**FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DA
TOXOPLAMOSE EM SUÍNOS ABATIDOS EM
MATADOUROS DO BRASIL E DO PERU
ATRAVÉS DE PROVAS SOROLÓGICAS E
HISTOPATOLOGIA**

FIDEL FRANCISCO SUÁREZ ARANDA

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Prática de Saúde
Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São
Paulo para obtenção do Grau de
Doutor.

Área de concentração:
Serviços de Saúde Pública

**ORIENTADOR: PROF. DR.
OMAR MIGUEL**

São Paulo

1999

À memória de meus queridos pais
embora já não estejam conosco,
que me guiaram no caminho certo;
meu amor e gratidão.

À memória de meus queridos avôs,
exemplos de amor, honestidade e trabalho.

A minha esposa Nancy, companheira e parceira e a
minhas filhas Nancy e Patricia, motivos de meu orgulho
e minha força, pelo amor e carinho que me dispensaram
e pelas dificuldades consentidas com minha ausência.

A meus irmãos, que representam muito para mim

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Omar Miguel meu orientador, pelo apoio e confiança em mim depositada, pelo conhecimento apurado e principalmente pela amizade.

À W.K. Kellogg Foundation pela bolsa de estudos.

Ao Prof Dr. Heitor Franco de Andrade Jr., pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Aos membros da banca, Prof^a. Dra. Sandra Maria Otatti de Oliveira Nitrini; Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos; Prof. Dr. Fumio Honma Ito e Prof. Dr. José Luiz Guerra, pelas competentes sugestões e aportes importantes a este trabalho.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Saúde Pública da USP.

A meus amigos José e Alina, pela inestimável ajuda e demonstração de amizade.

Ao pessoal do laboratório de protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, pela sua disposição e colaboração.

Às bibliotecárias da Faculdade de Saúde Pública da USP, pela revisão das referências bibliográficas.

RESUMO

Suárez FA. **Frequência de ocorrência da toxoplasmose em suínos abatidos em matadouros do Brasil e do Peru através de provas sorológicas e histopatologia.** São Paulo; 1999. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Objetivo. Realizou-se um trabalho para estudar comparativamente técnicas laboratoriais aplicadas ao diagnóstico da toxoplasmose em suínos abatidos em matadouros de Carapicuíba-Brasil e Lima-Peru, e para padronizar a reação de avidéz dos anticorpos IgG anti-**Toxoplasma gondii**. **Material e métodos.** Foram examinadas 30 amostras de cérebros, olhos e músculos para exame histopatológico e 300 soros de suínos de um matadouro do Brasil e 93 de um matadouro do Peru para diagnóstico sorológico e se infectou experimentalmente um suíno para estudar a evolução dos anticorpos IgG anti-toxoplasma. **Resultados.** A análise revelou que o exame histopatológico não detectou nenhum material infectado com toxoplasma. A frequência de suínos brasileiros reagentes à toxoplasmose mediante os testes de ELISA e hemaglutinação indireta foram 9,57% e 16,83% respectivamente; entretanto, os suínos peruanos reagiram positivamente aos testes em 33,33% e 52,69% respectivamente; não se observou associação entre a toxoplasmose e o sexo ($P > 0,05$). Como as avaliações sorológicas foram feitas com dois testes diferentes, calculou-se a concordância entre eles, obtendo-se no caso dos suínos brasileiros um coeficiente Kappa de 25,97 ($P < 0,05$) e dos peruanos um coeficiente Kappa de 35,62 ($P < 0,01$), mostrando concordância moderada em ambos os casos. Para se observar o comportamento da avidéz dos anticorpos IgG infectou-se experimentalmente um suíno com taquizoítos de **Toxoplasma gondii**, obtendo-se amostras periódicas de sangue, os quais mostraram um aumento progressivo de avidéz com o decorrer do tempo pós infecção, sendo mais notório depois dos 80 dias, mostrando uma resposta de tipo secundária. Igualmente mediuse a avidéz dos soros procedentes dos matadouros, observando-se índices de avidéz médios de 26,71% e 74,83% para os suínos procedentes do Brasil e do Peru respectivamente, com alta significância para a diferença ($P < 0,01$), indicando infecção mais antiga para os suínos peruanos. **Conclusões.** Concluiu-se que a histopatologia não é capaz de evidenciar **Toxoplasma gondii** em suínos; os testes de ELISA e hemaglutinação indireta apresentam moderada concordância aplicadas em suínos naturalmente infectados. Os índices de avidéz dos anticorpos anti-toxoplasma aumentam com o decorrer do tempo pós-infecção; e os suínos peruanos mostraram índice de avidéz médio superior aos brasileiros.

Descritores: Toxoplasmose, suína, sorologia, ELISA, hemaglutinação, avidéz, matadouros.

SUMMARY

Suarez FA. **Frequencies of swine toxoplasmosis in Brazilian and Peruvian slaughterhouses, measured through serological and histopathological tests.** São Paulo; 1999. [Doctoral thesis – Faculty of Public Health-USP]

Objective. Comparative studies were carried out to analyze laboratory techniques applied to the diagnosis of toxoplasmosis in swine abated in slaughterhouse in Carapicuíba – Brazil and Lima – Peru. In addition, the reaction of the avidity of anti-**Toxoplasma gondii** IgG antibodies was standardized. **Material and Methods.** A histopathological examination was made on 30 samples of brains, eyes and muscles. Furthermore 300 swine sera from a slaughterhouse in Brazil and other 93 from a slaughterhouse in Peru were collected for serological evaluation, and one swine was infected experimentally to study the evolution of the anti-toxoplasma IgG antibodies. **Results.** The analysis showed that the histopathological examination did not detect any material infected with toxoplasma. The frequencies of Brazilian swine that reacted to toxoplasmosis using the indirect hemagglutination and ELISA tests were 16.83% and 9.57% respectively. However, the Peruvian swine reacted positively to the above mentioned tests giving positive rates of 52.69% and 33.33% respectively; no relationship between toxoplasmosis and the sex ($P > 0.05$) was observed. Since the serological evaluation was carried out using two different tests, the agreement between them was calculated obtaining a Kappa coefficient of 25.97 ($P < 0.05$) for Brazilian swine, and a Kappa coefficient of 35.62 ($P < 0.01$) for the Peruvian ones, showing moderate agreement in both cases. In order to observe the behavior of the avidity of the IgG antibodies, one swine was infected experimentally with tachyzoites of **Toxoplasma gondii**. Blood samples collected periodically showed a progressive rise in the post-infection avidity in course of time. This avidity was most notorious after 80 days and it provoked a secondary type of response. In the same way, the avidity of sera from Brazilian and Peruvian slaughterhouses were analyzed, and moderate avidity percentages were observed 26.71% for Brazil and 74.83% for Peru. The difference ($P < 0.01$) was of great significance, indicating an age-old infection for Peruvian swine. **Conclusions.** The results show that histopathologic evaluation is not capable of making **Toxoplasma gondii** evident in swine. The indirect hemagglutination and ELISA tests present moderate agreement in swine infected naturally. The rates of post-infection avidity of the anti-toxoplasma antibodies increased in course of time. The average avidity of Peruvian swine is superior to the Brazilian one.

Key words: Toxoplasmosis, swine, serology, ELISA, hemagglutination, avidity, slaughterhouses.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Toxoplasmose	01
1.1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	02
1.1.2. Epidemiologia	04
1.1.3. Toxoplasmose humana	05
1.1.4. Suinocultura	08
1.1.5. Toxoplasmose suína	09
1.2. Diagnóstico	10
1.2.1. Diagnóstico histopatológico	10
1.2.2. Diagnóstico sorológico	11
1.3. Teste de avidéz	14
1.3.1. Determinação da avidéz de anticorpos	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Material	22
3.1.1. Reagentes	22
3.1.2. Animais	22
3.2. Métodos	24
3.2.1. Tamanho da amostra	24
3.2.2. Exame histopatológico	25
3.2.3. Obtenção de sangue	26
3.2.4. Obtenção do soro positivo e negativo	26
3.2.5. Antígenos para o teste de ELISA	27
3.2.6. Testes sorológicos	28
3.2.7. Análise estatística	30

4. RESULTADOS	32
4.1. Exame histopatológico	32
4.2. Sorologia	32
4.3. Resposta imunitária do suíno infectado com Toxoplasma gondii	44
4.4. Avidéz dos anticorpos nos suínos naturalmente infectados	45
5. DISCUSSÃO	50
5.1. Histopatologia	50
5.2. Sorologia	52
5.2.1. Teste de ELISA e de hemaglutinação indireta	52
5.2.2. Teste de avidéz	59
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	A1
ANEXO 1	A1
ANEXO 2	A2

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição dos suínos analisados procedentes de matadouros do Brasil e do Peru, 1997.	33
TABELA 2	Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Brasil, segundo resultado dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.	34
TABELA 3	Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Peru, segundo resultado dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.	35
TABELA 4	Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Brasil, segundo sexo e resultado do teste de ELISA para toxoplasmose, 1997.	36
TABELA 5	Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Brasil, segundo sexo e resultado do teste de hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.	37
TABELA 6	Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Peru, segundo sexo e resultado do teste de ELISA para toxoplasmose, 1997.	38
TABELA 7	Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Peru, segundo sexo e resultado do teste de hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.	39
TABELA 8	Comparação da distribuição dos suínos abatidos em matadouros do Peru e do Brasil, segundo resultado do teste de ELISA para toxoplasmose, 1997.	40

TABELA 9	Comparação da distribuição dos suínos abatidos em matadouros do Peru e do Brasil, segundo resultado do teste de hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.	41
TABELA 10	Comparação da distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Brasil segundo os resultados dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.	42
TABELA 11	Comparação da distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Peru segundo os resultados dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.	43
TABELA 12	Evolução das densidades ópticas e avidéz dos anticorpos IgG do suíno experimentalmente infectado com taquizoítos de Toxoplasma gondii , mediante o teste de ELISA, São Paulo, 1997.	44
TABELA 13	Índices de avidéz (%) dos suínos reagentes ao teste de ELISA, segundo procedência e sexo, 1997.	47
TABELA 14	Medidas de resumo dos índices de avidéz dos suínos procedentes do Brasil e do Peru, 1997.	48
TABELA 15	Análise de variância para os índices de avidéz (log) dos suínos brasileiros e peruanos, 1997.	48

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Evolução das densidades ópticas dos anticorpos IgG do suíno experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii*. 45
- FIGURA 2 Evolução dos anticorpos IgG do suíno experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii*. 46
- FIGURA 3 Médias dos índices de avidéz (log) dos suínos brasileiros e peruanos, 1997. 49

1. INTRODUÇÃO

1.1. TOXOPLASMOSE

Quatro décadas atrás foram poucos os pesquisadores que avistaram a expressividade que a toxoplasmose poderia vir a ter. Posteriormente, mediante estudos realizados por vários profissionais vinculados a diversas áreas de trabalho, a transcendência da toxoplasmose foi ficando bem demarcada, confirmando as hipóteses daqueles que previam essa situação (AMATO NETO e col. 1995).

A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii*, protozoário que se aloja no intestino delgado dos felídeos, hospedeiros definitivos e em diferentes tecidos de outros animais de sangue quente, incluindo o homem, hospedeiros intermediários (AMATO NETO e col. 1995). Os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos, pois somente nesses animais há ciclo enteroepitelial com reprodução sexuada do parasita, seguida da formação de oocistos que são eliminados pelas fezes (LARSSON 1976); o outro ciclo de desenvolvimento do parasita é o extraintestinal de ocorrência nos hospedeiros intermediários ou acidentais e definitivos (HOARE 1972). Os oocistos podem ser eliminados aos milhões numa só evacuação, permanecendo viáveis no meio ambiente por um período aproximado de um ano em climas quentes ou úmidos, ou mesmo por períodos maiores em climas frios (JONES 1973). Nos hospedeiros intermediários há somente o desenvolvimento assexuado com formação de taquizoítos e bradizoítos.

A toxoplasmose apresenta uma tripla consideração: econômica, clínica e sanitária, pois ao acometer suínos, bovinos, ovinos, caprinos e aves, ocasiona queda nas suas produções (carne, leite, lã e ovos). Mas, é o aspecto sanitário o que tem maior relevância pelo seu caráter de antropozoonose e, fundamentalmente pelo hábito alimentar, levando ao

consumo de carnes e produtos crus ou mal cozidos que permitem a transmissão desta zoonose ao homem.

A toxoplasmose é uma doença de distribuição cosmopolita, fato que levou Jacobs a afirmar que o homem vive num mar de infecção toxoplásmica (APT e col., 1973); no entanto, parece que é mais frequente em climas quentes e úmidos. Além disso, esta infecção constitui a parasitose mais frequente no homem e possivelmente nos animais homeotermos (APT e col. 1973), sendo sua prevalência particularmente elevada nos suínos da América (LEIGHTY 1990), chegando a se acreditar que a carne suína infectada é causa de 50% a 75% dos casos de toxoplasmose humana (ROBERTS 1985). De outro lado, os diversos aspectos parasitológicos, diagnósticos e clínicos que envolvem esta zoonose, já fazem parte do cotidiano dos profissionais que atuam na área da saúde pública (AMATO NETO e col. 1995). A importância da infecção no âmbito da Saúde Pública reside no fato da toxoplasmose ser uma apreciável causa de nati-mortalidade e, principalmente de morbidade neonatal, considerando-se as lesões oculares de intensidade variável e as alterações cerebrais graves (FRENKEL 1973).

