195	63
TOTAL	576	185

As amostras de sangue de cada um dos animais que constituíram os grupos amostrais foram colhidas conforme técnicas descritas no item 2.1.4.

2.4 - PROVA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA

2.4.1 - ANTÍGENO

É representado pelo *Toxoplasma gondii*, cepa RH, mantido no laboratório por repiques periódicos (ca da 48 horas) em peritônio de camundongo albino. Ao exsudato peritoneal livre de células, adicionou-se igual volume de solução salina com 2% de formaldeído, e mantido em repouso por 30 minutos em estufa a 37°C. Em seguida, centrifugou-se, lavou-se o precipitado com solução salina por duas vezes e finalmente diluiu-se com a mesma até obter-se 10 a 20 parasitas por campo microscópico observado com um aumento de 400 vezes. O antígeno assim preparado foi distribuído em lâminas quadriculadas para microscopia de fluorescência, conforme ilustração abaixo, que eram colocadas para secagem à temperatura ambiente e, posteriormente mantidas em congelador a -20°C até o momento do uso.

2.4.2 - CONJUGADO ANTI-GLOBULINA SUÍNA-FLUORESCEÍNA.

O conjugado empregado na execução da prova de imunofluorescência indireta foi preparado no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme recomendam ISHIZUKA e cols.⁴⁷ (1974).

2.4.3 - ANTI-GLOBULINA DE SUÍNO

Para a inoculação de globulina de suíno, previamente precipitada em solução saturada de sulfato de amônio, foram utilizados coelhos albinos adultos, procedentes do biotério do Instituto Butantan da Secretaria do Estado dos Negócios da Saúde de São Paulo, obedecendo ao esquema de imunização preconizado por CAMARGO¹⁸ (1967). A resposta imunitária destes animais foi acompanhada, empregando-se a técnica de precipitação em gel de ágar, como recomenda BEUTNER⁹ (1965), utilizando-se os animais que apresentaram título igual ou superior a 1:128.

2.4.4 - MARCAÇÃO DAS ANTI-GLOBULINAS

A marcação das anti-globulinas foi realizada pelo método rápido, utilizando-se o isotiocianato de fluoresceína, BBL, isômero I, cristalino e cromatografi-

camente puro. O excesso de fluorocromo foi retirado por gel filtração em coluna de Sephadex G-25, de acordo com a técnica descrita por CAMARGO¹⁸ (1967).

2.4.5 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FLUORESCENTE ESPECÍFICA.

As lâminas quadriculadas, conforme item 2.4.1, contendo antígeno, foram tratadas com soro positivo (título 1:1000 para toxoplasmose suína) e soro negativo, ambos diluídos a 1:64. Posteriormente, sobre cada quadriculado colocou-se cerca de 0,02 ml de conjugado diluído a 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:100; 1:120; 1:140; 1:160; 1:180 e 1:200 em solução de azul de Evans a 0,02 g%. A fluorescência foi observada até 1:40 quando do soro negativo e até 1:160 quando do soro positivo, sendo o conjugado utilizado na diluição de 1:120.

2.4.6 - SOROS TESTEMUNHAS

A cada titulação incluía-se um soro positivo e um negativo para controle de sensibilidade e especificidade do método.

2.4.7 - TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

A prova de imunofluorescência indireta foi realizada segundo a técnica descrita por CAMARGO¹⁷

(1964) e adaptada para a espécie suína por ISHIZUKA⁴⁴ (1978).

As amostras de soro, após descongeladas e inativadas a 56°C por 30 minutos, foram diluídas em solução salina fosfatada pH 7,2 (1:16; 1:64; 1:256; 1:1024 e 1:4096), sendo estas sucessivas diluições colocadas em lâminas próprias nas áreas correspondentes, segundo o esquema:

As lâminas foram mantidas a 37°C em câmara úmida, durante 45 minutos, e lavadas duas vezes por imersão em solução salina tamponada. Em seguida, foram secas sob jato de ar quente. As áreas quadriculadas foram cobertas com 0,02 ml de conjugado anti-globulina de suíno, diluído a 1:120 em solução de azul de Evans a 0,02 g%, e colocadas novamente a 37°C por 45 minutos em câmara úmida, lavadas por duas vezes durante 10 minutos em solução salina fosfatada, 5 minutos em água destila-

da, secas e montadas com lamínulas pelo emprego de glicerina tamponada pH 9,5 e vedadas com esmalte. As lâminas assim preparadas foram observadas ao microscópio binocular Zeiss de fluorescência com epi-iluminação, e pela objetiva de imersão (40x) provida de diafragma, campo escuro, filtro excitador BG-12, filtro barreira 50 e condensador cardíóide.

Como título do soro foi tomado a recíproca da maior diluição do mesmo que evidenciara fluorescência em toda a periferia do *Toxoplasma* ainda que de pequena intensidade. Nas reações negativas, os toxoplasmas não apresentavam fluorescência, ou esta localizava-se apenas numa das extremidades do parasito (coloração polar).

2.5 - PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO

2.5.1 - ANTÍGENO

O antígeno liofilizado* e preparado segundo Hanaki e cols. (1964), citado por KATSUBE e cols.⁵⁶ (1967), era constituído de derivado citoplasmático de *Toxoplasma gondii*, absorvido em hemácias formolizadas de carneiro, por meio do BBD (bis-diazo-benzidina). Tal antígeno era acompanhado de diluente composto de solução salina fosfatada, pH 7,2, adicionada de 2% de soro normal de suíno.

* Gentilmente cedido pela Daiichi-Seyaku Co. do Japão.

2.5.2 - ELUIÇÃO DO SORO

A área de absorção do papel de filtro contendo o sangue absorvido (ver Ítem 2.1.4) era seccionada com tesoura em quatro fragmentos e colocada em tubos de ensaio (10 x 75 mm). Em seguida adicionava-se 0,6 ml do diluente e mantinha-se à temperatura ambiente por 60 minutos, para haver a extração dos anticorpos.

2.5.3 - PREPARO DO ANTÍGENO PARA HEMAGLUTINAÇÃO

O antígeno liofilizado foi dissolvido em 5,0 ml do diluente e colocado em repouso por 1 a 2 minutos na própria ampola. A seguir, transferido para um tubo de centrífuga e adicionado de mais 3,0 ml do diluente, serviu para lavar a ampola e aproveitar totalmente o antígeno. Depois de um repouso de 30 minutos, foi centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. Esta operação foi repetida mais uma vez e o sedimento ressuspenso em 2,8 ml do diluente.

2.5.4 - TÉCNICA DA PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO

A prova de hemaglutinação foi realizada segundo a técnica adaptada por Hanaki e cols.(1964), citados por KATSUBE e cols.⁵⁶ (1967) para a espécie suína a partir da técnica original de JACOBS & LUNDE⁵²(1957),

utilizando-se pipetas e placas para microtitulação (Cooke Engineering Co.). Sobre essas placas de fundo cônico, foram preparadas quatro diluições do eluído com a suspensão do antígeno. As diluições foram 1:64; 1:256 ; 1:1024 e 1:4096 sendo o 5º orifício reservado apenas para o antígeno. Em cada placa, incluía-se um soro positivo e um negativo, colocando-se em seguida o conjunto em estufa a 37°C durante 3 horas, ou deixando-se à temperatura ambiente até o dia seguinte, quando se fazia a leitura do resultado. Este seria positivo quando houvesse uma formação irregular ao fundo do orifício e negativo quando houvesse um ponto uniforme ou um pequeno anel.

2.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se as seguintes técnicas: estatística Kappa , para medir concordância (COHEN²⁶, 1960); teste binomial, conforme descrito por BERQUÕ e cols.⁸ (1981), para a comparação de duas proporções provindas de duas populações correlacionadas; as comparações para verificar possíveis diferenças entre as prevalências dos tipos de criação dos rebanhos foram feitas pela simples observação dos intervalos de confiança. Havendo superposição dos valores dos intervalos, considerou-se não haver diferença estatisticamente significativa.

As estimativas de prevalência por ponto para o rebanho foram obtidas pela devida ponderação, e as variâncias empregadas na obtenção dos intervalos de confiança foram calculadas com a correção para população finita (COCHRAN²⁵, 1977).

Tomando-se a prova de imunofluorescência indireta, como eventual técnica de referência, calcularam-se a co-positividade e a co-negatividade da hemaglutinação (BUCK e GART¹⁵, 1966).

O nível de significância adotado para análise estatística dos dados foi fixado em 5%.

3. RESULTADOS

3.1 - INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL

Os resultados da inoculação experimental podem ser visualizados nas TABELAS 5, 6, 7. Todos os animais inoculados com a amostra da cepa "A" de *Toxoplasma gondii*, na forma infectante de taquizoítos responderam ao estímulo antigênico, produzindo anticorpos detectados pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação.

Por outro lado, os animais do grupo III, que se constituiu no controle deste experimento, permaneceram negativos às duas provas durante toda a fase de observação.

No 7º dia após a inoculação, 14 (74,0%) e 4 (21,0%) dos animais inoculados foram reagentes respectivamente às provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. Cabe ressaltar que os 4 animais reagentes à prova de hemaglutinação pertenciam ao grupo II, portanto foram os que receberam maior dose infectante.

Ambas as reações tornaram-se positivas em todos os animais infectados decorridos 10 dias da inoculação, e assim permanecendo durante todo o período do experimento (TABELAS 5, 6, 7).

Para uma melhor visualização, a evolução dos anticorpos revelados pelas duas provas empregadas no presente experimento está apresentada sob a forma de

gráficos, (Gráficos 1, 2 e 3), sendo os dois primeiros baseados nas medianas dos títulos de anticorpos dos animais dos grupos I e II e o último apresentando as medianas dos títulos de todos os animais inoculados.

No Gráfico 1 verifica-se a ascensão dos níveis de anticorpos determinados pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação dos animais do grupo I (inoculados com $2,5 \times 10^6$ taquizoítos), tendo a primeira prova revelado a presença de anticorpos na primeira semana pós-inoculação, atingindo o nível máximo no 10º dia e assim permanecendo nas 12 semanas subsequentes (84 dias). Os anticorpos hemaglutinantes surgiram a partir do 7º dia, alcançando um título de 256 no 14º dia, permanecendo estacionário até o 28º dia (4a. semana), surgindo nova ascensão até o 35º dia (5a. semana), um platô até o 42º dia (6a. semana), declinando posteriormente até o 49º dia (7a. semana), permanecendo estável até o final da observação.

No Gráfico 2, relativo ao grupo II (animais inoculados com $5,0 \times 10^6$ taquizoítos), a prova de imunofluorescência indireta apresentou uma ascensão dos títulos a partir da 1a. semana, atingindo o valor mais elevado (título 4096) entre o 17º e 21º dia. Estes valores, a seguir, decresceram, formando um platô entre o 28º dia (4a. semana) e o 42º dia (6a. semana), apresentando então um ligeiro declínio e estabilizando-se a partir do

49º dia. Os títulos dos anticorpos hemaglutinantes apresentaram comportamento idêntico ao do grupo anterior, iniciando a ascensão a partir do 7º dia, um platô do 10º ao 28º dia, nova ascensão, atingindo o valor máximo no período do 35º ao 42º dia (título de 4096), iniciando a seguir um declínio, para a partir do 49º dia, apresentar título igual a 256, que permaneceu até o final da observação.

No Gráfico 3, estão representadas em conjunto as medianas dos títulos dos dois grupos anteriores. Pode-se verificar que a prova de imunofluorescência indireta detectou anticorpos mais precocemente do que a prova de hemaglutinação, pois observou-se ascensão dos títulos na 1a. semana, atingindo um título alto (1024) no 7º dia, com valor máximo (título de 4096) no 21º dia, decrescendo para um título igual a 1024, que permaneceu até o final das observações. A reação de hemaglutinação iniciou a ascensão na 2a. semana, atingindo título igual a 256 no 10º dia, estabilizando até o 28º dia, para sofrer nova elevação com valor máximo entre o 35º e o 42º dia (5a. e 6a. semanas pós-inoculação), declinando e estabilizando novamente a partir do 49º dia, com um título de 256 até o final do experimento.

Pela observação do Gráfico 3, verifica-se que a primeira resposta imunitária máxima ocorreu por volta do 10º dia após a inoculação. Adotando-se este mo

mento como critério para o cálculo da sensibilidade e especificidade das provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, pode-se verificar que estes dois valores valem 100%, visto que todos os animais infectados responderam ao estímulo imunogênico e nenhum dos não inoculados respondeu com produção de anticorpos (TABELAS 5, 6, 7).

TABELA 5 - Suínos reagentes e não reagentes às provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, antes e após a inoculação com *Toxoplasma gondii*, na forma infectante de taquizoítos. São Paulo, 1983.

Tempo (dias)	Prova de Imunofluorescência indireta				Prova de Hemaglutinação			
	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes
0	0	20	20	0	0	20	20	0
3	0	20	20	0	0	20	20	0
7	14	5	19*	74	14	15	19*	21
10	19	0	19	100	19	0	19	100
14	19	0	19	100	19	0	19	100
17	19	0	19	100	19	0	19	100
21	19	0	19	100	19	0	19	100
24	19	0	19	100	19	0	19	100
28	19	0	19	100	19	0	19	100
31	19	0	19	100	19	0	19	100
35	19	0	19	100	19	0	19	100
42	19	0	19	100	19	0	19	100
49	19	0	19	100	19	0	19	100
56	19	0	19	100	19	0	19	100
84	19	0	19	100	19	0	19	100

* Morte de um animal durante o experimento.

TABELA 6 - Evolução dos títulos de anticorpos medidos pela prova de imunofluorescência indireta em suínos inoculados com $2,5 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ taquizoítos (respectivamente grupos I e II). São Paulo, 1983.

Grupo	Animal Nº	Tempo (dias)														
		0	3	7	10	14	17	21	24	28	31	35	42	49	56	84
I	1	-	-	256	256	256	256	256	256	256	1024	1024	1024	1024	1024	256
	2	-	-	-	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	256	256
	3	-	-	64	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	256	256
	4	-	-	64	1024	1024	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	1024	1024
	5	-	-	256	1024	1024	1024	4096	4096	4096	4096	1024	1024	1024	1024	1024
	6	-	-	*												
	7	-	-	64	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	8	-	-	-	64	1024	4096	4096	4096	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	9	-	-	64	256	256	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	10	-	-	64	256	256	1024	1024	1024	1024	256	256	256	256	256	256
II	1	-	-	64	256	4096	4096	4096	4096	4096	4096	1024	1024	1024	1024	1024
	2	-	-	64	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	1024	1024	1024
	3	-	-	16	64	256	1024	1024	1024	1024	1024	256	256	256	256	256
	4	-	-	256	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	256	256	256
	5	-	-	-	64	256	4096	4096	4096	1024	1024	1024	1024	64	64	64
	6	-	-	-	1024	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	1024	1024	1024
	7	-	-	1024	4096	4096	4096	4096	1024	1024	1024	1024	256	256	256	256
	8	-	-	4096	4096	4096	4096	4096	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	9	-	-	-	1024	1024	4096	4096	1024	1024	1024	1024	256	256	256	256
	10	-	-	256	1024	1024	1024	1024	4096	4096	4096	4096	4096	1024	1024	1024

* Óbito durante o experimento.

TABELA 7 - Evolução dos títulos de anticorpos medidos pela prova de hemaglutinação em suínos inoculados com $2,5 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ taquizoítos (respectivamente grupos I e II).
São Paulo, 1983.

Tempo (dias) Animal Nº		0	3	7	10	14	17	21	24	28	31	35	42	49	56	84
Grupo																
I	1	-	-	-	64	64	64	64	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	2	-	-	-	64	64	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	3	-	-	-	64	64	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	4	-	-	-	256	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	5	-	-	-	256	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	6	-	-	*												
	7	-	-	-	256	1024	1024	1024	1024	1024	4096	4096	4096	256	256	256
	8	-	-	-	64	1024	1024	1024	1024	1024	4096	4096	4096	256	256	256
	9	-	-	-	64	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	1024	1024	1024
	10	-	-	-	64	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
II	1	-	-	-	256	1024	1024	1024	1024	1024	4096	4096	4096	1024	1024	256
	2	-	-	-	256	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	3	-	-	-	64	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	4	-	-	64	256	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	5	-	-	-	64	64	256	256	256	256	1024	4096	4096	64	64	64
	6	-	-	-	256	1024	1024	1024	1024	1024	4096	4096	4096	4096	4096	4096
	7	-	-	64	256	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	8	-	-	64	256	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	9	-	-	-	256	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256
	10	-	-	64	256	256	256	256	256	256	1024	4096	4096	256	256	256

* Óbito durante o experimento.

Gráfico 1 - Mediana dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de suínos inoculados com a forma infectante de taquizoítos ($2,5 \times 10^6$), segundo as provas de imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação (HA) e tempo decorrido da inoculação. São Paulo, 1983.

Gráfico 2 - Mediana dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de suínos inoculados com $5,0 \times 10^6$ taquizoítos (animais do grupo II), segundo as provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação (HA) e tempo decorrido da inoculação. São Paulo, 1983.