1.1.1. *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* foi descrito em 1908 de forma independente por Splendore em coelhos de laboratório em São Paulo-Brasil e por Nicolle e Manceaux em roedores denominados “gondis” (*Ctenodactylus gundi*) na Tunísia; posteriormente foi identificado em cobaias, camundongos, hamsters, gatos, bois, porcos, aves e outras espécies de animais domésticos e silvestres (PIEKARSKI 1959; AMATO NETO e col. 1982). No início havia duas denominações: *Toxoplasma cuniculi* pelo fato de ter sido achado em coelhos e *Leishmania gondi*, por ter sido confundido com uma espécie de *Leishmania*. Posteriormente foi constatado que não apresentava blefaroplasto e foi considerado como um novo gênero, denominado *Toxoplasma* devido a sua forma de “arco” e por apresentar-se geralmente

como um corpúsculo falsiforme em forma crescente e a denominação **gondii** foi proposta para lembrar o animal em que o parasita foi encontrado (NICOLLE e MANCEAUX 1908; COUTINHO 1957).

O toxoplasma é um microorganismo unicelular intracelular e extracelular, móvel, gram negativo, sem hospedeiro específico (eurixeno). O parasita tem forma de arco, de extremos desiguais, um deles agudo e o outro arredondado. Possui um grande núcleo redondo ou oval, não tem flagelo, mas tem autonomia no movimento de rotação na qual participa a célula toda, ondulatória próprio da membrana celular. O seu tamanho varia de 2 a 12,0 x 1,5 a 4 micras. Nas preparações fixadas, o parasita pode adotar a forma oval ou esférica.

FRENKEL e col. (1970), classificaram o toxoplasma da seguinte maneira:

CLASSE	: Sporozoa
ORDEM	: Coccidia
SUB-ORDEM	: Eimerina
FAMÍLIA	: Toxoplasmidae
GÊNERO	: Toxoplasma
ESPÉCIE	: Toxoplasma gondii

A partir do ano de 1965 o **Toxoplasma gondii** passou a ser considerado como coccidia, pois HUTCHISON (1965), demonstrou a presença de formas de resistência (oocistos) nas fezes de gatos infectados pela via oral, pensando que os toxoplasmas estavam protegidos no interior de ovos de nemátodos (**Toxocara cati**). Posteriormente, HUTCHISON (1967) e HUTCHISON e col. (1968), demonstraram que as fezes transmitiam a infecção toxoplásmica na ausência de ovos de nemátodos. A despeito de alguns autores (citados por HUTCHISON e col. 1968) opinarem de que o gênero toxoplasma deveria estar incluído no gênero Isospora, MOREDA-

VÁSQUEZ (1976), aponta diferenças notórias, como a divisão por endodiotegia e endopoliogegia, a formação de cistos típicos do *Toxoplasma gondii*, que separam perfeitamente os dois gêneros.

1.1.2. EPIDEMIOLOGIA

A problemática epidemiológica da toxoplasmose tem relação com a baixa especificidade do hospedeiro, à possibilidade de localização nos diferentes órgãos, a eliminação no estágio infectante, a grande resistência aos fatores ambientais e a ampla possibilidade de infecção.

As vias de transmissão tanto entre os animais como entre os animais e os seres humanos, incluem o consumo de carne contaminada (alimentação, predação, canibalismo, necrofagia), e a ingestão de oocistos eliminados nas fezes de felídeos. Ainda, é referida a transmissão por mordeduras, através da saliva contaminada, consumo de pastos e de água contaminada por oocistos, até mediante ectoparasitas que atuam como vetores, como pulgas, carrapatos, baratas, moscas (AMATO NETO e col. 1995). Igualmente, o manuseio de animais infectados, de carcaças e vísceras contaminadas, representam risco de infecção (BEVERLEY e col. 1954; ISHIZUKA 1978b).

A importância do consumo de carnes cruas ou mal cozidas foi evidenciada por Desmonts e col. citados por AMATO NETO e col. (1995), em 1125 crianças internadas em Paris; estas crianças recebiam diariamente suco de carne crua e carne sangrenta de vaca ou cavalo. Das 641 crianças com reação sorológica negativa ao ingressarem na instituição, houve soroconversão em 204 (31%) durante o período de permanência; nessas crianças a taxa de “viragem” apresentou-se cinco vezes maior que a observada na população infantil em geral. O hábito de consumir carnes e produtos de origem animal crus ou mal cozidos, tem grande importância na epidemiologia desta zoonose. Os cistos permanecem viáveis em tecidos mantidos em refrigeração, a temperatura de 4°C, por período de aproximadamente 30 dias (FRENKEL 1973). Em relação a este fato, na

cidade de São Paulo - Brasil em açougues e supermercados, foi constatada a presença de cistos em 7% de carne suína (JAMRA e col. 1969). Estes fatos corroboram a afirmação de WORK (1968) de que o consumo e manejo de carne crua ou mal cozida leva ao risco de infecção por *Toxoplasma gondii*.

1.1.3. TOXOPLASMOSE HUMANA

A toxoplasmose, deve ser encarada sob dois aspectos, isto é: distribuição da toxoplasmose doença (casos clínicos descritos) e as formas assintomáticas confirmadas apenas por exames sorológicos (PESSÔA e MARTINS, 1974). Sabe-se que os óbitos causados por esta zoonose são raros (AMATO NETO e col. 1995) e a sua importância limitou-se por muito tempo à infecção congênita, pois não é raro que esta doença conduzisse a problemas de certa gravidade. As pessoas adultas desenvolvem imunidade antes de apresentar lesões e sintomas, mas, a maioria das crianças infectadas no útero, podem não apresentar sintomas ao nascer, mas passam a albergar um grande número de parasitas e terminam sofrendo de retinocoroidite (WILSON e col. 1980). Além disso, por uma diversidade de fatores, com o decorrer do tempo, tem surgido deficiências imunitárias, cada vez mais frequente e é neste contexto que a toxoplasmose passou a adquirir maior relevância, assumindo o papel de agente oportunista. Por exemplo, a meningoencefalite toxoplásmica tem sido referida com mais frequência, particularmente a partir do advento do Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), no qual a toxoplasmose causa graves distúrbios, principalmente no concernente ao sistema nervoso central (WANKE e col. 1987; AMATO NETO e col. 1995). Assim, em São Paulo em 73 doentes de AIDS com comprometimento neurológico, 52,1% foram clinicamente diagnosticados com neurotoxoplasmose, enquanto 54,8% apresentaram toxoplasmose ao diagnóstico anatomopatológico, mostrando uma correlação significativa em nível de 0,05 (THULER 1995). Ainda em São Paulo, MUCCIOLI e col. (1995), relatam que

em 70 pacientes infectados pelo HIV, 40% manifestaram neurotoxoplasmose.

Em relação à prevalência da toxoplasmose humana, há frequências muito variáveis dependendo do lugar e do método empregado para sua estimativa, admite-se que no mundo inteiro haja aproximadamente 500 milhões de pessoas infectadas assintomáticas. É provável que 50% da população humana dos Estados Unidos da América do Norte, e em certos, lugares como Taiti, a frequência de infectados atinge a 68% (FELDMAN e MILLER, 1956); já no Japão ISHII e col. (1972) encontraram 42% de reagentes; na África 50% (GASCON 1989); na China 9,84% (KO e col. 1980), na Indonésia 15% (GANDAHUSADA 1978); na Itália 48,5% (VALCAVI e col. 1995); enquanto na América Latina há valores como 36,57% (KAWARABAYASHI e col. 1980) e 34% (ELSAID e col. 1995) no Brasil; 55,9% em Cuba (MARTÍNEZ e col. 1989), 73,5% na Bolívia (PARADISI e col. 1989), e 53,5% na Argentina (PÉREZ RENDÓN e col. 1992). Além destes achados, há registros de frequências encontradas em grupos específicos da população: no Brasil, CORRÊA e col. (1972) determinaram em escolares 44,47% de reagentes e em magarefes ISHIZUKA (1978b) encontrou 97,1% de positivos; na Faculdade de Medicina Veterinária em Belo Horizonte, Minas Gerais houve 46% de reagentes (RIEMANN e col. 1974); trabalhando com doadores de sangue, ARAUJO (1970) obteve 50,3% de reagentes, e num grupo de profissionais GOMES (1970) encontrou 90,3% de positivos ao teste. Em Cuba, MARTÍNEZ e col. (1994) relatam que 71% de mulheres grávidas eram reagentes; nos Estados Unidos da América do Norte, profissionais veterinários apresentaram frequências de 20% (RIEMANN e col., 1974) e 18,3% (SENGBUSCH e SENGBUSCH (1976). Um outro grupo de importância em relação a toxoplasmose, são os recém nascidos; FRENKEL (1973) estimou em 3000 o número de crianças que anualmente nascem nos Estados Unidos com a parasitose, sendo de 5% a 15% os casos fatais, de 8% a 10% os que apresentam lesões cerebrais graves, de 10% a 13% os portadores de alterações visuais com intensidade variável e de 58% a 72% os que não apresentam sintomatologia clínica ao nascer e

posteriormente são acometidos de retinocoroidite. Em relação a gravidez, quando a infecção pelo *Toxoplasma gondii* ocorre no segundo trimestre de gestação, há um quadro clínico de maior gravidade do que no terceiro trimestre; no entanto, a transmissão é mais frequente neste último período (DESMONTS e COUVREUR 1974) . Na Cidade de São Paulo-Brasil, estimou-se em 16 por mil nascidos vivos a taxa de infecção de toxoplasmose congênita e em 5 por mil a taxa de toxoplasmose doença (CATÁR e col. 1969). Outro aspecto interessante é o custo que representa esta parasitose, assim nos Estados Unidos da América estimou-se que o custo total da toxoplasmose congênita, oscila entre 31 e 39 milhões de dólares, incluindo os gastos de hospitalização, previdência social, educação especial e escolarização para os portadores de deficiências visuais (FRENKEL 1973).

No Brasil, encontrou-se uma frequência média em torno de 60% de adultos que tiveram contato com o parasita, com discretas variações regionais (AMATO NETO e col. 1995), frequência comparável as de outros países, pois testes sorológicos têm revelado que a população adulta de diferentes países apresenta uma prevalência entre 30% e 60%, apesar da toxoplasmose raramente se manifestar com quadro sintomático típico (FRENKEL 1971; WATSON 1972). A elevada frequência de infecções inaparentes e baixa magnitude de ocorrência de casos de doença são relatados devido a parasitose caracterizar-se por apresentar alta infectividade e baixa patogenicidade, morbidade e letalidade (KROGSTAD e col. 1972; FRENKEL 1973). No entanto a despeito desta alta prevalência de infecção, a transmissão da parasitose permanecia incógnita, pois a frequência da transmissão congênita não explicava a elevada prevalência da infecção; até que WEINMAN e CHANDLER (1956) sugeriram que a transmissão poderia ocorrer pela ingestão de carnes mal cozidas e que foi confirmada por JACOBS e col. citados por AMATO NETO e col. (1995), que mostraram a resistência dos cistos teciduais às enzimas proteolíticas dos sucos gástricos. Hoje, sabe-se que esta zoonose pode ser transmitida por três vias: pelo consumo de carne contendo taquizoítos (forma do parasita

que se desenvolve durante a fase da infecção) ou bradizoítos (em cistos, formados depois da fase aguda); pela ingestão de oocistos, eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo e pela transmissão congênita (QUINN e MCGRAW 1972; LEIGHTY 1990).

1.1.4. SUINOCULTURA

A carne suína continua sendo a carne que mais se produz e se consome no mundo inteiro, representando de 40% a 44% da produção mundial de carnes (PÉREZ 1993; AVICULTURA PROFESIONAL 1996; NÄÄS 1997). Em relação ao tipo de carne, espera-se um incremento superior a 3,8% para a carne de aves, que irá substituir à carne bovina que só aumentará em 0,5%, estimando-se por outro lado, que o incremento da carne suína em nível mundial vai ser de 2,4%. Um fato interessante, tanto na produção como no consumo deve acontecer nos países em desenvolvimento, onde a produção de carne de ave aumentará em 7,1% e a dos suínos em 3,7% (PÉREZ 1993).

A participação dos suínos na cadeia epidemiológica da toxoplasmose tem apresentado níveis crescentes devido ao incremento do consumo de alimentos de origem animal. Assim, no ano 1983, as indústrias brasileiras de aves e suínos produziam 3,2 milhões de toneladas de carne de aves e 1,2 milhões de carne suína. Estas cifras representam incrementos anuais de 11,5% e 4% respectivamente em comparação ao ano 1991, apesar das dificuldades que a economia brasileira experimentou durante os últimos anos (INDUSTRIA AVÍCOLA 1993). Não obstante, as previsões posteriores foram superadas, pois no ano de 1997 a estimativa do rebanho brasileiro de suínos era de 30,4 milhões de cabeças e o número de animais abatidos com inspeção sanitária era de 18,8 milhões. No Mercosul, o Brasil apresenta uma produção de quase 1,5 milhões de toneladas de carne suína, representando 16% da produção brasileira de carnes, considerando aves, bovinos, suínos e ovinos. Além disso, tem que se considerar que no mundo 44% do consumo é de carne suína, 29% carne bovina, 23% aves e 4% para os demais tipos

de carne; no Brasil, a produção de carne suína é de 10% do total de carnes (NÄÄS 1997).