Gráfico 3 - Mediana dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de suínos inoculados com $2,5 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ taquizoítos (animais dos grupos I e II), segundo as provas de imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação (HA) e tempo de corrido da inoculação. São Paulo, 1983.

3.2 - ESTUDO DA CONCORDÂNCIA DE RESULTADOS ENTRE AS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) E HEMAGLUTINAÇÃO (HA); CÁLCULO DA CO-POSITIVIDADE E DA CO-NEGATIVIDADE DE HA EM RELAÇÃO A IFI.

Para um estudo inicial da concordância de resultados entre as provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, constituiu-se a TABELA 8 onde estão inseridos os resultados expressos em títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma* (recíproca da diluição), avaliados por ambas as provas.

TABELA 8 - Número de soros de suínos, segundo os títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma* avaliados pelas provas de imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação (HA) São Paulo, 1983.

IFI \ HA	HA					
	<64	64	256	1000	4000	T
<16	115					115
16	41					41
64	1	39				40
256	-	30	17			47
1024	1	8	8	3		20
4096	-	1	5	1	3	10
TOTAL	158	78	30	4	3	273

Observou-se que, dentre os resultados positivos a pelo menos um dos métodos, 39,2% (62/158) forneceram resultados concordantes, enquanto que 50,6% (80/158) apresentaram discrepância de uma diluição e 10,2% (16/158) se afastaram de duas diluições ou mais, sendo que títulos mais elevados foram observados somente pela imunofluorescência indireta.

Pela observação da TABELA 8, verifica-se uma tendência a uma distribuição triangular, favorecendo o lado representado pela prova de imunofluorescência indireta. Com esses dados, elaborou-se a TABELA 9, onde estão apresentados os resultados de ambas as provas, classificados em reagentes e não reagentes.

TABELA 9 - Número de soros de suínos, segundo o resultado das provas de imunofluorescência indireta (IFI) hemaglutinação (HA). São Paulo, 1983.

IFI \ HA	-	+	T
-	115	0	115
+	43	115	158 (57,9%)
T	158	115 (42,1%)	273 (100%)

Pelos dados da TABELA 9, verifica-se que as provas apresentaram em 84,25% dos soros resultados concordantes e em 15,75% resultados discordantes, respectivamente 230 e 43 soros, sendo que estes últimos foram reagentes somente à prova de imunofluorescência indireta. O grau de concordância medido pela estatística Kappa foi da ordem de 69,24%. Revela ainda, que a porcentagem de reagentes pela imunofluorescência indireta ($158/273 = 57,9\%$) é maior do que a obtida pela hemaglutinação ($115/273 = 42,1\%$). O teste binomial para a diferença de proporções de duas populações correlatas apresentou neste caso resultado significativo ao nível de rejeição adotado de 5%.

Os índices de co-positividade e co-negatividade da prova de hemaglutinação, em relação a imunofluorescência indireta, neste caso empregada como referência, foram respectivamente 72,78 ($115/158$) e 100% ($115/115$).

3.3 - PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA EM REBANHOS SUÍNOS SEGUNDO AS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA IN DIRETA (IFI) E HEMAGLUTINAÇÃO (HA).

Realizadas as comparações dos resultados obtidos pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, utilizaram-se as duas técnicas para atender ao outro objetivo deste trabalho, qual seja avaliar a prevalência da infecção toxoplásmica em rebanhos suinos.

Respeitando-se a estratificação dos rebanhos estudados, conforme descrito no capítulo de material e métodos, nas TABELAS 10 e 11, são apresentados os resultados obtidos nos diferentes grupos etários, segundo o tipo de exploração zootécnica dos rebanhos (intensiva ou semi-intensiva) e o título de anticorpos, medidos pelas duas provas sorológicas.

TABELA 10 - Animais (Nº e %) da espécie suína segundo o título de anticorpos medido pela imunofluorescência indireta, grupo etário e tipo de exploração zootécnica. São Paulo, 1983.

Tipo de exploração Gr. etário (meses) Título de Ac.		Intensiva								Semi-intensiva							
		0 - 2		2 - 4		4 - 6		≥ 6		0 - 2		2 - 4		4 - 6		≥ 6	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
não reagente		16	50,0	23	65,7	24	63,2	12	20,7	17	53,1	29	67,4	27	57,4	21	33,3
1 : 16		1	3,1	0	0	2	5,3	4	6,9	3	9,4	2	4,7	1	2,1	3	4,8
1 : 64		9	28,1	9	25,7	3	7,9	5	8,6	9	28,1	8	18,6	9	19,2	7	11,1
1 : 256		5	15,7	2	5,7	8	21,0	16	27,6	3	9,4	4	9,3	9	19,2	12	19,0
1 : 1000		1	3,1	1	2,9	1	2,6	21	36,2	0	0	0	0	1	2,1	20	31,8
Total		32	100,0	35	100,0	38	100,0	58	100,0	32	100,0	43	100,0	47	100,0	63	100,0

TABELA 11 - Animais (Nº e %) da espécie suína segundo o título de anticorpos medido pela prova de hemaglutinação, grupo etário e tipo de exploração zootécnica.
São Paulo, 1983.

Tipo de criação Gr. etário (meses) Título de Ac.	Intensiva								Semi-intensiva							
	0 - 2		2 - 4		4 - 6		≥ 6		0 - 2		2 - 4		4 - 6		≥ 6	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
não reagente	17	53,1	25	71,4	26	68,4	19	32,8	20	62,5	31	72,1	28	59,6	27	42,9
1 : 64	11	34,4	8	22,8	3	7,9	8	13,8	11	34,4	9	20,9	9	19,1	6	9,5
1 : 256	4	12,5	1	2,9	8	21,1	10	17,2	1	3,1	3	7,0	10	21,3	10	15,9
1 : 1000	0	0	1	2,9	1	2,6	21	36,2	0	0	0	0	0	0	20	31,7
Total	32	100,0	35	100,0	38	100,0	58	100,0	32	100,0	43	100,0	47	100,0	63	100,0

Com base nas TABELAS 10 e 11, foram constituídas as de n.ºs. 12, 13, 14 e 15, onde são apresentados os resultados obtidos isoladamente em cada grupo etário. Nessas tabelas estão relacionados os resultados obtidos pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, classificando-os em reagentes e não reagentes, segundo o tipo de exploração dos rebanhos. Nas tabelas, encontram-se também os limites de confiança para as prevalências obtidas para ambas as provas nos diferentes grupos etários.

Verifica-se os intervalos de confiança para os resultados obtidos pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação dos rebanhos intensivo e semi-intensivo, para cada grupo etário observa-se que estão bem próximos, não havendo, em cada idade, diferenças estatisticamente significantes entre as prevalências obtidas para os tipos de criação.

TABELA 12 - Número de soros de suínos de 0 a 2 meses de idade, segundo o tipo de exploração zootécnica e os resultados das provas de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Hemaglutinação (HA). São Paulo, 1983.

Tipo de exploração		Intensiva			Semi-intensiva		
IFI	HA	-	+	T	-	+	T
-		16	0	16	17	0	17
+		1	15	16 (50,0%)	3	12	15 (46,9%)
Total		17	15 (46,9%)	32 (100,0%)	20	12 (37,5%)	32 (100,0%)

Limites de Confiança (95%)

Intensiva

IFI 36,6 $\pm$ 63,4

HA 33,5 $\pm$ 60,3

Semi-intensiva

IFI 32,5 $\pm$ 61,2

HA 23,5 $\pm$ 51,5

TABELA 13 - Número de soros de suínos de 2 a 4 meses de idade, segundo o tipo de exploração zootécnica e os resultados das provas de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Hemaglutinação (HA). São Paulo, 1983.

Tipo de exploração		Intensiva			Semi-intensiva		
		-	+	T	-	+	T
IFI \ HA	-	23	0	23	29	0	29
	+	2	10	12 (34,3%)	2	12	14 (32,6%)
	Total	25	10 (28,6%)	35 (100,0%)	31	12 (27,9%)	43 (100,0%)

Limites de Confiança (95%)

Intensiva

IFI 18,4 $\pm$ 50,2

HA 17,0 $\pm$ 40,2

Semi-intensiva

IFI 21,0 $\pm$ 44,2

HA 17,0 $\pm$ 38,8

TABELA 14 - Número de soros de suínos de 4 a 6 meses de idade, segundo o tipo de exploração zootécnica e os resultados das provas de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Hemaglutinação (HA). São Paulo, 1983.

Tipo de exploração		Intensiva			Semi-intensiva		
		-	+	T	-	+	T
IFI	HA						
	-	24	0	24	27	0	27
	+	2	12	14 (36,8%)	1	19	20 (42,6%)
Total		26	12 (31,6%)	38 (100,0%)	28	19 (40,4%)	47 (100,0%)

Limites de Confiança (95%)

Intensiva
IFI 25,0 $\pm$ 48,6
HA 20,2 $\pm$ 43,0

Semi-intensiva
IFI 30,1 $\pm$ 54,4
HA 28,8 $\pm$ 52,0

TABELA 15 - Número de soros de suínos de mais de 6 meses de idade, segundo o tipo de exploração zootécnica e os resultados das provas de Imunofluorescência indireta (IFI) e Hemaglutinação (HA). São Paulo, 1983.

Tipo de exploração IFI \ HA	Intensiva			Semi-intensiva		
	-	+	T	-	+	T
-	12	0	12	21	0	21
+	7	39	46 (79,3%)	6	36	42 (66,7%)
Total	19	39 (67,2%)	58 (100,0%)	27	36 (57,1%)	63 (100,0%)

Limites de Confiança (95%)

Intensiva

IFI 71,5 $\pm$ 87,1

HA 58,0 $\pm$ 76,4

Semi-intensiva

IFI 57,3 $\pm$ 76,1

HA 47,1 $\pm$ 67,1

Na TABELA 16, são apresentadas as prevalências de toxoplasmose nos dois rebanhos, segundo os resultados das provas sorológicas empregadas, para o conjunto das idades. Os valores das prevalências de infecção toxoplásmica para as criações intensiva e semi-intensiva foram da ordem de 54,0% e 49,2% quando examinados pela prova de imunofluorescência indireta e de 46,6% e 42,7% utilizando-se a prova de hemaglutinação. Abaixo da tabela estão relacionados os limites de confiança para as prevalências obtidas para ambas as provas nos rebanhos considerados.

A observação dos devidos pares de intervalos de confiança mostra que as diferenças entre os valores das prevalências não são estatisticamente significantes, segundo o tipo de criação.

Para uma melhor visualização da distribuição das prevalências nos diversos grupos etários estudados, elaborou-se o Gráfico 4, onde são apresentados os resultados e seus limites de confiança, de acordo com as provas empregadas e o tipo de criação do rebanho.

Nos dois rebanhos estudados pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, verificou-se uma ligeira queda na porcentagem de reagentes, quando comparamos o grupo etário do nascimento até 2 meses com o de 2 a 4 meses, para a seguir observar-se ascensão gradativa dessa porcentagem com o desenvolvimento etário.

TABELA 16 - Número de animais da espécie suína segundo o tipo de exploração zootécnica e o resultado frente às provas de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Hemaglutinação (HA), para avaliação de anticorpos anti-*Toxoplasma*. São Paulo, 1983.

Tipo de Exploração		Intensiva			Semi-intensiva		
		-	+	T	-	+	T
IFI	HA						
	-	75	0	75	94	0	94
	+	12	76	88 (54,0%)	12	79	91 (49,2%)
Total		87	76 (46,6%)	163 (100,0%)	106	79 (42,7%)	185 (100,0%)

Limites de confiança (95%)

criação intensiva

p/ IFI 49,7 ± 54,1* ± 58,4

p/ HA 42,0 ± 46,8* ± 51,5

criação semi-intensiva

44,4 ± 49,2* ± 54,0

37,9 ± 42,7* ± 47,4

* Prevalência ponderada

Gráfico 4 - Prevalência de toxoplasmose suína avaliada pelas provas de imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação (HA), segundo o grupo etário e o tipo de criação do rebanho. São Paulo, 1983.

4. DISCUSSÃO

O interesse dos pesquisadores pelo toxoplasmosse suína deve ser ressaltado pelo número de trabalhos publicados, apresentando resultados sorológicos e ou de isolamentos, o que, sem dúvida, responsabiliza essa espécie como uma importante fonte de infecção para o homem..

Através do exame da literatura compulsada, depreende-se que, para os estudos de prevalência, os autores utilizaram-se mais constantemente das reações de Sabin-Feldman, de imunofluorescência indireta e de hemaglutinação. No entanto, nesses relatos, observa-se que não há uma padronização dos antígenos utilizados nos inquêrititos realizados, como também não existe uniformidade nas diluições utilizadas nas provas e nem na consideração dos títulos a serem imputados como positivos, fatores esses que provavelmente podem causar dificuldades na avaliação epidemiológica da toxoplasmosse.

A prova de imunofluorescência indireta , para fins de avaliação de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de suínos, mostrou-se, segundo ISHIZUKA⁴⁴ (1978) , adequada para fins de levantamentos sorológicos. A desvantagem desta prova refere-se ao uso do microscópio de fluorescência, inacessível a muitos pesquisadores, principalmente aos veterinários de campo.

JACOBS & LUNDE⁵² (1957) preconizaram a prova de hemaglutinação para a espécie humana, que se caracteriza por maior praticidade do que a imunofluorescência indireta, dispensando, inclusive, o uso do microscópio de fluorescência. SATO e cols.⁸⁴ (1962) e, posteriormente, Hanaki e cols. (1964), citados por KATSUBE e cols.⁵⁶ (1967), adaptaram a referida prova para a espécie suína e assim foi testada, nesta pesquisa, comparando-a à prova de imunofluorescência indireta.

4.1 - INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL

A soroconversão ou o aumento gradativo dos títulos em duas amostras de soros colhidos com intervalos de uma a duas semanas, considerados requisitos básicos para se confirmar o diagnóstico de toxoplasmose, com ou sem sintomatologia clínica, foram observados nos animais dos grupos I e II, inoculados com a forma infectante de taquizoítos do *Toxoplasma gondii*. Foi exceção o suíno que morreu no 40 dia do experimento, com quadro clínico típico da doença: febre alta, dispnéia, secreção ocular, cianose do pavilhão auricular e da face interna das coxas e incoordenação, sem chegar, no entanto, a ter resposta sorológica positiva.

A resposta imunitária foi rápida, observando-se anticorpos humorais revelados pelas reações de

imunofluorescência indireta e hemaglutinação no decorrer da 1ª semana após a inoculação experimental, na proporção de 74,0% pela primeira prova e 21,0% pela segunda. A positividade total (100%) foi alcançada por ambas as provas no 10º dia após a inoculação. Este fato deve ser ressaltado, pois ambas as provas segundo os conceitos de Thorner e Remein (1961), citados por VECCHIO⁹⁵ (1966), podem ser consideradas de alta sensibilidade e especificidade, uma vez que todos os animais inoculados apresentaram reação e os não inoculados permaneceram negativos até o final da observação.

Existe alguma controvérsia em relação ao aparecimento dos anticorpos revelados pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. De maneira geral os autores concordam que a hemaglutinação é de positividade mais tardia em relação à primeira prova. Isto se justifica pela própria natureza do antígeno, pois a imunofluorescência indireta detecta anticorpos produzidos por antígenos da superfície do *Toxoplasma gondii*, enquanto que a hemaglutinação se refere a antígenos citoplasmáticos. Os resultados verificados no presente experimento concordam com estas afirmações, pois a prova de imunofluorescência indireta se mostrou ligeiramente mais precoce, havendo o aparecimento de anticorpos antes do 7º dia após a inoculação, enquanto que na hemaglutinação este fato se deu posteriormente, de acordo, portanto, com

as citações de KROGSTAD e cols.⁵⁹ (1972); APT e cols.⁴ (1973); JONES⁵⁵ (1973); LEVINE⁶¹ (1973); McKINNEY⁶⁸ (1973); SEAH⁸⁷ (1973); RIEMANN e cols.⁷⁵ (1974).

No que se refere ao período em que há o aparecimento dos títulos de anticorpos, os resultados desta pesquisa apresentam discordância em relação aos encontrados por KROGSTAD e cols.⁵⁹ (1972) e JONES⁵⁵ (1973). Segundo estes autores, os títulos revelados pela imunofluorescência indireta ascendem ao redor do 8º ou 10º dia pós-infecção e na hemaglutinação após o 14º dia.

O fato da maior precocidade em relação aos resultados desta pesquisa se deve provavelmente à forma infectante usada para a inoculação experimental, pois a utilização de taquizoítos, considerados forma livre, leva a uma disseminação mais rápida no organismo animal.

Quanto à curva dos títulos de anticorpos, analisando os resultados deste trabalho, verifica-se que a reação de imunofluorescência indireta atingiu o pico ao redor da 2ª e 3ª semanas pós-inoculação, sendo que a hemaglutinação alcançou inicialmente títulos médios nas 2ª e 3ª semanas e os títulos mais altos se verificaram entre a 5ª e 7ª semanas, discordando, pois, dos resultados de KROGSTAD e cols.⁵⁹ (1972); APT e cols.⁴ (1973); JONES⁵⁵ (1973); SEAH⁸⁷ (1973); que observaram títulos mais altos para ambas as provas ao redor das 3ª e 4ª semanas.