Por outro lado, no Peru, a indústria suinícola também tem apresentado aumento da sua produção nos últimos anos; assim, no ano 1989 a população suína no litoral era de 548.890, na selva 359.128 e na serra 1.132.480 animais (FUKUDA 1989); representando sua produção 11,8% do total das carnes (NÄÄS 1997).

1.1.5. TOXOPLASMOSE SUÍNA

Atribuiu-se a FARRELL e col. (1952) a primazia da descrição da toxoplasmose em suínos; estes animais têm merecido especial atenção dos epidemiologistas, por serem importantes reservatórios do **Toxoplasma gondii** para outros animais e também para o homem (CATÁR e col. 1969; NOBUTO e col. 1969; JACOBS 1973). Como a infecção latente não pode ser detectada na inspeção rotineira das carcaças e como o parasita localiza-se nos músculos estriados, a carne suína pode vir a desempenhar um papel muito importante na transmissão desta zoonose para os humanos (TOKUTOMI e col. 1980). O **Toxoplasma gondii** tem sido isolado de carne de suínos adquiridos em supermercados, com frequências que oscilam de 1,9% a 19,2% (TOKUTOMI e IKEGAMI 1965; TOKUTOMI e col. 1980). STAGNO e THIERMANN (1973) encontraram intensa associação entre o consumo de carne suína e a toxoplasmose. A condição sanitária dos animais de consumo humano é de grande relevância, pois além da toxoplasmose, diversas doenças podem ser transmitidas via digestiva, através da ingestão de carne crua ou mal cozida. Nos países em que se usa carne crua ou pouco cozida, como por exemplo os Estados Unidos da América do Norte, esta é possivelmente a maneira mais frequente de transmissão da toxoplasmose entre animais carnívoros (FRENKEL 1971; PESSÔA e MARTINS, 1974).

Dentre os inquéritos sorológicos já efetuados sobre a toxoplasmose suína, a grande maioria não levou em consideração idade e sistema de criação (extensiva e intensiva), variáveis estas que devem ser consideradas, pois já foi constatado que a frequência desta zoonose foi diretamente proporcional à faixa etária, tanto no homem (WALTON e col. 1966; ROEVER-BONNET e col. 1969; FRENKEL 1971; RIEMANN e col. 1974), como nos animais (NOBUTO e col. 1969). O tipo de criação (intensiva ou extensiva) pode influir na prevalência da toxoplasmose em suínos, pois, nas criações intensivas, apesar da vigilância sanitária e boas condições de manejo, os animais podem ingerir ratos infectados o que amplia as possibilidades de infecção (APARICIO GARRIDO e col., 1972).

Em relação à frequência da toxoplasmose suína, há valores muito diversos dependendo da área, do método de diagnóstico e da sua interpretação. Assim, no Brasil mediante o teste de hemaglutinação indireta D'ANGELINO e ISHIZUKA (1986b), encontraram 46,6% e 42,7% de reatores à toxoplasmose em suínos procedentes de criação semi-intensiva intensiva respectivamente; ISHIZUKA (1986) encontrou em São Paulo 42,1% de positivos; entanto SILVA e col. (1981) encontraram 7,2% de reatores. Além disto, na Colômbia MONTROYA e col. (1981), acharam 30% de reatores. Por outro lado, nos Estados Unidos da América Norte, MCILWAIN e FARGO (1969); DURFEE e col (1974) e HUGH-JONES (1986), reportaram suínos reatores em níveis de 14,4% ; 19,0% e 19,2% respectivamente. Nos Anexo 1 e 2 são relacionados informes obtidos no período 1967 a 1993.

1.2. DIAGNÓSTICO

1.2.1. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Devido aos testes sorológicos determinarem a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, mas não a presença do parasita, é recomendável que se identifique a presença de *Toxoplasma gondii* no suíno, através do

exame histopatológico. A pesar de ser possível a observação do parasita em preparados a fresco: exsudatos, humor aquoso, líquido ventricular ou céfalo-raquideano, na prática recorre-se mais ao exame de materiais fixados e corados pelos métodos de Leishman e Giemsa, em cortes de tecidos “intra-vitam” ou “post-mortem” (AMATO NETO 1971).

No Brasil, SCHENK e col. (1977), isolaram o parasita de camundongos; AMARAL e MACRUZ (1968), isolaram o parasita em oito dos 25 suínos examinados. Em São Paulo, AMARAL e MACRUZ (1969), isolaram o **Toxoplasma gondii** em cinco dos 25 suínos procedentes de um matadouro; por outro lado, no Uruguai, FREYRE e col. (1991), constataram o **Toxoplasma gondii** em diafragmas de suínos.

1.2.2. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Os métodos indiretos, através de provas imunológicas quantitativas, são os de melhor praticidade para os estudos epidemiológicos, tais como inquéritos de prevalência da toxoplasmose no homem e nos animais e diagnóstico da infecção ou doença (BEVERLEY 1973). Com o desenvolvimento de técnicas sorológicas, capazes de detectar anticorpos anti-**Toxoplasma gondii**, tornou-se possível o conhecimento da amplitude da infecção em diferentes grupos populacionais de diferentes áreas geográficas, assim como em numerosas espécies animais (AMATO NETO e col. 1995).

Dentre os testes sorológicos mais empregados para o diagnóstico da toxoplasmose, destacam-se: hemaglutinação (HA), imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (CAMARGO 1964; SOLTYS e WOO 1972; WALTMAN e col. 1984), no entanto, a reação de Sabin-Feldman (SF) ou teste do corante ainda é aceita como o teste definitivo (WALTMAN e col. 1984).

1.2.2.1. TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO

A reação de hemaglutinação desenvolvida por BOYDEN (1951), tem apresentado bons resultados para o diagnóstico de diversas doenças parasitárias. JACOBS e LUNDE (1957), utilizaram este teste pela primeira vez para diagnóstico da toxoplasmose.

A reação de hemaglutinação baseia-se na capacidade dos anticorpos anti-toxoplasma aglutinarem hemácias previamente sensibilizadas com antígenos de *Toxoplasma gondii* (TARAZÓN 1980). Este teste vem assumindo cada vez maior importância na imunoserologia da toxoplasmose (McILWAIN e FARGO 1969; ISHIZUKA e col. 1974), tanto que BEHYMER e col., (1973), propuseram esta prova para o diagnóstico rotineiro nas clínicas e hospitais veterinários, devido ao emprego de antígeno facilmente obtido no comércio e também por oferecer resultados rápidos (cerca de duas horas). JACOBS e LUNDE (1957), afirmam que a reação de hemaglutinação apresenta vantagens quando comparada aos testes de Sabin-Feldman e imunofluorescência, pelo menos para a espécie humana; com relação ao primeiro, dispensa o fator acessório e antígeno vivo e em relação à imunofluorescência não é necessário o emprego do microscópio. Este teste tem ainda outras vantagens: necessidade de pequena quantidade de sangue ou soro (podem ser colhidas em gotas, sobre papel filtro), maior facilidade de execução e interpretação dos resultados, não apresenta riscos de acidentes laboratoriais e permite a armazenagem do antígeno em geladeira. No entanto, SATO e col., (1962) demonstraram a impossibilidade da aplicação do teste de hemaglutinação original (JACOBS e LUNDE 1957) em soros de suínos e propuseram a substituição do soro normal de coelhos pelo soro normal do suíno, bem como realização dos procedimentos de lavagem e resuspensão dos eritrócitos pelo ácido tânico a 0°C.

A semelhança da reação do corante, a hemaglutinação revela imunoglobulinas de tipo IgG (APT e col. 1973; BEHYMER e col. 1973; JONES 1973; McKINNEY 1973); relacionados a constituintes

citoplásmaticos de origem protéica, bastante solúveis. Devido à natureza do antígeno do **Toxoplasma gondii**, há necessidade de um período de tempo maior para que ocorra uma resposta imunitária completa, por esse motivo, as reações de hemaglutinação são de positividade tardia na evolução da infecção, sendo que os seus títulos se mantêm por um longo período de tempo (BEHYMER e col. 1973; RIEMANN e col. 1974). Suínos alimentados com ratos infectados com a estirpe Beverley de **Toxoplasma gondii** por um período aproximado de 20 dias, tornaram-se positivos aos testes de hemaglutinação e o teste da pele passados 15 a 30 dias respectivamente após a primeira administração, embora o animal não apresentasse nenhuma sintomatologia clínica da doença (DURFEE e CHIEN, 1971)

1.2.2.2. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

O teste de ELISA baseia-se na utilização de antígenos ou anticorpos fixados numa superfície insolúvel, utilizada para capturar o anticorpo ou antígeno correspondente; posteriormente, a união antígeno-anticorpo é detectada através de um complexo enzimático afim ao antígeno ou anticorpo. A degradação do substrato enzimático pode ser medida e é proporcional à concentração do antígeno ou anticorpo que se deseja evidenciar (TARAZÓN 1980).

O teste de ELISA para detecção de toxoplasmose em suínos tem claras vantagens sobre os testes de hemaglutinação indireta e imunofluorescência indireta; assim, muitas amostras podem ser analisadas com pouco equipamento sofisticado, comparado com o teste de imunofluorescência e os resultados obtidos com ELISA oferecem maior consistência e são mais confiáveis do que os obtidos pela hemaglutinação indireta (WALTMAN e col. 1984). Além disso, o ELISA tem alta sensibilidade e especificidade e pode identificar tanto infecções recentes ou latentes de toxoplasmose, detectando simultaneamente anticorpos IgM e IgG (ROMERO e col. 1995). O teste de ELISA pode ser considerado como um método recomendável para sorodiagnóstico e particularmente para inquéritos sorológicos de toxoplasmose.

1.2.2.3. VALIDAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS

Um aspecto de interesse em relação aos testes sorológicos refere-se à sua validade. Com base nos conceitos de Thurner e Remein, citados por VECCHIO (1966), na avaliação de uma prova utilizada para o diagnóstico de uma doença, sua validade é determinada por sua sensibilidade e especificidade. A sensibilidade é definida como a capacidade de um teste qualificar como positivos àqueles indivíduos que realmente têm a doença, enquanto a especificidade é a capacidade de apresentar resultados negativos para aqueles que são livres da doença. Por outro lado, a co-positividade e co-negatividade podem ser definidas 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 (BUCK e GART 1966). Neste contexto, trabalhando-se com soros de 96 animais, BEHYMER e col. (1973) obtiveram uma concordância da ordem de 95% entre as reações de hemaglutinação e de imunofluorescência indireta aplicadas ao diagnóstico de toxoplasmose felina; D'ANGELINO (1983) constatou em suínos, que as provas de imunofluorescência indireta e de hemaglutinação apresentaram uma concordância de 84,25% e uma discordância de 15,75%.

1.3. TESTE DE AVIDEZ

A presença de anticorpos anti-toxoplasma nos teste sorológicos comumente usados não determina se a infecção é recente ou passada. A toxoplasmose congênita natural em suínos foi reportada por WORK e col., (1970); igualmente, foi relatada a ocorrência de abortos e natimortos, com isolamento do parasita (HUNTER 1979; JONES e HUNTER 1979; VIDOTTO e COSTA 1987); ainda mais, parece existir alguma associação entre os níveis de anticorpos dos leitões e os de suas mães, possivelmente em

decorrência da transferência de anticorpos maternos; no entanto, WORK e col. (1970) não detectaram anticorpos humorais em nenhum dos leitões recém nascidos de porcas infectadas com taquizoítos e cistos de **Toxoplasma gondii**; entretanto, a partir do quarto dia após o nascimento, encontraram títulos sorológicos de 50 a 1250 pela reação de Sabin-Feldman. Infelizmente as técnicas comumente usadas não permitem a diferenciação dos dois estágios da infecção; o teste de imunofluorescência por exemplo não pode demonstrar anticorpos IgM em soros de pacientes com toxoplasmose aguda adquirida, fato que é atribuído ao efeito inibidor de elevados títulos de anticorpos IgG nesses soros (PYNDIAH e col. 1979).

A infecção primária recente pelo **Toxoplasma gondii**, é responsável a presença no soro de anticorpos específicos IgM. Esta zoonose tem elevada incidência e o seu diagnóstico laboratorial é difícil, especialmente nos casos agudos, pois esta é caracterizada pela presença de antígenos circulantes (AC) e complexos imunes (CI) em 100% dos indivíduos, com altas concentrações de IgM e baixas concentrações de IgG (GERMANO 1995). No entanto, no diagnóstico da toxoplasmose aguda ou de contágio recente, a possibilidade de outros marcadores é altamente desejável. Atualmente é referida a baixa afinidade ou avidez de anticorpos específicos IgG e a determinação da avidez desse anticorpo pode ser utilizada como marcador de infecção primária recente pelo **Toxoplasma gondii** (CAMARGO e col. 1991). Este fato leva-nos a distinguir a infecção recente da antiga, o que pode ser conseguido através da “avidez” do anticorpo IgG, a qual representa um método altamente sensível e específico, apropriado para a verificação de infecções agudas primárias por **Toxoplasma gondii** durante a gravidez (LAPPALAINEN e col. 1993). De fato, as amostras de soros de pacientes com infecções recentes apresentam baixa avidez da IgG em contraste com os soros de indivíduos com infecções passadas que mostram alta avidez de anticorpos IgG; esta avidez dos anticorpos IgG, então, pode ser usada para identificar grávidas que estão com risco de transmissão da toxoplasmose para os seus filhos (HEDMAN e col. 1989).