Relativamente à inoculação experimental,

os resultados desta pesquisa não são comparáveis na totalidade aos obtidos por MOLLER e cols.⁷¹ (1970); WORK e cols.¹⁰² (1970); DURFEE & CHIEN²⁸ (1971); ITO e cols.⁴⁹ (1974); MEUTER e cols.⁶⁹ (1978) e ROUDNA⁸⁰ (1981), que também realizaram inoculações experimentais, mas com objetivos diversos. Além disso, destaque-se que os autores citados utilizaram formas infectantes diferentes, ou seja, cistos e oocistos. No entanto, existem algumas observações esparsas que merecem ser discutidas. DURFEE & CHIEN²⁸ (1971) verificaram que no animal inoculado a prova de hemaglutinação tornou-se positiva no 15º dia, enquanto que em todos os animais deste experimento tornaram-se positivos 10 dias após a inoculação.

4.2 - ESTUDO DA CONCORDÂNCIA DE RESULTADOS ENTRE AS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) E HEMAGLUTINAÇÃO (HA); CÁLCULO DA CO-POSITIVIDADE E DA CO-NEGATIVIDADE DE HA EM RELAÇÃO A IFI.

A análise dos dados constantes da TABELA 8, permitiu avaliar inicialmente a concordância dos títulos de anticorpos medidos pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. Apesar da concordância ser da ordem de 39,2%, a discordância foi, na quase totalidade dos casos (50,6%), de apenas uma diluição. A prova de imunofluorescência indireta demonstrou um maior número de títulos elevados, daí a tendência à distri-

buição triangular, verificada nessa tabela, que favorece o lado representado por esta prova.

Os resultados apresentados na TABELA 9 mostraram existir uma concordância não ajustada para o acaso, entre os resultados obtidos com as duas provas, da ordem de 84,25%. Por outro lado a concordância medida pela estatística Kappa (COHEN²⁶, 1960), que leva em consideração acertos devidos puramente ao acaso, foi 69,24%. A prova de imunofluorescência indireta, porém, detectou maior porcentagem de reagentes do que a hemaglutinação. Este fato foi comprovado pelo teste binomial (BERQUÓ e cols.⁸, 1981), que apresentou resultado estatisticamente significativo, demonstrando ser a primeira prova mais sensível do que a segunda. Isto é facilmente compreensível pelo fato da prova de imunofluorescência indireta permitir observação de resultados positivos em menores diluições, inicia-se a prova com diluição 1:16, contra 1:64 na prova de hemaglutinação. A implicação de maior importância nesta diferença se refere ao valor da taxa de prevalência da doença que variará segundo a técnica empregada.

Os índices de co-positividade e co-negatividade da prova de hemaglutinação utilizando-se a imunofluorescência indireta como prova de referência, foram 72,78% (115/158) e 100% (115/115), respectivamente. Segundo BUCK e GART¹⁵ (1966), este tipo de cálculo é empregado.

do quando é impossível determinar a verdadeira prevalência de uma doença, então a validade de um determinado teste é julgada medindo-se sua associação com um outro bem estabelecido.

Da TABELA 9 depreende-se ainda que 158 (57,9%) dos 273 suínos abatidos em matadouro examinados foram reagentes à prova de imunofluorescência indireta, enquanto que 115 (42,1%) foram reagentes à prova de hemaglutinação. Este aspecto deve ser ressaltado, pois revela que em vários países do mundo, segundo WORK¹⁰¹ (1968); BERENGO e cols.⁷ (1969); Katsube e Oguihara, citados por NOBUTO & TSUTSUMI⁷³ (1974) e HELLESNESS e cols.⁴⁰ (1978), a maioria dos suínos destinados à alimentação humana, albergam o *Toxoplasma gondii*, havendo, portanto, o risco de infectar os consumidores.

4.3 - PREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE EM REBANHOS SUÍNOS SEGUNDO AS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E HEMAGLUTINAÇÃO.

Após o estudo da concordância entre as provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, estas foram empregadas para a avaliação da frequência de reagentes em rebanhos suínos.

Ao examinar-se as TABELAS 10 e 11, observou-se a mesma tendência já descrita anteriormente para a prova de imunofluorescência indireta que é a de apresen

tar maior número de reagentes e títulos mais altos, principalmente nas idades mais avançadas.

Com a apresentação das TABELAS 12, 13, 14 e 15, procurou-se estudar comparativamente as prevalências obtidas para ambas as provas nos diferentes grupos etários. Pela análise dos intervalos, para 95% de confiança, verifica-se que os mesmos estão bem próximos, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre as prevalências obtidas para os tipos de criação intensiva e semi-intensiva, nos diversos grupos etários estudados.

Os resultados do grupo etário de 4 a 6 meses, TABELA 14, permitem uma análise comparativa com aqueles autores que trabalharam com animais de matadouro, pois é nessa idade aproximada de 180 dias que os suínos são enviados para o abate, quando atingem um peso de carcaça considerado economicamente compensatório. Por estes resultados, verifica-se que as prevalências para os animais com idade de 4 a 6 meses da criação intensiva foram da ordem de 35,8% para a prova de imunofluorescência indireta e 31,6% para a de hemaglutinação, enquanto que o rebanho semi-intensivo apresentou 42,6% e 40,4% para as provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação respectivamente.

Os resultados do presente trabalho são comparáveis aos de FOLKERS & PERIE³¹ (1963); ROCH & VARELA⁷⁷ (1966); ROEVER-BONNET⁷⁸, (1967); GARRIDO e cols.³⁷ (1972);

ISHII e cols.⁴³ (1972); SCHENK e cols.⁸⁵ (1976); KRAFT e cols.⁵⁸ (1976); HANSEN e cols.³⁹ (1977); ISHIZUKA e cols.⁴⁵ (1978); CHHABRA & MAHAJAN²⁴ (1979), que obtiveram porcentuais variando de 29,9% a 43,4%. Discordaram por serem inferiores aos de BOCH e cols.¹³ (1964); ZARDI e cols.¹⁰³ (1967); CARROZ²¹ (1977); MARTINI & MARTIN⁶⁴ (1977) e por serem superiores aos de MATSUI e cols.⁶⁵ (1967); CALLOT e cols.¹⁶ (1970); GILL & PRAKASH³⁸ (1971); VANDERWAGEN e cols.⁹³ (1974); AMARAL e cols.² (1975); MANOEL & TOBONG-BANUA⁶³ (1977); AMARAL e cols.³ (1978) e HELLESNESS e cols.⁴⁰ (1978).

Cabe ressaltar a comparação dos presentes resultados com aqueles obtidos por outros pesquisadores que, trabalhando em São Paulo, obtiveram dados diferentes; assim, AMARAL e cols.² (1975) e AMARAL e cols.³ (1978) utilizando a prova de hemaglutinação em soros de suínos abatidos aqui, mas provenientes de diversos estados da federação, encontraram 22,8% e 18,9% de positivos, considerando como tal apenas os soros que apresentassem títulos iguais ou superiores a 1:256. Todavia, se considerassem positivos animais com título igual ou superior a 1:64, as prevalências seriam respectivamente 50,5% e 49,6% para os dois trabalhos, portanto taxas ainda superiores às desta pesquisa. Estas diferenças revelam que há a necessidade do estabelecimento de um critério para determinar-se a partir de que diluição um soro deve ser

considerado positivo, sob pena de também, por este motivo, variarem os valores da prevalência da toxoplasmose.

Os resultados apresentados na TABELA 16 , referente ao exame de 163 soros de suínos criados em sistema de criação intensiva e dos 185 mantidos em sistema semi-intensivo, revelam que os valores populacionais de suínos reagentes pela prova de imunofluorescência indireta são respectivamente da ordem de 54,0 e 49,2%, enquanto que pela prova de hemaglutinação os valores encontrados são de 46,6% e 42,7%. Esses resultados revelaram que a diversidade de manejo não propiciou diferenças estatisticamente significantes na porcentagem de reagentes, discordando das afirmações de GARRIDO e cols.³⁷ (1972) que salientaram ser os animais de criações intensivas aqueles mais sujeitos a se infectarem, sem apresentarem, contudo, resultados concretos comprovando as citadas afirmações.

A criação em sistema intensivo, considerada na presente pesquisa, caracterizava-se pela alimentação dos suínos com resíduos de restaurante, enquanto que a semi-intensiva, oferecia a seus animais ração balanceada e pastagem. Não se observaram diferenças estatisticamente significantes na porcentagem de reagentes, talvez em função da prática de fervura prévia dos resíduos alimentares, que eram consumidos no dia de sua preparação , além do fato das condições sanitárias de ambas as cria-

ções serem equivalentes.

Na bibliografia compulsada principalmente aquela relacionada a levantamentos sorológicos em rebanhos suínos, verifica-se que apenas com raras exceções os autores consideraram a variável idade e em nenhum deles houve menção ao tipo de criação.

WENDE & DIENZ⁹⁹ (1961), nos Estados Unidos, examinando um rebanho de 350 animais, utilizando a prova de Sabin-Feldman, obtiveram 52,1% de positivos, considerando o título inicial a partir da diluição de 1:64, e 68,8% a partir da diluição de 1:16, portanto superiores as encontradas neste trabalho.

Mc CULLOCH e cols.⁶⁶ (1964) em Iowa, nos Estados Unidos, durante um estudo epidemiológico sobre leptospirose, encontraram em 7 animais testados (Rebanho I), 6 positivos (85;7%), pela prova de Sabin-Feldman, e a anamnese revelou que estes animais tiveram um quadro de pneumonia seis semanas antes. Em outra propriedade, esses autores, encontraram dois positivos (8,7%), examinando 23 suínos (rebanho II). SINGH e cols.⁸⁸ (1967) utilizando a prova de hemaglutinação verificaram 27,7% e 12,5% de positivos em Singapura e na Malásia respectivamente. Nos Estados Unidos, em North Dakota, Mc ILWAIN⁶⁷ (1969), realizando a prova de hemaglutinação em 97 soros de suínos provenientes de diferentes propriedades, encontrou 57,7% de positivos. TIZARD e cols.⁹¹ (1978) no Canadá,

constatarem 45,0% de positivos pela prova de Sabin-Feldman, entre os 671 suínos examinados de diferentes rebanhos.

No Brasil, SANTOS e cols.⁸³ (1978), utilizando a prova de hemaglutinação em 960 soros de suínos provenientes de 32 municípios do Estado de São Paulo, detectaram 237 animais com títulos iguais ou maiores a 1:256 (24,7%) e 466 animais com títulos iguais ou superiores a 1:64 (48,5%). VASCONCELOS e cols.⁹⁴ (1979) examinaram 409 soros de suínos (aproximadamente 10% do rebanho do município) pertencentes a 12 propriedades rurais de Jaboticabal - São Paulo, pela prova de imunofluorescência indireta, encontrando 46,9% de reagentes. Esses autores verificaram também que a frequência de toxoplasmose suína independe da raça e do sexo.

Os resultados da presente pesquisa discordaram por serem maiores do que os encontrados por Mc CULLOCH e cols.⁶⁶ (1964), rebanho II, 8,7% e SINGH e cols.⁸⁸ (1967), 25,7%. Também não concordaram com os resultados apresentados por Mc CULLOCH e cols.⁶⁶ (1964), rebanho I, 85,7%, por serem inferiores. Houve concordância com os trabalhos de Mc ILWAIN⁶⁷ (1969), 57,7% e TIZARD e cols.⁹¹ (1978), 45,0%, pois seus resultados foram próximos aos encontrados nesta pesquisa.

No que se refere ao Brasil, verifica-se que os resultados deste trabalho são superiores aos en-

contrados por SANTOS e cols.⁸³ (1978), quando consideraram como positivos títulos iguais ou superiores a 1:256 (24,7%), e comparáveis, quando consideraram títulos iguais ou superiores a 1:64 (48,5%). Concordam também com a taxa de prevalência em rebanhos suínos encontrada por VASCONCELOS e cols.⁹⁴ (1979), que foi da ordem de 46,9%.

Os diversos grupos etários de estratificação dos rebanhos, permitiram avaliar a possibilidade de variação da percentagem de reagentes, verificando-se no GRÁFICO 4 uma elevação dessa taxa com o progredir da idade. Houve uma ligeira queda, quando compararam-se os grupos etários de até 2, e de 2 a 4 meses de idade. Este fato se deve provavelmente à imunidade passivamente recebida pelo leitão ao mamar o colostro nas primeiras horas de vida, imunidade essa que tende a desaparecer com o desenvolvimento etário, para posteriormente haver um incremento do número de reagentes devido à imunidade adquirida às custas de infecção natural. Deve-se salientar que isto se deu nas provas de imunofluorescência indireta e de hemaglutinação, realizadas em ambos os sistemas de criação estudados.

Os resultados do presente trabalho revelaram um aumento na porcentagem de reagentes com o progredir da idade, no que concordam com os achados de BOCH & ROMMEL¹² (1963); NOBUTO e cols.⁷⁴ (1969); CAMPANA-ROUGET e cols.¹⁹ (1974) e à semelhança do que ocorre na espécie

humana (WALTON e cols.⁹⁷, 1966; ROEVER-BONNET e cols.⁷⁹, 1969; FRENKEL³², 1971; RIEMANN e cols.⁷⁵, 1974). Este fato provavelmente se deve às sucessivas infecções adquiridas ao longo da vida, evidenciado nas TABELAS 10 e 11, onde observamos que os níveis de anticorpos também aumentam com o desenvolvimento etário, revelando que os suínos estão permanentemente expostos à infecção toxoplásmica.

Estas observações contrariam os resultados obtidos por VASCONCELOS e cols.⁹⁴ (1979) que não verificaram variações entre os grupos representativos de algumas fases da criação de suínos, como reprodutores, matrizes, recria e acabamento, havendo respectivamente 52,2%; 45,8%; 48,8% e 45,4% de reagentes. Torna-se difícil, no entanto, uma comparação mais precisa com os resultados desta pesquisa; pois os autores mencionam apenas que os reprodutores e matrizes tinham acima de 2 anos de idade, enquanto que os suínos de recria e acabamento tinham menos de 12 meses.

5. CONCLUSOES

Os resultados obtidos através da metodologia empregada permitem chegar às seguintes conclusões:

- 5.1 - A prova de imunofluorescência indireta mostrou-se mais precoce em relação aos animais reagentes na fase inicial da infecção, porque nesta prova puderam ser observados anticorpos em 74,0% dos suínos após o 7º dia da inoculação, enquanto que na prova de hemaglutinação detectaram-se, no mesmo período, anticorpos em 21,0% desses animais.
- 5.2 - Adotando-se o 10º dia pós-inoculação como critério para cálculo da sensibilidade e especificidade das provas de imunofluorescência indireta e de hemaglutinação, verifica-se que ambas valem 100%.
- 5.3 - Os anticorpos revelados pelas provas de imunofluorescência indireta e de hemaglutinação persistiram durante todo o período de observação (84 dias) com a primeira prova revelando sempre títulos mais altos.
- 5.4 - As provas de imunofluorescência indireta e de hema

glutinação apresentaram uma concordância da ordem de 84,25%; pela estatística Kappa, que leva em consideração os possíveis acertos devidos ao acaso, a concordância foi de 69,24%.

5.5 - Os índices de co-positividade e de co-negatividade da hemaglutinação em relação à imunofluorescência indireta foram, respectivamente, 72,78% e 100%.

5.6 - A prevalência da infecção nos rebanhos suínos, segundo a prova de imunofluorescência indireta, foi igual a 54,0% para o sistema de criação intensiva e de 49,2% para a criação semi-intensiva, enquanto que pela prova de hemaglutinação foi da ordem de 46,6% e 42,7%, respectivamente. As diferenças entre os sistemas de criação não foram estatisticamente significantes.

5.7 - A taxa de infecção toxoplásmica, segundo as diferentes idades do rebanho, sofreu uma queda nos seus valores quando comparou-se o grupo de até 2 meses de idade com o de 2 a 4 meses, para a partir deste haver um incremento com o progredir da idade.

5.8 - As prevalências de toxoplasmose segundo as diferentes idades, o tipo de criação do rebanho (intensi-

va ou semi-intensiva) e as provas de imunofluorescência indireta (IFI) e de hemaglutinação (HA) foram as seguintes, em porcentagens:

Grupo etário (meses)	Tipo de criação	Intensiva		Semi-intensiva	
	Prova	IFI	HA	IFI	HA
0 + 2		50,0	46,9	46,9	37,5
2 + 4		34,3	28,6	32,6	27,9
4 + 6		36,8	31,6	42,6	40,4
≥ 6		79,3	67,2	66,7	57,1

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, V. & MACRUZ, R. *Toxoplasma gondii*: isolamento de amostras a partir de diafragma de suínos clinicamente sadios abatidos em matadouros de São Paulo - Brasil. *Arq.Inst.Biol.*, São Paulo, 36: 47-54, 1969.
2. AMARAL, V. et al. Estudos preliminares sobre a prevalência de anticorpos (antitoxoplasma), por hemaglutinação em soros de suínos provenientes dos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, Brasil. *Biológico*, 41:105-7, 1975.
3. AMARAL, V. et al. Considerações sobre a prevalência de anticorpos antitoxoplasma em soros de suínos provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina, Ceará e Piauí - Brasil. *Biológico*, 44:117-20, 1978.
4. APT, W. et al. *Toxoplasmosis*. Santiago, Universidad de Chile, 1973.
5. ARAUJO, F.G. *Contribuição para o estudo da toxoplasmose em Portugal*. Lisboa, 1964. (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa).