A afinidade de um anticorpo é definida como a força da união entre um determinante de um antígeno ou hapteno e o ponto de ligação do anticorpo; no entanto, na maioria das situações práticas há a interação de um anticorpo polivalente com uma molécula antigênica multivalente e esta ligação expressa a avidéz (ROITT 1995; ROITT 1997). Em uma imunização primária com antígeno protéico, a resposta humoral se inicia pela ligação do antígeno a receptores de membrana (IgM e IgD) presentes em linfócitos B, que são induzidos por linfócitos T auxiliares. Durante o processo de diferenciação, acontecem diversos fenômenos imunológicos, como produção de diferentes classes de imunoglobulinas, maturação da afinidade de anticorpos e geração de células de memória. No início, são produzidos predominantemente anticorpos da classe IgM. Por indução de novos isotipos, ocorre a diferenciação de clones produtores de anticorpos de outras classes (IgG, IgA). Essa resposta humoral inicialmente está representada por anticorpos de baixa afinidade, que posteriormente são substituídos por aqueles de maior afinidade. Este fenômeno é chamado de maturação da afinidade (NOSAL 1992; ABBAS e col. 1994).

Esta maturação acontece através de mutação somática nos genes que codificam a região hipervariável das cadeias L e H da imunoglobulina, quando linfócitos B sensibilizados migram para centros germinativos presentes nos órgãos linfóides. No decorrer da maturação, os linfócitos B hipermutados que apresentarem receptores com baixa afinidade, ou que não reconhecem o antígeno presente nas células dendríticas foliculares serão eliminados. Por outro lado, os linfócitos B que apresentarem interação de alta afinidade, são selecionados e sobrevivem, desenvolvendo-se em células produtoras de anticorpos de alta afinidade. Parte dessas células migram para a polpa vermelha do baço, córtex e medula dos linfonodos e medula óssea, tomando-se esta última, duas a três semanas após a imunização, o principal local de produção de anticorpos de alta afinidade. Outra parte das células hipermutadas se diferenciam em células de memória, que podem sobreviver na circulação por meses ou anos na ausência de estímulo antigênico. As células de memória, numa imunização secundária,

desenvolverão uma resposta humoral constituída basicamente de anticorpos de alta afinidade (SOUZA 1996). Esta resposta humoral secundária acontece muito mais rapidamente que a resposta primária, precisando ainda menor quantidade de antígeno (STEINER e EISEN 1967; MOND e col., 1974).

No entanto, devido a curta vida útil dos suínos, peso de abate entre quatro e seis meses, não fica bem definido a diferenciação da toxoplasmose aguda e crônica pelas seguintes razões: a substituição de anticorpos IgG de baixa avidéz pelos de alta avidéz, pode requerer vários meses (HEDMAN e col. 1989); como a maturação da afinidade necessita de pelo menos quatro meses, a avidéz obtida em suínos de abate, poderia significar presença de imunidade passiva materna, transferida pelo colostro, pois, YABIKI e NAMIOKA (1976) encontraram IgG em cinco de 20 amostras de cordão umbilical e IgM em nove amostras; apenas sete amostras não possuíam nenhuma classe de anticorpos.

Por estes motivos, para se avaliar a utilidade dos anticorpos de alta avidéz nos suínos jovens (pela sua vida útil curta), seria conveniente a realização de estudos nos primeiros meses de vida a fim de verificar anticorpos maternos, já que nos humanos em até quatro meses após infecção, os valores de avidéz foram muito baixos (RADKOWSKI e col. 1996).

Uma outra utilidade para a determinação da avidéz é a validação de vacinas, pois este método permite a avaliação de vacinas com apenas uma única amostra de sangue, evitando-se o sistema de determinação da soroconversão, para a qual são necessárias duas amostras (antes e após da vacinação); a necessidade de uma única amostra é relevante, devido as dificuldades encontradas com o manejo de animais como suínos. A vacinação nos animais é muito importante para o controle de algumas doenças zoonóticas e os conceitos de vacinação na prevenção de toxoplasmose animal tem sido revisadas (OLSEN 1999). Por outro lado, DUBEY e col. (1991), salientam os resultados de uma vacina testada em

suínos que poderia reduzir as perdas econômicas provocadas pela toxoplasmose suína.

1.3.1. DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DE ANTICORPOS

Existe uma variedade de técnicas para determinar a avidéz de anticorpos em diversas doenças; no entanto, devido a sua complexidade têm uso limitado na rotina diagnóstica, assim, há a técnica de cálculo da constante de equilíbrio (UNDERWOOD 1988), o radioimunoensaio com duplo radioisótopo (WEN e col. 1990; CHARGELEGUE e col. 1993; CHARGELEGUE e col. 1995), a técnica da competição (SIMON e col. 1993) e a curva de dose resposta (LEHTONEN e MEURMAN 1982; RADKOWSKI e col. 1993). Também tem-se utilizado a técnica de imunofluorescência indireta para a determinação da avidéz de anticorpos em infecções pelo herpesvírus –6 (WARD e GRAY, 1994), citomegalovírus (LUTZ e col. 1994) e parvovírus (GRAY e col. 1993).

1.3.1.1. TÉCNICAS DE ELISA PARA DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ

A determinação da avidéz para fins diagnósticos tem sido realizada pela reação imunoenzimática (ELISA) através de duas técnicas:

- PRINCÍPIO DA DILUIÇÃO.

Atua prevenindo a formação do complexo antígeno-anticorpo pela adição de agentes caotrópicos (dietilamina ou guanidina-HCl) ao diluente do soro (INOUE e col. 1984; DEVEY e col. 1988). INOUE e col. (1984), pesquisaram anticorpos de baixa avidéz em infecções passadas e recentes pelos vírus da encefalite japonesa, rotavírus e rubéola, usando a guanidina-HCl como agente caotrópico, no entanto DEVEY e

col., (1988), usando dietilamina como agente caotrópico, determinaram a avidéz de anticorpos IgG1 e IgG4 contra toxoide tetânico. THOMAS e MORGAN-CAPNER (1988) aplicaram o DEA como agente caotrópico para diferenciar a infecção primária da reinfecção por rubéola, mediante determinação da avidéz de antígenos IgG. Por outro lado, THOMAS e col. (1992), demonstraram a superioridade da determinação de anticorpos IgG1 de baixa avidéz contra o vírus da rubéola para diagnóstico de infecção primária em amostras colhidas mais tardiamente, anticorpos de baixa avidéz foram encontradas em 91% das amostras obtidas três a quatro meses após o aparecimento do exantema, enquanto que só 9% apresentaram anticorpos IgM.

A técnica de ELISA para determinação da avidéz não tem sido aplicada em larga escala devido a necessidade da titulação do soro em meio de diluições em PBS e em dietilamina. Além disso, GOLDBLATT e col. (1993) questionaram o uso da dietilamina como agente caotrópico, pois, resultados similares foram obtidos com solução tamponada alcalina (pH 11,3) e dietilamina, o que indica ser a inibição da ligação do antígeno ao anticorpo, consequência do pH alcalino provocado pela diluição da dietilamina no tampão.

- PRINCÍPIO DA ELUIÇÃO

Produz a dissociação do complexo antígeno-anticorpo mediante o tratamento da placa com agentes caotrópicos (uréia ou tiocianato) (PULLEN e col. 1986; HEDMAN e SEPPAIA 1988). PULLEN e col. (1986), utilizaram pela primeira vez este método para determinar avidéz de anticorpos contra rubéola, empregando o tiocianato de amônio como agente caotrópico. A técnica que utiliza a uréia como agente dissociante do complexo antígeno-anticorpo foi introduzida por HEDMAN e SEPPAIA (1988), e forneceu melhores resultados que os obtidos com o

tiocianato de potássio, pH ácido e guanidina-HCl. Posteriormente HEDMAN e col. (1989), usaram a mesma técnica para distinguir toxoplasmose primária da imunidade anti-toxoplásmica pre-existente. A partir de então, empregando a uréia como agente caotrópico esta técnica passou a ser empregada em diversas infecções virais, tais como as causadas por citomegalovírus (BLACKBURN e col. 1991), vírus da hepatite C (WARD e col. 1994), vírus da varicela-zoster (JUNKER e TILLEY 1994) e vírus do sarampo (TUOKKO 1995; SOUZA 1996). No caso da toxoplasmose, a técnica para determinar a avidéz de anticorpos já foi utilizada (HEDMAN e col. 1989; CAMARGO e col. 1991; LAPPALAINEN e col. 1993).

2. OBJETIVOS

1. Estimar a frequência da toxoplasmose em suínos abatidos em matadouros localizados em Carapicuíba-Brasil e em Lima-Peru, no período janeiro a fevereiro de 1997, através dos testes de ELISA, hemaglutinação indireta e exame histopatológico com a respectiva distribuição da infecção segundo o sexo.
2. Estudar comparativamente a eficiência diagnóstica dos testes de ELISA e de hemaglutinação indireta aplicados ao diagnóstico da toxoplasmose em suínos naturalmente infectados.
3. Padronizar a reação de avidéz dos anticorpos IgG para o diagnóstico da toxoplasmose suína e avaliar o seu desempenho no diagnóstico da toxoplasmose em suínos naturalmente infectados.
4. Estabelecer a concordância dos resultados obtidos pelos testes de ELISA e hemaglutinação indireta para diagnóstico de toxoplasmose em suínos naturalmente infectados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. REAGENTES

- a) Os sais e demais reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise sendo a água purificada em sistema Mili-Q, apresentando resistividade de 18 mega Ω .
- b) OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) SIGMA[®], mantido a -20°C .
- c) Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate) SIGMA[®].
- d) IgG anti-pig (whole molecule) Peroxidase Conjugate SIGMA[®], anticorpo desenvolvido em coelho.
- e) “Multiwell plate” (polystyrene), placas de 96 poços usados durante os ensaios imunoenzimáticos.

3.1.2. ANIMAIS

3.1.2.1. SOROLOGIA

Os animais do estudo foram suínos abatidos em matadouros localizados nas cidades de Carapicuíba-Brasil e Lima-Peru, no período janeiro a fevereiro de 1997. Os suínos brasileiros eram procedentes do Frigorífico Rajá, que recebem animais da região e outros Estados, e os suínos peruanos eram procedentes de criações da Província de Lima.

Os suínos tinham aproximadamente 90 quilos (peso ao abate) e idade entre quatro e cinco meses. As amostras foram colhidas durante a rotina de sangria em frascos de plásticos, identificando-se cada um deles segundo sexo do animal, os quais foram colocados em uma caixa contendo gelo para sua conservação até chegar ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de

Medicina Tropical da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Medicina Preventiva Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Lima, respectivamente. Uma vez no laboratório, procedeu-se à separação dos soros sanguíneos mediante centrifugação, para logo estocá-lo a -20°C em frascos de plástico até o processamento das provas. No caso dos soros dos suínos peruanos, eles foram transportados em caixa contendo gelo até o Laboratório do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, onde foram feitas todos os testes sorológicos.

3.1.2.1.1. SUÍNO EXPERIMENTALMENTE INFECTADO

Para estudo da evolução da toxoplasmose suína, um grupo de animais recém desmamados de um criador tecnificado, localizado no Itú-São Paulo, foi testado através do teste de hemaglutinação indireta, visando afastar a possibilidade de infecção natural. Dos leitões negativos para anticorpos anti-**Toxoplasma gondii**, foi adquirido um único leitão, de sexo macho, que foi conduzido para o Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foi gentilmente mantido pela equipe de Médicos Veterinários do Hospital. A ração comercial para crescimento foi administrada “*ad libitum*” durante o período experimental.

Antes do inóculo com 10^7 formas de taquizoítos, foi obtida uma amostra de sangue do suíno para controle negativo. A seguir, o animal foi inoculado subsequentemente com 10^7 formas viáveis de taquizoítos da estirpe RH de **Toxoplasma gondii**, contidos em 10 ml do inóculo, pela via intraperitoneal. O suíno foi observado por 140 dias sem apresentar qualquer sinal clínico da infecção, com crescimento normal.

Posteriormente foram obtidas amostras de sangue desse suíno aos 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 dias após infecção. Por problemas operacionais, ocorridos no transporte e conservação, as amostras de 20 e 40 dias foram perdidas. As amostras obtidas do suíno experimentalmente infectado foram analisadas pelo teste de ELISA para determinar a avidéz dos anticorpos IgG.

3.1.2.1.2. PARASITAS

Os parasitas utilizados foram taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (estirpe RH), mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por meio de passagens sucessivas em camundongos Swiss (não isogênico), através de lavagem peritoneal com solução salina tamponada com fosfato (PBS) – NaCl 0,15 M/tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,2 e subsequente inóculo intraperitoneal em novos animais.

3.1.2.2. HISTOPATOLOGIA

Para os exames histopatológicos foram colhidos fragmentos de músculo (diafragma), cérebros e olhos de suínos abatidos no mesmo Frigorífico de Carapicuíba. As amostras foram colocadas em frascos contendo formol e levadas ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, para a realização dos exames.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado utilizando-se a fórmula para estimativa de uma proporção pela aproximação normal (MIGUEL 1982):

$$n = \frac{Z^2 p q}{e^2}, \text{ onde:}$$

n : tamanho mínimo da amostra

Z : valor de variável reduzida tabulada.

p : valor esperado na população.

q : complemento de p.

e : precisão.

para o presente estudo o tamanho mínimo da amostra foi:

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,21 \times 0,79}{0,05^2} = 255 \quad *$$

* O valor 0,21 foi calculado considerando-se todos os trabalhos consultados relacionados a estimativas de frequências de toxoplasmose que usaram os testes de hemaglutinação e ELISA, por serem estas as técnicas empregadas neste trabalho; além disso para se ter uma melhor estimativa, os dados dos diferentes estudos foram ponderadas segundo o número de animais examinados.