6. BEHYMER, R.D. et al. Serologic diagnosis of toxoplasmosis and prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in selected feline, canine and human population. *J.Amer.vet.med.Ass.*, 162:959-63, 1973.
7. BERENGO, A. et al. Prevalence of toxoplasmosis among domestic and wild animals in the area of Siena, Italy. A serologic and parasitologic study. *Amer.J.trop.Med.Hyg.*, 18:391-4, 1969.
8. BERQUÕ, E.S. et al. *Bioestatística*. São Paulo, Ed. Pedagógica e Universitária, 1981.
9. BEUTNER, E.H. et al. A new fluorescent antibody method: mixed antiglobulin immunofluorescence - staining. *Nature*, 208:353-5, 1965.
10. BEVERLEY, J.K.A. & BEATTIE, C.P. Human toxoplasma infection. *J.Hyg.*, London, 52:37-46, 1954.
11. BOCH, J. von. *Toxoplasma* - Infektionen bei Haustieren und ihre Lebensmittelhygienische Bedeutung. *Fleischwirtschaft*, 47:969-73, 1967.
12. BOCH, J. von & ROMMEL, M. Serologische Untersuchungen an Berliner Hunden auf Toxoplasmose. *Berl.Munch.tierärztl.Wschr.*, 73:292-6, 1963.
13. BOCH, J. von et al. Beiträge zur Toxoplasmose des Schweines. II. Untersuchungen, von Schlachtsch

- weinen auf *Toxoplasma*-Infektionen.
Berl.Munch.tierdrztl.Wschr., 77:244-7, 1964.
4. BRAVENY, von I. et al. Zur Bedeutung von Rohfleisch und Katzen als Infektionsquellen der Toxoplasmose.
Bundesgesundheitsblatt, 20:259-60, 1977.
5. BUCK, A.A. & GART, J.J. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies
 I - Indices of agreement and their relation to prevalence. *Amer.J.Epidem.*, 83:586-92, 1966.
6. CALLOT, J. et al. Étude sérologique de l'incidence de la toxoplasmose chez les animaux de boucherie de Strasbourg. *Rev.tech.vet.Abbat.*, 69:30, 1970.
7. CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo*, 6:117-8, 1964.
8. CAMARGO, M.E. *Introdução às técnicas de Imunofluorescência*. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, 1967. (Apostila).
9. CAMPANA-ROUGET, Y. et al. La toxoplasmose chez les herbivores en Côte-D'Or. *Rev.Méd.Vét.*, 125:99-104, 1974.

20. CARLE, B.N. & DEWHIRST, W.H. A method for bleeding swine. *J.Amer.vet.med.Ass.*, 101:495-6, 1942.
21. CARROZ, J.R. Toxoplasmose et abattoir. *Schweiz.Arch. Tierheilk.*, 119:425-31, 1977.
22. CASTILHO, E.A. An estimation of the incidence of congenital toxoplasmosis in São Paulo city, Brasil. *Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo*, 18:202-5, 1976.
23. CĂTĂR, G. et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from swine and cattle. *J.Parasit.*, 55:952-5, 1969.
24. CHHABRA, M.B. & MAHAJAN, R.C. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in slaughter pigs India. *Trop.geogr.Med.*, 31:123-6, 1979.
25. COCHRAN, W.G. *Sampling techniques*. 3 ed. New York, John Wiley & Sons, 1977.
26. COHEN, J.A. A coeficient of agreement for nominal scales. *Educ.psychol.Measur.*, 20:37-46, 1960.
27. DESMONTS, G. Epidemiologie de la toxoplasmose. *Rev.Hyg.Méd.soc.*, 10:201-17, 1962.
28. DURFEE, P.T. & CHIEN, J. Transmission of *Toxoplasma gondii* to cats via ingestion of infected pork. *J.Amer.vet.med.Ass.*, 159:1783-8, 1971.

29. DURFEE, P.T. et al. The relationship between hemagglutinating antibody titers and infection with *Toxoplasma gondii* in swine. *S.Asian J.trop.Med. publ.Hlth*, 5:4-8, 1974.
30. FELDMAN, H. Toxoplasmosis. *New Engl.J.Med.*, 279: 1431-7, 1968.
31. FOLKERS, C. & PERIÉ, N.M. The prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in slaughter-pig in the Netherlands. *Trop.geogr.Med.*, 15:268-70, 1963.
32. FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis. Mechanisms of infection, laboratory diagnosis and management. *Curr.Top.Path.*, 54:29-75, 1971.
33. FRENKEL, J.K. *Toxoplasma* in and around us. *Bioscience*, 23:343-52, 1973.
34. FRENKEL, J.K. Advances in the biology of sporozoa. *Z.Parasitenk.*, 45:125-62, 1974.
35. FRENKEL, J.K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p. 683-700.
36. GALOUZO, I.G. La toxoplasmose des animaux. *Bull.Off. int.Epizoot.*, 70:719-28, 1968.

37. GARRIDO, J. et al. Estudios sobre la epidemiologia de la toxoplasmosis. La infection entre los animales de consumo. Encuestas sorologicas en Madrid mediante la reaccion de inmunofluorescencia. *Med.trop.*, Madrid, 48:11-23, 1972.
38. GILL, H.S. & PRAKASH, O.M. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in slaughter-pigs in India. *Vet.Rec.*, 89:130, 1971.
39. HANSEN, H.J. et al. On porcine toxoplasmosis in Sweden. *Nord.Vet.Med.*, 29:381-5, 1977.
40. HELLESNES, I. et al. *Toxoplasma gondii* in swine in south-eastern Norway. *Acta vet.scand.*, 19:574-87, 1978.
41. HOARE, C.A. The developmental stages of *Toxoplasma*. *J.trop.Med.Hyg.*, 75:56-8, 1972.
42. ISHII, T. et al. Studies on *Toxoplasma*. VI A survey of pork meat for the presence of *Toxoplasma*. *Jap.J.Parasit.*, 11:184-91, 1962.
43. ISHII, T. et al. Indirect hemagglutination test for *Toxoplasma* infection in pigs and men on Amani Oshima Island, Southern Japan. *Jap.J.exp.Med.*, 42:81-3, 1972.

44. ISHIZUKA, M.M. Estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e de Imunofluorescência indireta para a determinação de anticorpos anti- Toxoplasma em soros de suínos. *Rev.Fac.Med.vet. Zootec.Univ.S.Paulo*, 15:45-50, 1978.
45. ISHIZUKA, M.M. Avaliação da freqüência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta, em suínos de matadouro no Município de São Paulo. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo*, 15:151-4, 1978.
46. ISHIZUKA, M.M. Avaliação da freqüência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta (anti-IGg) em magarefes. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo*, 15:155-8, 1978.
47. ISHIZUKA, M.M. et al. Estudo comparativo das provas de Sabin-Feldman (SF) e imunofluorescência indireta (IFI) para a avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros de cães. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.São Paulo*, 11:127-32, 1974.
48. ISHIZUKA, M.M. et al. Estudo comparativo das provas de Sabin-Feldman (SF) e imunofluorescência indireta (IFI) para a avaliação de anti-corpos anti-toxoplasma em soros de cães. *Rev.Fac.Med.vet. Zootec.Univ.S.Paulo*, 11:133-8, 1974.

49. ITO, S. et al. Pathogenicity for piglets of *Toxoplasma* oocysts originated from naturally infected cat. *Nat.Inst.anim.Hlth Quart.*, 14:182-7, 1974.
50. JACOBS, L. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Advanc. Parasit.*, 5:1-45, 1967.
51. JACOBS, L. New knowledge of *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Advanc.Parasit.*, 11:631-59, 1973.
52. JACOBS, L. & LUNDE, M.M. A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J.Parasit.*, 43:308-14, 1957.
53. JACOBS, L. et al. A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J.Parasitol.*, 46:23-8, 1960.
54. JAMRA, L.F. et al. On the isolation of *Toxoplasma gondii* from human food of animal origin. Partial results in the city of São Paulo (Brazil). *Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo*, 11:169-76, 1969.
55. JONES, S.R. Toxoplasmosis: a review. *J.Amer.vet.med.Ass.*, 163:1038-42, 1973.
56. KATSUBE, Y. et al. Studies on Toxoplasmosis - I. Isolation of *Toxoplasma* from muscles of humans, dogs and cats. *Jap.J.med.Sci.Biol.*, 20:413-9, 1967.

57. KELEN, A.E. et al. Indirect fluorescent antibody method in sero diagnosis of toxoplasmosis. *Canad.J.Microbiol.*, 8:545-54, 1962.
58. KRAFT, B. et al. Vergleichende Untersuchungen zur Diagnostik der Toxoplasma - Infection bei Schlachtschweinen. *Arch.Lebensmitt.Hyg.*, 27:172-6, 1976.
59. KROGSTAD, D.J. et al. Toxoplasmosis, with comments on risk of infection from cats. *Ann.intern.Med.*, 77:773-8, 1972.
60. LARSSON, C.E. *Aspectos epidemiológicos da toxoplasmose*. São Paulo, 1976. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP).
61. LEVINE, N.D. *Toxoplasma gondii*. In: LEVINE, N.D. *Protozoan parasites of domestic animals and of man*. Minneapolis, Burgess, 1973. p. 294-316.
62. LEVINE, N.D. et al. A newly revised classification of the Protozoa. *J.Protozool.*, 27:37-58, 1980.
63. MANUEL, M.F. & TUBONGBANUA, R. A serological survey on the incidence of toxoplasmosis among slaughtered pigs in Metro Manila. *Philippine J.vet.Med.*, 16:9-19, 1977.

64. MARTINI, G.J.W. & MARTIN, A.M. Prueba de hemoaglutinación para toxoplasmosis en distintos sueros animales. *Rev.Med.vet.*, Buenos Aires, 58:437-9, 1977.
65. MATSUI, T. et al. Serologic survey of toxoplasmosis in pigs at 230 slaughterhouses in Japan. *Bull.Inst.publ.Hlth*, Tokyo, 16:112-9, 1967.
66. McCULLOCH, W.F. et al. Serologic survey of toxoplasmosis in Iowa domestic animals. *J.Amer.vet.med.Ass.*, 144:272-5, 1964.
67. McILWAIN, P.K. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic animals in North Dakota. *Arch.environm.Hlth*, 19:885-6, 1969.
68. McKINNEY, H.R. A study of *Toxoplasma* infections in cats as detected by the indirect fluorescent antibody method. *Vet.Med.small Anim.Clin.*, 68:493-5, 1973.
69. MEUTER, F. et al. Influence de la virulence des souches toxoplasmiques pour la souris sur leur capacité de former des kistes chez le porc. *Ann.Soc.belge Méd.trop.*, 58:95-102, 1978.

70. MIGUEL, O. Técnicas de amostragem para exames laboratoriais. *Hig.alim.*, 1:84-6, 1982.
71. MOLLER, T. et al. Experimental toxoplasmosis in pregnant sows. II. Pathological findings. *Acta path.microbiol.scand.Kobenhavn*, 78:241-55, 1970.
72. NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C.R.Acad.Sci.*, Paris, 147:763-6, 1908.
73. NOBUTO, K. & TSUTSUMI, Y. *Saikin ni okeru Toxoplasma shuso no tistikito shindan.* /Recentes conhecimentos sobre o diagnóstico da toxoplasmose no homem e nos animais/. Tokyo, Tyuwa insatsu, 1974. (Apostila).
74. NOBUTO, K. et al. Some aspects of natural infection of toxoplasmosis in pigs. *Nat.Inst.anim.Hlth. Quart.*, 9:136-48, 1969.
75. RIEMANN, H.P. et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* among students and other personnel in veterinary colleges in California and Brazil. *Amer.J.Epidem.*, 100:197-208, 1974.
76. ROBINSON, R.A. The potential role of cats in the epidemiology of *Toxoplasma gondii* infections. *N.Z.med.J.*, 77:97-101, 1973.

77. ROCH, E. & VARELLA, G. Diversos aspectos de la investigación sobre toxoplasmosis en Mexico. Resultados obtenidos en 29.883 reacciones de Sabin y Feldman efectuadas de 1953 a 1965. *Rev. Invest. Salud publ.*, México, 26:31-49, 1966.
78. ROEVER-BONNET, H. Toxoplasmosis in Surinam (Neherlands Guyana). A serological survey. *Trop. geogr. Med.*, 19:221-8, 1967.
79. ROEVER-BONNET, H. et al. Toxoplasmosis in Latin-American countries. *Trop. geogr. Med.*, 21:451-5, 1969.
80. ROUDNĀ, V. Experimentální nakaza cystogenni formou *Toxoplasma gondii* u telat a selat. *Statního Veterinárního Ustavu*, 11:47-55, 1981.
81. RUIZ, A. Isolation of *Toxoplasma gondii* from swine in Costa Rica. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 60:429-31, 1966.
82. SABIN, A.B. & FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108: 660, 1948.
83. SANTOS, S.M. et al. Prevalência de anticorpos antitoxoplasma, por hemaglutinação indireta em

- soros de suínos provenientes de diferentes Muni
cípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Biológico*,
44:149-53, 1978.
84. SATO, U. et al. Haemagglutination test for porcine
toxoplasmosis with T.S.C. antigen. *J.Jap.vet.med.*
Ass., 15:273-8, 1962.
85. SCHENK, M.A.M. et al. Frequência da toxoplasmose
em suínos abatidos em Belo Horizonte, Minas Gerais.
Arq.Esc.Vet.Univ.Fed.M.Gerais, 28:261-6, 1976.
86. SCHENK, M.A.M. et al. Isolamento de *Toxoplasma*
gondii em suínos do Estado de Minas Gerais.
Arq.Esc.Vet.Univ.Fed.M.Gerais, 29:25-30, 1977.
87. SEAH, S.K.K. Toxoplasmosis: a review of newer
knowledge. *Canad.J.publ.Hlth*, 64 (suppl):93-102,
1973.
88. SINGH, M. et al. A survey on the prevalence of
toxoplasmic antibodies in animal sera. *Med.J.*
Malaya, 22:115-7, 1967.
89. SOLTYS, M.A. & WOO, P.T.K. Immunological methods in
diagnosis of protozoan diseases in man and
domestic animals. *Z.Tropenmed.Parasit.*, 23:172-
87, 1972.

90. SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita del coniglio. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kalazar dell'uomo. *Rev.Soc.cient.S.Paulo*, 3:109-12, 1908.
91. TIZARD, I.R. et al. The prevalence of serum antibodies to *Toxoplasma gondii* in Ontario mammals. *Canad.J.comp.Med.*, 42:177-83, 1978.
92. TUNER, G.V.S. Some aspects of the pathogenesis and comparative pathology of toxoplasmosis. *J.S.Afr.vet.Ass.*, 49:3-8, 1978.
93. VANDERWAGEN, L.C. et al. A survey for *Toxoplasma* antibodies in Northern California livestock and dogs. *J.Amer.vet.med.Ass.*, 164:1034-7, 1974.
94. VASCONCELOS, O.T. et al. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos. *Científica*, Jaboticabal, 7 (nº esp.):83-7, 1979.
95. VECHIO, T.J. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. *New.Engl.J.Med.*, 274:1171-3, 1966.
96. WALLS, K.W. & SCHULTZ, M.G. Public Health aspects of Toxoplasmosis. *J.Amer.vet.med.Ass.*, 153:1775-9, 1968.

97. WALTON, B.C. et al. Relationship of *Toxoplasma* antibodies to altitude. *Amer.J.trop.Med.Hyg.*, 15: 492-5, 1966.
98. WATSON, W.A. Toxoplasmosis in human and veterinary medicine. *Vet.Rec.*, 91:254-82, 1972.
99. WENDE, M.M. & DIENS, R.B. Endemic toxoplasmosis in isolated swine and cattle herds and its relationship to a human population. *Proc.Soc.exp.Biol.*, 106: 400-1, 1961.
100. WORK, K. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the flesh of sheep, swine and cattle. *Acta path. microbiol.scand.*, 71:296-306, 1967.
101. WORK, K. Resistance of *Toxoplasma gondii* encysted in pork. *Acta path.microbiol.scand.*, 73:85-92, 1968.
102. WORK, K. et al. Experimental toxoplasmosis in pregnant sows. I. Clinical, parasitological and serological observations. *Acta.path.microbiol.scand.*, 78:129-39, 1970.
103. ZARDI, O. et al. Correlazione tra infezione da *Toxoplasma gondii* animale ed umana. *Nuovi Ann. Ig.*, 18:186-94, 1967.