Sendo este o tamanho mínimo e com a finalidade de melhorar a estimativa, foram obtidas 310 amostras de sangue do Frigorífico Rajá, sendo complementadas com 96 amostras do abatedouro de La Colonial – Lima, Peru.

3.2.2. EXAME HISTOPATOLÓGICO

As amostras dos 30 suínos brasileiros para este exame foram previamente fixadas em formol a 10% durante aproximadamente 72 horas. Tais materiais foram submetidos às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina, sendo obtidos cortes seriados de aproximadamente 5

µm. Estes foram corados pelo método de hematoxilina-eosina e a seguir, observados em microscópio de luz (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA 1983).

3.2.3. OBTENÇÃO DE SANGUE

3.2.3.1. SUÍNO EXPERIMENTALMENTE INFECTADO

As amostras periódicas de sangue do suíno inoculado foram obtidas por punção da veia cava (aproximadamente 10 ml), colocando-se a amostra em tubo o qual foi transportado em caixa térmica ao Laboratório de Protozoologia do IMT da USP, onde foi separado o soro que foi estocado em frascos a -20°C até sua análise.

3.2.3.2. SUÍNOS ABATIDOS

As amostras de sangue foram obtidas no momento do abate dos suínos, colocando-os em caixa térmica contendo gelo para sua conservação e logo transportadas ao Laboratório de Protozoologia do IMT da USP para serem submetidas à centrifugação para separação do soro e logo acondicionadas e conservadas a -20°C até o momento das análises.

3.2.4. OBTENÇÃO DO SORO POSITIVO E NEGATIVO

O soro padrão positivo foi obtido a partir da infecção experimental do suíno mantido no hospital veterinário da USP, infectado com 10^7 formas de taquizoítos da cepa RH, recebendo ração comercial seca. Entretanto o soro padrão negativo utilizado, foi gentilmente doado pelo departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Londrina-Paraná.

3.2.5. ANTÍGENOS PARA O TESTE DE ELISA

O exsudato peritoneal de animais inoculados primeiramente com 10^6 parasitas da estirpe RH foi obtido no 6º dia do inóculo com lavagem do peritônio com cinco ml de PBS contendo antibióticos (gentamicina e penicilina).

O lavado foi passado por agulha fina e centrifugado. A seguir, o sobrenadante foi centrifugado a 10000 g por três min e o “pellet” observado sob microscópio de contraste de fase, determinando o número de taquizoítos e a proporção de células íntegras do hospedeiro. Se a proporção de células fosse maior que uma célula para 100 taquizoítos, o “pellet” era ressuspensionado no volume original de PBS e aplicado a uma coluna de Sephadex G50 previamente estabilizado com PBS a 37°C.

Após passagem na coluna, o eluato foi centrifugado e novamente determinado a relação taquizoíto/células. Somente preparações com menos de uma célula/100 parasitas foram utilizadas nos passos subsequentes.

Os parasitas foram submetidos a sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc., USA), a quatro ciclos por cinco a dez períodos de 30 segundos em banho de gelo, até produzir-se a lise completa dos agentes. Em seguida, foi acrescentada solução de NaCl 0,3M para isotonzar a suspensão, e após, foi submetido a centrifugação a 10.000 g por 30 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403. A proteína total foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se gama-globulina humana como padrão. As alíquotas foram mantidas a -70°C, até o momento do uso segundo MINEO e col. (1980).

3.2.6. TESTES SOROLÓGICOS

Os testes sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose foram os de hemaglutinação passiva, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e para determinar a avidéz de anticorpos usou-se também a reação imunoenzimática (ELISA) pelo método de dissociação do complexo antígeno-anticorpo (princípio da eluição) utilizando-se a uréia como agente caotrópico.

3.2.6.1. TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA

Para este teste usou-se o “kit” comercial Salk HAP-Toxoplasmose, que é um teste de hemaglutinação indireta para detectar anticorpos contra **Toxoplasma gondii** em amostras de sangue. É um teste “in vitro”, simples, rápido, que dispensa aparelhos especiais para sua realização; a prova foi de natureza qualitativa, segundo o procedimento seguinte:

Em tubos previamente identificados foram feitas as diluições de 1:20; 10 µl de soro controle positivo em 190 µl de diluente do soro, as mesmas diluições foram preparadas com o soro controle negativo e as amostras de soro dos suínos. Logo, na placa de microtitulação com poços em “V” dispensou-se em cada poço 20 µl de cada uma das diluições referidas, adicionando-se a seguir 20 µl de hemácias Toxo (homogeneizadas) em cada uma das cavidades. Depois, agitou-se a placa manualmente, batendo com os dedos nos cantos da placa por 30 segundos, deixando-se a placa logo em repouso durante uma hora e efetuando-se a seguir a leitura.

A reação positiva ocorreu pela aglutinação das hemácias caracterizada pela formação de uma rede ou malha semitransparente que tende a cobrir a totalidade do fundo das cavidades. As amostras positivas na diluição 1:20 foram consideradas amostras reativas, ou seja, indicativa de que o animal foi exposto ao parasita. Na reação negativa não ocorreu aglutinação das

hemácias; estas, depositam-se no fundo da cavidade, formando um botão escuro, nítido, bem uniforme e sem halo reagente. A amostra negativa na diluição 1:20 foi considerada amostra não reativa, ou seja, indicativa de que o animal não foi exposto ao parasita.

3.2.6.2. TESTE DE ELISA

O teste de ELISA foi realizado como preconizado por VENKATESAN e WAKELIN (1993). O procedimento foi o seguinte:

As placas foram sensibilizadas com proteínas de *Toxoplasma gondii* diluídas em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5, na concentração de 10 µg de antígeno por cavidade. Este tampão tem a função de expor as proteínas maneira uniforme. As placas foram sensibilizadas colocando-se 100 µl da solução por 20 horas à 4°C em câmara úmida, a seguir foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,02% de Tween 20(PBST) por cinco minutos e bloqueadas com solução protéica (PBS-Tween + leite 3%) durante uma hora em estufa à 37°C. Depois, lavou-se novamente com PBSTL duas vezes, colocando-se logo depois 100 µl por poço do soro diluído 1:100 em PBSTL e agitou-se, incubação na estufa 37°C por uma hora; três lavagens com PBSTL e a seguir aplicação de 100 µl por poço de conjugado anti-IgG de suíno, conjugado a peroxidase, diluído 1:10000 em PBSTL e novamente incubação por uma hora à 37°C.

Após cinco lavagens com PBST-Tween 0,02%, foi efetuada revelação da reação pela adição de solução de citrato de sódio 0,05 M pH 5,8, contendo OPD 0,4 mg/ml e H₂O₂ 0,03% em câmara escura e interrompida após 30 minutos pela adição de HCl 4N. A seguir procedeu-se a leitura das densidades ópticas (D.O.) em leitor automático de microplacas a 492 nm (Labsystems Multiskan MS), medida mediante a absorbância.

3.2.6.3. TESTE DA AVIDEZ

Com a finalidade de distinguir infecções recentes das antigas, foi determinada a avidéz do anticorpo IgG. A detecção de baixa avidéz de IgG indica infecções recentes, sendo utilizada para identificar grávidas que estão com risco de transmissão congênita aos seus filhos (SOUZA 1996).

A determinação da avidéz de IgG foi realizada pela reação de ELISA, utilizando-se uma lavagem adicional de Uréia 6M por cinco minutos entre os passos de incubação com soro teste e conjugado, com lavagem com PBST nos poços, utilizando-se poços não lavados como controle.

O índice de avidéz (I.A.) calculou-se utilizando a equação:

$$I.A = \frac{\Delta DO \text{ com uréia}}{\Delta DO \text{ sem uréia}} \times 100$$

onde ΔDO é a diferença de densidades ópticas, calculada pela subtração da absorbância da cavidade com antígeno, daquela obtida com o controle.

3.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes sorológicos estão expressos em forma de percentual, tendo em consideração os soros reagentes aos diferentes testes sorológicos. Além disso, aplicou-se o coeficiente de concordância Kappa para medir a concordância entre os diferentes testes (COHEN 1960; NORMAN e STREINER 1996); também realizou-se a Prova de Mc Nemar para comparação de duas amostras relacionadas (SIEGEL 1975); da mesma forma calculou-se a co-positividade e co-negatividade. Para comparar as frequências de suínos positivos à toxoplasmose segundo os dois lugares de procedência, aplicou-se o teste de duas proporções, pela distribuição normal

e para provar a associação do sexo com a infecção toxoplásmica foi efetuada o teste de duas proporções pela aproximação normal e o teste de Qui quadrado e, para comparar as médias dos índices de avidéz dos suínos brasileiros e peruanos aplicou-se a análise de variância (DANIEL 1996), prévia transformação das densidades ópticas em seus respectivos logaritmos de base dez.

4. RESULTADOS

4.1. EXAME HISTOPATOLÓGICO

Os resultados dos exames histopatológicos, tanto dos músculos, como dos cérebros e olhos amostrados foram negativos para todos os suínos.

4.2. SOROLOGIA

Os animais considerados no presente estudo estiveram constituídos por 396 suínos provenientes de matadouros dos municípios de Carapicuíba - Brasil e Lima – Peru. Inicialmente somente foram considerados os animais brasileiros; no entanto, com a finalidade de pesquisar a situação da toxoplasmose suína no Peru, decidiu-se agregar os suínos peruanos.

No processo de amostragem, foram obtidos 310 amostras de sangue de suínos brasileiros e 96 peruanos, mas, por problemas no transporte e conservação foram perdidas as amostras de sete suínos brasileiros e três peruanos.

Dos 310 animais abatidos no Brasil, foram examinadas 303, dos quais 97 machos e 206 fêmeas, com quatro a cinco meses de idade e peso médio de 90 quilos (peso ao abate). O outro grupo de animais, foi constituído por 93 suínos abatidos no Peru, 39 machos e 54 fêmeas, com idade e peso médio semelhantes aos dos suínos brasileiros (TABELA 1).

TABELA 1. Distribuição dos suínos analisados procedentes de matadouros do Brasil e do Peru, 1997.

PROCEDÊNCIA	MACHOS	FÊMEAS	TOTAL
Brasil	97	206	303
Peru	39	54	93
TOTAL	136	260	396

Na TABELA 2, são apresentadas as frequências de suínos abatidos no Brasil e avaliados através dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta (HI) para **Toxoplasma gondii**. Houve 29 reagentes ao teste de ELISA (9,57%) e 51 (16,83%) para a hemaglutinação indireta.

Os valores apresentados nessa Tabela correspondem a estimativa por ponto das frequências de suínos reagentes, no entanto, a estimativa por intervalo com 95% de confiança usando-se a aproximação normal, forneceu os seguintes valores: de 6,26% a 12,88% para o teste de ELISA e de 12,62% a 21,04% para hemaglutinação indireta respectivamente; esses valores mostram que a diferença observada é devida ao acaso; não existindo diferença significativa e são apresentados abaixo da tabela.

TABELA 2. Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Brasil segundo resultado dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.

RESULTADO	ELISA		HI	
	Frequência	%	Frequência	%
Reagente	29	9,57	51	16,83
Não reagente	274	90,43	252	83,17
TOTAL	303	100,00	303	100,00

$IC_{0,95}: [6,26\% \leq \pi \leq 12,88\%]$

$IC_{0,95}: [12,62\% \leq \pi \leq 21,04\%]$

Na TABELA 3, observam-se que 31 suínos abatidos no Peru (33,33%) foram reagentes para o teste de ELISA, com um intervalo de confiança (95%) de 23,75% a 42,91%; entretanto para o teste de hemaglutinação indireta 49 (52,69%) foram reagentes à toxoplasmose, com um intervalo de confiança (95%) de 42,54% a 62,84%.

Pode-se observar que o teste de ELISA detectou menor porcentagem de animais reagentes que o de hemaglutinação indireta, no entanto, através dos intervalos de confiança para os resultados dos dois testes, constata-se a inexistência de diferença significativa.

TABELA 3. Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Peru segundo resultado dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.

RESULTADO	ELISA		HI	
	Frequência	%	Frequência	%
Reagente	31	33,33	49	52,69
Não reagente	62	66,67	44	47,31
TOTAL	93	100,00	93	100,00

$IC_{0,95} : [23,75\% \leq \pi \leq 42,91\%]$

$IC_{0,95} : [42,54\% \leq \pi \leq 62,84\%]$

A análise dos resultados do teste ELISA segundo o sexo, os animais abatidos no Brasil (TABELA 4), revelam dez machos (10,31%) e 19 fêmeas (9,22%) reagentes para a toxoplasmose; o intervalo de confiança para a diferença de proporções segundo sexo (95%) é de $-0,06$ e $0,08$, valores que indicam inexistência de diferença estatística, fato que é corroborado ao testar-se a diferença de duas proporções mediante aproximação à distribuição normal e pela prova de Qui quadrado ($P > 0,05$).

TABELA 4. Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Brasil, segundo sexo e resultado do teste de ELISA para toxoplasmose, 1997.

RESULTADO	MACHOS		FÊMEAS	
	Frequência	%	Frequência	%
Reagente	10	10,31	19	9,22
Não reagente	87	89,69	187	90,78
TOTAL	97	100,00	206	100,00

$$IC_{0,95} : [-0,06 \leq \pi_1 - \pi_2 \leq 0,08]$$

$$Z = 0,30 \text{ (} P > 0,05 \text{)}$$

$$\chi^2_{(1)} = 0,09 \text{ (} P > 0,05 \text{)}$$

A TABELA 5, apresenta os resultados da avaliação sorológica mediante o teste de hemaglutinação indireta para toxoplasmose em suínos abatidos no Brasil, observando-se 17 (17,53%) machos e 34 (16,50%) fêmeas reagentes, com um intervalo de confiança para a diferença das proporções de $-0,08$ a $0,10$, que mostra que a diferença observada é devida ao acaso o que foi confirmado pelos testes para duas proporções e Qui quadrado ($P > 0,05$).

TABELA 5. Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Brasil, segundo sexo e resultado do teste de hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.

RESULTADO	MACHOS		FÊMEAS	
	Frequência	%	Frequência	%
Reagente	17	17,53	34	16,50
Não reagente	80	82,47	172	83,50
TOTAL	97	100,00	206	100,00

$$IC_{0,95}: [-0,08 \leq \pi_1 - \pi_2 \leq 0,10]$$

$$Z = 0,22 \text{ (} P > 0,05 \text{)}$$

$$X^2_{(1)} = 0,05 \text{ (} P > 0,05 \text{)}$$

As TABELAS 6 e 7 apresentam respectivamente os resultados dos testes de ELISA e de hemaglutinação indireta aplicados ao diagnóstico da toxoplasmose em suínos abatidos no Peru. Mediante a reação imunoenzimática houve 10 machos (25,64%) e 21 fêmeas (38,89%) reagentes, com intervalo de confiança (95%) para a diferença de proporções de - 0,33 a 0,06, mostrando ser esta diferença devida ao acaso, o que concorda com os testes para duas proporções mediante a aproximação normal à distribuição binomial e de Qui quadrado ($P > 0,05$).

TABELA 6. Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Peru, segundo sexo e resultado do teste de ELISA para toxoplasmose, 1997.

RESULTADO	MACHOS		FÊMEAS	
	Frequência	%	Frequência	%
Reagente	10	25,64	21	38,89
Não reagente	29	74,36	33	61,11
TOTAL	39	100,00	54	100,00

$$IC_{0,95}: [-0,33 \leq \pi_1 - \pi_2 \leq 0,06]$$

$$Z = -1,34 \text{ (} P > 0,05 \text{)}$$

$$X^2_{(1)} = 1,79 \text{ (} P > 0,05 \text{)}$$

Através da hemaglutinação indireta houve 17 machos (43,59%) e 32 fêmeas (59,26%), reagentes para **Toxoplasma gondii**, com intervalo de confiança (95%) para a diferença de proporções de – 0,36 a 0,05, esta diferença não é significativa e foi confirmada pelos testes de diferença de proporções e Qui quadrado ($P > 0,05$).

TABELA 7. Distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Peru, segundo sexo e resultado do teste de hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.

RESULTADO	MACHOS		FÊMEAS	
	Frequência	%	Frequência	%
Reagente	17	43,59	32	59,26
Não reagente	22	56,41	22	40,74
TOTAL	39	100,00	54	100,00

$$IC_{0,95}: [-0,36 \leq \pi_1 - \pi_2 \leq 0,05]$$

$$Z = -1,49 \text{ (} P > 0,05 \text{)}$$

$$\chi^2_{(1)} = 2,23 \text{ (} P > 0,05 \text{)}$$

A TABELA 8 apresenta as frequências de suínos reagentes à toxoplasmose procedentes do Brasil e Peru, através do teste de ELISA, observando-se 31 (33,33%) suínos peruanos reagentes e 29 (9,57%) suínos brasileiros reagentes, com intervalo de confiança (95%) para a diferença de proporções de 0,1543 a 0,3209, valores que revelam diferença significativa, confirmados pelos testes para duas proporções mediante a aproximação à distribuição normal e de Qui quadrado ($P < 0.001$).

TABELA 8. Comparação da distribuição dos suínos abatidos em matadouros do Peru e do Brasil, segundo resultado do teste de ELISA para toxoplasmose, 1997.

RESULTADO DO ELISA	PERU		BRASIL	
	Frequência	%	Frequência	%
Reagente	31	33,33	29	9,57
Não reagente	62	66,67	274	90,43
TOTAL	93	100,00	303	100,00

$$IC_{0,95} : [0,1543 \leq \pi_1 - \pi_2 \leq 0,3209]$$

$$Z = 5,59 \text{ (} P < 0,001 \text{)}$$

$$X^2_{(1)} = 31,25 \text{ (} P < 0,001 \text{)}$$

A TABELA 9 apresenta os suínos reagentes ao teste de hemaglutinação indireta segundo procedência; observando-se 49 (52,69%) suínos reagentes abatidos no Peru e 51 (16,83%) suínos reagentes abatidos no Brasil, com intervalo de confiança (95%) para a diferença de proporções de 0,2577 a 0,4595; mostrando alta significância estatística, corroborada pelos testes para diferença de proporções e de Qui quadrado ($P < 0,001$).

TABELA 9. Comparação da distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Peru e do Brasil, segundo resultado do teste de hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.

RESULTADO DA HI	PERU		BRASIL	
	Frequência	%	Frequência	%
Reagente	49	52,69	51	16,83
Não reagente	44	47,31	252	83,17
TOTAL	93	100,00	303	100,00

$$IC_{0,95}: [0,2577 \leq \pi_1 - \pi_2 \leq 0,4595]$$

$$Z = 6,96 \text{ (} P < 0,001 \text{)}$$

$$X^2_{(1)} = 48,47 \text{ (} P < 0,001 \text{)}$$

Avaliadas as diversas combinações de variáveis, e com a finalidade de se avaliar a concordância dos resultados entre as provas de ELISA e hemaglutinação indireta, constituiu-se a TABELA 10, onde estão considerados os resultados segundo reação dos soros de suínos aos respectivos testes, observando-se 251 (82,84%) resultados concordantes, e 52 (17,16%) foram discordantes. Porém, estes valores expressam concordância incluindo aqueles resultados devido ao acaso, por isso, para medir a concordância além do acaso, calculou-se o coeficiente de concordância Kappa, encontrando-se uma concordância de 25,97% com intervalo de confiança (95%) de 7,66% a 44,28%, mostrando significância

estatística ($P < 0,05$). O teste X^2 de Mc Nemar calculado mostrou alta significância ($P < 0,01$), concluindo que há diferença entre as proporções de diagnósticos para toxoplasmose segundo o teste sorológico empregado. Igualmente, utilizando o teste de ELISA como teste de referência, calculou-se a co-positividade e co-negatividade do teste de hemaglutinação indireta, determinando-se em 48,28% e 86,50% respectivamente.

TABELA 10. Comparação da distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Brasil segundo os resultados dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.

HI	ELISA		TOTAL
	Reagente	Não reagente	
Reagente	14	37	51
Não reagente	15	237	252
TOTAL	29	274	303

$IC_{0,95} : [7,66 \leq K \leq 44,28]$

$K = 25,97$

$Z = 2,48$ $K_{\text{significante}} \text{ (} P < 0,05 \text{)}$ $X_{2 \text{ Mc}} = 8,48$ $(P < 0,01)$

Co-positividade (HI) = 48,28%

Co-negatividade (HI) = 86,50%

Em relação aos suínos peruanos, a TABELA 11 mostra 25 suínos positivos aos dois testes, enquanto 38 negativos a ambos os testes, com concordância de 67,74%, no entanto, o coeficiente de concordância Kappa foi 36,62%, com intervalo de confiança (95%) de 17,97 a 55,29, mostrando alta significância estatística ($P < 0,01$) e o X^2 de Mc Nemar mostrou alta significância ($P < 0,01$), concluindo que há diferença nas proporções de diagnóstico para toxoplasmose segundo teste sorológico empregado. Considerando o ELISA como teste de referência, a hemaglutinação mostrou co-positividade de 80,74% e co-negatividade de 61,29%.

TABELA 11. Comparação da distribuição dos suínos abatidos em matadouro do Peru, segundo os resultados dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta para toxoplasmose, 1997.

HI	ELISA		TOTAL
	Reagente	Não reagente	
Reagente	25	24	49
Não reagente	6	38	44
TOTAL	31	62	93

IC _{0,95} : [17,97 ≤ K ≤ 55,29]		Co-positividade (HI) = 80,64%	
K = 36,62		Co-negatividade (HI) = 61,29%	
Z = 3,60	K _{significante} (P < 0,01)	X _{2 Mc} = 9,63	(P < 0,01)

4.23. RESPOSTA IMUNITÁRIA DO SUÍNO INFECTADO COM *Toxoplasma gondii*

Os resultados da evolução dos anticorpos IgG do suíno experimentalmente infectado com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* são apresentados na TABELA 12 e na FIGURA 1.

TABLA 12 Evolução das densidades ópticas e avides dos anticorpos IgG do suíno experimentalmente infectado com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* mediante o teste de ELISA, São Paulo, 1997.

Dias pós Inoculação	DO (su)	DO (cu)	Avides (%)
60	0,171	0,055	32,16
80	0,263	0,113	42,97
100	0,455	0,301	66,15
120	0,516	0,318	61,63
140	0,585	0,434	74,19

DO : densidade óptica
 su : sem uréia
 cu : com uréia

FIGURA 1 Evolução das densidades ópticas dos anticorpos IgG do suíno experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii*

Pode-se observar que o suíno infectado apresentou progressivo aumento nos níveis de anticorpos IgG contra *Toxoplasma gondii*, fenômeno que é mais relevante a partir dos 80 dias pós inoculação, evidenciando uma resposta de tipo secundária.

Em relação a avidez de anticorpos IgG contra *Toxoplasma gondii* no suíno experimentalmente infectado, observa-se na FIGURA 2 que ela aumenta com o decorrer do tempo após inoculação.

4.4. AVIDEZ DOS ANTICORPOS NOS SUÍNOS NATURALMENTE INFECTADOS

Com relação à avidez nos suínos abatidos em matadouros, constata-se que os suínos brasileiros apresentaram índice de avidez médio (26,71%) menor que os peruanos (74,83%), como mostrado na TABELAS 13 e 14 e na FIGURA 3.

FIGURA 2 Evolução dos anticorpos IgG do suíno experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii*

A estimativa por intervalo de confiança (95%) forneceu os seguintes valores: de 17,79% a 36,07% para os do Brasil e de 68,25% a 82,04% para os suínos peruanos respectivamente, mostrando esses valores diferença entre os valores médios. Fato que foi corroborado pela análise de variância realizada ($P < 0,01$), efetuada depois da transformação das densidades ópticas em seus respectivos logaritmos (TABELA 15)

TABELA 13. Índices de avidéz (%) dos suínos reagentes ao teste de ELISA
segundo procedência e sexo, 1997.

BRASIL	SEXO *	PERU	SEXO *
20,44	M	82,80	F
18,65	F	70,95	M
13,74	F	69,52	M
5,59	M	77,13	F
16,81	F	63,66	F
16,26	F	53,53	M
19,12	F	70,39	M
6,58	M	86,40	F
100,00	F	100,00	F
57,37	M	76,64	F
48,34	M	69,63	F
69,22	F	96,93	F
6,24	F	92,33	F
42,71	F	89,09	F
100,00	F	88,21	F
61,76	F	100,00	F
27,78	F	87,15	F
40,27	F	41,96	F
39,70	F	42,21	M
41,26	F	100,00	M
41,77	M	71,43	F
66,98	F	84,88	M
55,26	M	92,15	M
24,85	M	74,77	F
22,09	F	87,01	F
25,95	F	46,54	F
17,79	F	41,85	F
20,16	M	83,31	M
5,17	M	96,70	M
		88,30	F
		64,57	F

* M = Macho

F = Fêmea

TABELA 14. Medidas de resumo dos índices de avidez dos suínos procedentes do Brasil e do Peru, 1997.

PROCEDÊNCIA	n	Amplitude	Média	Intervalo de confiança 95%
Brasil	29	5,17 – 100	26,71	$19,79 \leq \mu \leq 36,07$
Peru	31	41,85 – 100	74,83	$68,25 \leq \mu \leq 82,04$

TABELA 15. Análise de variância para os índices de avidez (log) dos suínos brasileiros e peruanos, 1997.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	Q.M	F	$F_{1,58, \alpha = 0.005}$
Tratamentos	1	3,0409	3,0409	44,72	8,49 **
Resíduo	58	3,9417	0,0680		
Total	59	6,9826			

FIGURA 3 Médias dos índices de avidéz (log) dos suínos brasileiros e peruanos, 1997

5. DISCUSSÃO

5.1. HISTOPATOLOGIA

Os testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da toxoplasmose indicam que os animais estiveram em contato com o **Toxoplasma gondii**, mas não confirmam a presença do parasita, deste modo, optou-se pela pesquisa do agente nos órgãos dos suínos. De fato, DUBEY (1986) demonstrou que nos suínos o **Toxoplasma gondii** distribui-se praticamente em todos tecidos animais. Por outro lado, KANEKO e col. (1967) relataram que o toxoplasma pode ser encontrado através de exames histopatológicos. Nesse contexto, com a finalidade de se investigar a presença de toxoplasmas em órgãos dos suínos, foram examinadas amostras de músculo diafragma, cérebro e olhos. A escolha destes órgãos é devido ao fato de que o diafragma figura entre os tecidos mais parasitados no suíno (VITOR 1991), o cérebro é de localização muito comum e a retina constitui material de eleição para testes diagnósticos (MAYER e BOEHRINGER, 1967). FARRELL e col. (1952), RUIZ (1966) e DUBEY e URBAN (1990), confirmaram a presença de toxoplasmas em suínos, tanto através dos cortes histológicos como também pelo isolamento por inoculação de tecidos infectados em camundongos; no entanto foram JACOBS e MELTON (1957) que isolaram **Toxoplasma gondii** do diafragma de suínos clinicamente sadios. No Brasil, SILVA (1959) e MONICI e RIBEIRO (1960) relataram o encontro de **Toxoplasma gondii** em exames histológicos dos tecidos de suínos naturalmente infectados.

Neste estudo, observa-se que todos os exames histopatológicos de 30 suínos apresentaram resultados negativos. De fato, SCHLÖGEL (1967)

refere que a visualização dos pseudocistos exige acurada investigação microscópica, pois usualmente estão dispersos e em pequeno número, não havendo inclusive contraste de coloração com outros elementos constituintes da preparação. Além disso, não é fato isolado este acontecimento, pois, o exame direto negativo nas amostras de diafragma, é concordante com JACOBS e col. (1960) e WENDE e DIENST (1961), que não encontraram os parasitas nos órgãos dos animais examinados. No Brasil, SCHENK e col. (1977), não encontraram **Toxoplasma gondii** em amostras de diafragma de suínos examinados através do exame a fresco ou de esfregaços corados pela solução de Giemsa. Outros autores encontraram toxoplasmas em diafragma, mas em frequências baixas; assim, GROGL e col. (1979) encontraram o **Toxoplasma gondii** em 3,75% dos 80 diafragmas de suínos examinados; AMARAL e MACRUZ (1968) em 4% das amostras de diafragma. Os demais estudos sobre diafragma foram feitos mediante isolamento de **Toxoplasma gondii** a partir de inoculação em camundongos: MARBELLA (1983) isolou o parasita em 1,74% dos diafragmas originários de suínos positivos a sorologia; HAGIWARA e KATSUBE (1981) isolaram o parasita de 2,1% dos diafragmas examinados, FERNANDES e BARBOSA (1972) e SCHENK e col. (1977) em 5% de diafragmas; POP e col. (1989) acharam em 9,01% dos diafragmas de suínos; RUIZ (1966), OMATA e col. (1993) e OMATA e col. (1994) reportaram 12%, 13,5% e 12,8% respectivamente; entretanto há relatos muito superiores aos nossos, como 26,3% (AMARAL e MACRUZ 1968); 29% (DURFEE e col. 1974), até 73,3% de CATÁR e col. (1969). Por outro lado, DUBEY e col. (1984) inocularam toxoplasmas em suínos e somente isolaram parasitas em metade dos animais.

Em relação ao cérebro os resultados do presente trabalho, discordam dos relatos de SCHENK e col. (1977), que encontraram 7,1% e de WENDE e DIENST (1961) e de CATÁR e col. (1969), que encontraram 35% e 43,3% respectivamente. De fato, ACHA e SZYFRES (1986), referem que o cérebro

é um refúgio dos cistos devido a estar protegido contra anticorpos; no entanto estas discordâncias podem ser atribuídas a metodologia, pois as citações referidas apoiaram-se em isolamentos, e no presente estudo foi feita apenas a observação direta em cortes histológicos e também deve ser considerada a quantidade de tecido examinado.

A ausência de resultados positivos nos exames dos globos oculares de 30 suínos concorda com FERNANDES e BARBOSA (1972) que igualmente não conseguiram nenhum resultado positivo ao exame de 69 olhos de bovinos; no entanto, MAYER e BOEHRINGER (1967) isolaram toxoplasmas em 10,92% das retinas de suínos, assim como de 18,25 % e 7,61% de globos oculares de bovinos e ovinos respectivamente. Conclui-se portanto que a confirmação da toxoplasmose mediante exames histopatológicos em cortes de tecidos é um método pouco sensível e seria conveniente a utilização inoculação de tecidos em camundongos

5.2. SOROLOGIA

5.2.1. TESTE DE ELISA E DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA

Analisando-se a TABELA 1, percebe-se que o tamanho da amostra de suínos brasileiros (303) foi superior ao mínimo determinado pela aproximação normal à distribuição normal (255). Por outro lado, no matadouro não foi possível o conhecimento a priori do número de animais que seriam abatidos nem a frequência de animais segundo sexo, fatores que não permitiram estratificar a amostra segundo esta variável; no entanto, o número grande de suínos machos e fêmeas na amostra permitiu fazer as comparações das suas frequências.

Os resultados dos testes sorológicos dos suínos brasileiros (TABELA 2) foram: ELISA 9,57% de reagentes e hemaglutinação indireta 16,83% de

reagentes. Os intervalos de confiança apresentados na tabela indicam a ausência de diferença significativa entre as frequências.

A frequência de animais reagentes obtida através da prova imunoenzimática está próxima do encontrado por GARCIA e col. (1993) na cidade de México (8,9%), no entanto, discorda de HIRVELÄ-KOSKI (1992) na Finlândia (2,5%), ZIMMERMAN e col. (1990) nos Estados Unidos de América do Norte (6%); BARTOSZCZE e col. (1991) na Polônia (36,4%) de CHANG e col. (1991) na China (47,11%). Estas diferenças podem ser atribuídas às condições climáticas e às práticas de manejo adotadas.

A frequência de reagentes para a toxoplasmose segundo a hemaglutinação indireta (16,83%), concorda com DURFEE e col. (1974) nos Estados Unidos de América do Norte (19%); MANUEL e TUBONGBANUA (1977) e MANUEL (1981) em Manila (19,62% e 19,1% respectivamente); HUGH-JONES e col. (1986) nos Estados Unidos de América do Norte (19,19%) e de ARAMBULO e col. (1974) nas Filipinas (19,4%). No entanto, discorda de CHHABRA e col. (1985) e NENE e col. (1986), ambos na Índia (23,74% e 26,6% respectivamente) e, no Brasil, ISHIZUKA e col. (1986) 42,1% e D'ANGELINO e ISHIZUKA (1986b) que encontraram 42,7% e 46,6%, para suínos de criação intensiva e semi-intensiva.

Os resultados sorológicos dos suínos peruanos apresentados na TABELA 3, revelam 33,33% de reagentes ao teste de ELISA e 52,69% ao teste de hemaglutinação indireta; no entanto, os intervalos de confiança (95%) de $23,75\% \leq \Pi \leq 42,91\%$ e $42,54\% \leq \Pi \leq 62,84\%$ respectivamente, indicam a ausência de significância. Referindo-nos ao teste de ELISA observa-se que o valor encontrado (33,33%) é concordante com o 36,4% de BARTOSZCZE e col. (1991) na Polônia; sendo sem dúvida superior ao 2,5% de HIRVELÄ-KOSKI (1992) na Finlândia; 6% de ZIMMERMAN e col. (1990) nos Estados Unidos de América do Norte; 8,9% de GARCIA e col. (1993) no México e

menor que o 47,11% encontrado por CHANG e col. (1991) na China. Entretanto o resultado pela hemaglutinação indireta concorda com o 42,7% e 46,6% de D'ANGELINO e ISHIZUKA (1986) no Brasil; 45,64% de MANUEL e col. (1974) em Manila e 60% de VÁSQUEZ (1986) no Peru e é superior que 7,2% encontrado por SILVA e col. (1981) no Brasil; 14,4% de Mc ILMWAIN e FARGO (1969) e 19% de DURFEE e col. (1974) ambos nos Estados Unidos de América do Norte; 19,1% de MANUEL (1981) em Manila e 19,2% de HUGH-JONES e col. (1986) nos Estados Unidos de América do Norte

As TABELAS de 4 a 7, apresentam os resultados dos testes de ELISA e hemaglutinação indireta dos suínos brasileiros e peruanos segundo sexo. Observa-se que nos suínos brasileiros examinados pelo teste de ELISA houve 10,31% e 9,22% de reagentes respectivamente entre os machos e as fêmeas, enquanto que pelo teste de hemaglutinação indireta as frequências de reagentes foram de 17,53% e 16,50% respectivamente. No caso dos suínos peruanos, ao teste de ELISA houve 25,64% de reagentes entre os machos e 38,89% entre as fêmeas e pelo teste de hemaglutinação indireta 43,59% e 59,26% de reagentes entre os machos e as fêmeas respectivamente. Os intervalos de confiança indicam a ausência de diferença estatística entre as frequências segundo sexo que é corroborada pelos testes de diferença de proporções pela aproximação normal à binomial e o teste de X^2 ($P > 0,05$). Os resultados do presente estudo indicam ausência de associação entre os suínos reagentes ao **Toxoplasma gondii** e o sexo, e concordam com as observações em suínos de FOLKERS e KUIL (1964) no Suriname; VASCONCELOS e col. (1979) no Brasil, MONTOYA e col. (1981) na Colômbia e MANUEL (1981) nas Filipinas; igualmente em outras espécies o sexo não está associado à toxoplasmose, tal como referem OLIVEIRA-SEQUEIRA e col. (1993) em ovinos do Brasil; LOZANO e col. (1986) na Espanha e GERMANO et al. (1985) no Brasil, ambos em cães; discordando somente de FOLKERS e PERIÉ (1963) na

Holanda que acharam diferença segundo sexo em suínos com 71% de afetados nas fêmeas e 55% nos machos.

É conveniente esclarecer que a comparação de resultados apresentados por diferentes tipos de testes sorológicos não é uma conduta adequada, pois não há padronização dos antígenos e não há uniformidade nas diluições que podem empregar diferentes pontos de corte para classificar resultados positivos e negativos. Estes fatores podem influir nos resultados e portanto, na avaliação epidemiológica da toxoplasmose (ISHIZUKA e col. 1986), por isso, é recomendável que cada reação sorológica empregue um antígeno estável e padronizado, a fim de proporcionar reações que possam ser comparáveis.

Por outro lado, para cada tipo de teste podem ser aventadas vantagens; assim, os pesquisadores que recomendam hemaglutinação indireta, exaltam sua praticidade ao compará-la com a imunofluorescência, pois dispensa o uso do microscópio de fluorescência. Já o teste de ELISA apresenta as vantagens de poder ser aplicado em grande quantidade em períodos curtos de tempo e ser muito confiável. Além disto, deve-se considerar que desde o início da aplicação do teste de ELISA para o diagnóstico de toxoplasmose por BOUT e col. (1975) e VOLLER e col. (1976) houve grande progresso e aprimoramento desta metodologia, tanto para o diagnóstico da toxoplasmose como também de outras parasitoses.

As TABELAS 8 e 9, apresentam os resultados dos testes de ELISA e de hemaglutinação indireta segundo procedência dos suínos, e observa-se que ao teste de ELISA 33,33% dos suínos peruanos foram reagentes contra 9,57% para os suínos brasileiros; por outro lado, para a hemaglutinação indireta 52,69% e 16,83% dos suínos reagiram positivamente segundo procedência do Peru e Brasil respectivamente. A análise dos intervalos de confiança, pode-se observar que existe diferença altamente significativa de

resultados reagentes segundo a origem dos animais, confirmando as hipóteses de variação da frequência de infecção segundo as diferentes regiões. Mas, estes achados sugerem que no Peru os suínos têm maior risco de adquirir a doença. As diferenças observadas neste estudo, são corroboradas pelos testes para diferença de proporções e X^2 que mostram alta significância ($P < 0,001$); no entanto, deve ser salientado que o número de suínos peruanos foi inferior ao tamanho de amostra calculado o que limita o estabelecimento de maiores comparações. No entanto, esta situação deve alertar às autoridades peruanas, pois houve uma grande proporção de suínos destinados ao consumo humano reatores para **Toxoplasma gondii**, o que sugere um risco potencial de transmissão desta zoonose para seres humanos.

Quando se aplicam dois ou mais tipos de exames para o diagnóstico de uma determinada doença em um mesmo grupo de animais, dificilmente são obtidos resultados idênticos, pois, cada procedimento apresenta sensibilidade, especificidade e outras características próprias e é o que aconteceu com os resultados do teste de ELISA e hemaglutinação indireta empregados no presente trabalho.

Na TABELA 10, observa-se que em relação aos suínos brasileiros houve 29 animais reagindo positivamente ao teste de ELISA, dos quais 15 foram negativos à hemaglutinação e dos 274 negativos ao ELISA, 37 foram positivos à hemaglutinação; pela mesma análise pode-se observar que 14 animais reagiram positivamente a ambos os testes e 237 foram negativos aos dois testes, isto é, 251 animais tiveram resultados concordantes para ambos os testes o que significa uma concordância de 82,84%; no entanto, deve-se considerar que essa concordância pode incluir valores casuais que estariam sobre-estimando a concordância real, deste modo para a obtenção uma medida mais real, foi calculado o coeficiente Kappa que só considera a concordância não casual; assim observa-se que o coeficiente

Kappa entre o teste de ELISA e hemaglutinação indireta foi de 25,97% com um intervalo de confiança de 95% entre 7,66% e 44,28% e com significância estatística ($P < 0,05$), mostrando a existência de uma concordância moderada. Esta concordância é menor do que a citada por ISHIZUKA e col. (1986) de 69,2% quando utilizaram os testes de hemaglutinação e imunofluorescência para diagnóstico da toxoplasmose. Ao aplicar-se a prova de Mc Nemar, observa-se que há alta significância, indicando que as proporções de diagnósticos positivos para toxoplasmose são diferentes para ambos os testes sorológicos empregados. Por outro lado, adotando-se o ELISA como teste de referência, o teste de hemaglutinação apresentou uma co-positividade de 48,28% e co-negatividade de 86,50%, que é devida à presença de maior quantidade de falsos negativos, o que corrobora o achado de CARLIER e col. (1980); mostrando que a hemaglutinação é um teste mais específico do que sensível. A determinação da co-positividade e co-negatividade é utilizada quando não se conhece a verdadeira prevalência, então a validação de um determinado teste é julgada medindo-se a sua associação com um outro teste de referência (BUCK e GART 1966).

Em relação aos resultados dos soros de suínos peruanos apresentados na TABELA 11, observar-se que a concordância incluindo os valores casuais foi de 67,74%, menor daquela obtida com os suínos brasileiros; no entanto, ao se eliminar a concordância casual é obtida uma concordância superior, com coeficiente Kappa de 36,62% e intervalo de confiança (95%) de 17,97% a 55,29% e alta significância estatística ($P < 0,01$). Ao se aplicar a prova de Mc Nemar, observa-se alta significância, indicando diferença das proporções de diagnóstico para toxoplasmose segundo teste sorológico empregado. Igualmente os valores de co-positividade e co-negatividade da hemaglutinação considerando o teste de ELISA como de referência foram de 80,64% e 61,29% respectivamente, por tanto, uma maior sensibilidade do que especificidade.

Nesse contexto pode-se observar que ao se comparar as concordâncias sem ajuste (considerando a concordância ao acaso) dos resultados dos soros de suínos brasileiros, com os obtidos por ISHIZUKA e col., em 1986 que encontraram coeficiente Kappa de 84,2%, observa-se uma semelhança, mas é inferior ao coeficiente Kappa de 96,4% encontrada por ISHIZUKA (1978a); no entanto, para os soros de suínos peruanos, a concordância obtida foi inferior a concordância por estes autores. Igualmente, as concordâncias ajustadas (eliminando aquela devida ao acaso), dos testes efetuados com os suínos brasileiros e peruanos foram inferiores ao reportado por ISHIZUKA e col. (1986) que foi de 69,2% (Kappa); mas deve-se esclarecer que estas concordâncias correspondem a comparação entre o teste de imunofluorescência e de hemaglutinação indireta e como já foi mencionado pelo fato do teste de ELISA de apresentar maior sensibilidade e especificidade, a concordância teria que ser menor. Além disto, cumpre salientar que DUBEY e col. (1996) inoculando baixa quantidade de **Toxoplasma gondii** em suínos, verificaram que o ELISA foi mais sensível que a hemaglutinação indireta, evento já relatado por HIRVELÄ-KOSKI (1990).

Salienta-se contudo que a maior parte das validações de testes aplicados ao diagnóstico da toxoplasmose adotou a prova de Sabin-Feldman como teste de referência; assim, WALTMAN e col. (1984) verificaram que a prova de ELISA estava diretamente correlacionada com os resultados do teste de Sabin-Feldman e que a hemaglutinação indireta estava correlacionada com a prova de imunofluorescência indireta, mas em menor grau que o ELISA e imunofluorescência indireta; a concordância da prova de Sabin-Feldman e hemaglutinação foi de 87%, enquanto que entre Sabin-Feldman e ELISA foi de 92%, o que demonstra que o ELISA é superior a hemaglutinação indireta e a imunofluorescência indireta para diagnóstico da toxoplasmose em suínos.

5.2.2 TESTE DE AVIDEZ

Nos suínos, o teste de avides de anticorpos IgG pode ser utilizado com diversos objetivos: determinação do comportamento da resposta humoral em animais; como método de diagnóstico diferencial de infecção recente e passada e, para avaliação de vacinas usando-se uma única amostra de soro, considerando que na atualidade se está tentando produzi-la.

Com o intuito de se conhecer o comportamento da resposta humoral dos suínos, um animal livre de toxoplasmose foi inoculado com taquizoítos de **Toxoplasma gondii** e posteriormente foram colhidas amostras de sangue em diferentes períodos, de modo a propiciar o seguimento dos níveis de anticorpos IgG e o cálculo da respectiva avides; os resultados obtidos são apresentados na TABELA 12 e na FIGURA 1, a análise destes elementos revela a conduta esperada das imunoglobulinas, com aumento progressivo da avides durante o transcorrer do tempo pós infecção, com maior intensidade a partir dos 80 dias da infecção.

A avides observada no suíno experimentalmente infectado foi maior do que a encontrada na população naturalmente infectada. Isto, possivelmente ocorreu devido à alta dose empregada para a indução da infecção experimental (10^7 formas viáveis de taquizoítos da cepa RH de **Toxoplasma gondii**), pois o suíno é uma espécie altamente susceptível; assim, VIDOTTO e col. (1987) afirmaram que as reações de suínos experimentalmente infectados são influenciadas pela concentração e pela estirpe do inóculo; saliente-se também que D'ANGELINO e ISHIZUKA (1986a) utilizaram apenas a metade da dose empregada no presente trabalho e conseguiram uma disseminação mais rápida no organismo animal, produzindo-se resposta humoral mais precoce, havendo inclusive morte de um suíno no quarto dia pós inoculação, talvez esta diferença

possa ser atribuída as características de virulência da estirpe de **Toxoplasma gondii** empregada.

Com estas considerações, os dados da avidéz referentes ao suíno experimentalmente infectado, não podem ser comparados aos obtidos dos suínos naturalmente infectados; mas, a sua utilidade é significativa para a padronização do ensaio, pois permite a análise da evolução da resposta imunitária e confirma a mudança sequencial na afinidade dos anticorpos IgG durante a infecção (EISEN e SISKIND, 1964). De fato, verifica-se a substituição de anticorpos de baixa afinidade por anticorpos de alta afinidade com o decorrer do tempo (NOSSAL, 1992). Segundo HIDAKA e col. (1994) a imunização primária ocorre com elevação lenta de anticorpos, no entanto a resposta secundária é mais rápida o que pode ser observado com os anticorpos IgG do suíno experimentalmente infectado, isto é, com um rápido incremento de anticorpos a partir dos 80 dias pós infecção.

O emprego do ensaio da avidéz dos anticorpos IgG como método diferencial da toxoplasmose aguda apresenta dois tipos de marcadores sorológicos de muito valor: a significativa ascensão dos títulos de anticorpos da classe IgG e a presença de imunoglobulinas da classe IgM, evidenciada através da reação de imunofluorescência indireta (CAMARGO e FERREIRA 1989); no entanto, pela imunofluorescência podem ocorrer resultados falsos positivos devido a presença de anticorpos antinucleares ou fator reumatóide (CAMARGO e col. 1972). Além disso, a positividade para anticorpos IgM, não diferencia a imunidade primária de reinfeção, pois esta classe de imunoglobulina já foi detectada em casos de sarampo com falhas vacinais secundárias (ERDMAN e col. 1993). Esses problemas podem ser evitados com o emprego de testes imunoenzimáticos, os quais não sofrem estas interferências, mas, pela sua alta sensibilidade, detectam anticorpos IgM por períodos mais longos, embora isto prejudique sua função como marcador de infecção recente (CAMARGO e col. 1991).

Do exposto conclui-se que os ensaios da avidéz de anticorpos IgG possam ser um novo procedimento destinado a distinguir infecções recentes das passadas. Nas infecções recentes a maioria dos anticorpos mostra baixa avidéz e no transcorrer do tempo (semanas ou meses) esses anticorpos incrementam sua avidéz; assim, em infecções de longa duração, predominam os anticorpos de alta avidéz. Esta técnica já foi empregada com êxito no diagnóstico da toxoplasmose nos seres humanos (HEDMAN e col. 1989; CAMARGO e col. 1991; LAPPALAINEN e col. 1993) e de outras doenças como rubéola (THOMAS e MORGAN-CAPNER, 1988) e sarampo (SOUZA 1996).

No presente estudo no grupo de suínos naturalmente infectados foi efetuada o ensaio da avidéz de anticorpos IgG anti-toxoplasma mediante a prova de ELISA, utilizando-se a técnica de eluição e empregando-se a uréia como agente caotrópico. Esta técnica foi escolhida devido ao êxito obtido por HEDMAN e col. (1989); CAMARGO e col. (1991) e LAPPALAINEN e col. (1993) como método de diagnóstico da toxoplasmose em seres humanos. A utilização da uréia 6M como agente caotrópico deu bons resultados, no diagnóstico da toxoplasmose, obtendo-se uma sensibilidade de 100% e especificidade de 75% (HOLLIMAN e col., 1994). A afinidade de anticorpos IgG anti-**Toxoplasma gondii** assume importância para determinação do tempo de infecção, podendo ser utilizada como apoio ao diagnóstico da infecção recente (BAHIA e col. 1995).

A avidéz média obtida para os animais peruanos (74,83%), foi significativamente superior verificada com os animais brasileiros (26,71%), o que pode ser consequência do tipo de manejo adotado para a criação dos animais. De fato, no Peru há uma grande quantidade de granjas não tecnificadas, nas quais os animais são alimentados com resíduos de restaurantes e sem cuidados sanitários, fatos que aumentam o risco da

infecção pelo **Toxoplasma gondii** em animais jovens, que se reflete em infecções mais antigas nos suínos quando atinguem o peso ao abate; ainda mais, na atualidade devido aos problemas econômicos existentes no Peru, tem aumentado o número de criações mistas (aves e suínos), nas quais têm sido estimuladas a introdução de gatos destinados ao controle de roedores que poderiam estar introduzindo a toxoplasmose nas propriedades.

Por outro lado, no Brasil, os suínos abatidos em matadouros com Inspeção Federal, são usualmente originários de granjas que apresentam melhores condições sanitárias que se refletem na diminuição da toxoplasmose nos últimos anos, pois anteriormente houve frequências da ordem de 42,7% e 46,6% (D'ANGELINO e ISHIZUKA 1986b) na cidade de São Paulo . É preciso esclarecer que a diferença entre as médias dos índices de avidéz dos anticorpos dos suínos peruanos e brasileiros foi testada através da análise de variância, mas para isso, foram feitas as transformações dos índices de avidéz em seus respectivos logaritmos de base dez, pois a afinidade dos anticorpos frequentemente segue uma distribuição não normal.

O ponto de corte do índice de baixa avidéz para toxoplasmose ainda não foi estabelecido nos suínos, no entanto o valor 30% tem sido adotado em diversas doenças, HEDMANN e ROUSSEAU (1989) para a rubéola, JOYNSON e col. (1990) para a toxoplasmose e SOUZA (1996) empregou 29% para sarampo. Se no presente estudo fosse utilizado como ponto de corte, nenhum dos suínos peruanos padeceriam de toxoplasmose aguda, enquanto que 55% dos brasileiros teriam infecção aguda; mas isto, devido aos elevados valores dos índices de avidéz achados nos suínos, que talvez não reflitam a realidade, já que o ponto de corte estabelecido para discriminar doenças agudas e crônicas varia segundo a forma utilizada para o cálculo do índice representativo, o tempo de exposição à uréia e o número de lavagens (BAHIA e col. 1995, SOUZA 1996); assim, para a

toxoplasmose humana LAPPALAINEN e col. (1993) adotou o ponto de corte de baixo índice de avidéz em 50%.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo foram obtidas as seguintes conclusões:

1. A histopatologia não foi capaz de evidenciar presença de **Toxoplasma gondii** em suínos.
2. Em suínos naturalmente infectados pelo **Toxoplasma gondii**, os testes sorológicos de ELISA e de Hemaglutinação Indireta apresentaram diferenças nas características de sensibilidade e especificidade com significado estatístico.
3. Os suínos peruanos apresentaram resultados ao teste de avidéz de anticorpos IgG para **Toxoplasma gondii** mais elevados que os encontrados para os suínos brasileiros
4. Nos suínos, a avidéz das imunoglobulinas anti-toxoplasma aumentou com o decorrer do tempo pós infecção.
5. Os suínos peruanos abatidos no matadouro do município de Lima no período de janeiro a fevereiro de 1997, apresentaram maior frequência de reatores à toxoplasmose, para ELISA e hemaglutinação indireta, do que os suínos brasileiros abatidos no matadouro do município de Carapicuíba no mesmo período.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Cellular and molecular immunology**. 2a ed. Philadelphia: WB Saunders; 1994.

Acha PN, Szyfres B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales** 2ª ed. Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud; 1986. (OPAS-Publicación Científica, 503).

Amaral V, Macruz R. Pesquisa de formas encistadas do **Toxoplasma gondii** em diafragmas de suínos clinicamente sadios, abatidos em matadouros de São Paulo - Capital. **Ciênc Cult** 1968; 20: 308.

Amaral V, Macruz R. **Toxoplasma gondii**: isolamento de amostras a partir de diafragmas de suínos clinicamente sadios, abatidos em matadouros de São Paulo-Brasil. **Arq Inst Biol São Paulo** 1969; 36: 47-54.

Amato Neto V. Toxoplasmose: aspectos clínicos, diagnósticos, terapêuticos e profiláticos. **Rev Paul Med** 1971; 77:151-6.

Amato Neto V, Campos R, Baruzz RG, Duarte MIS. **Toxoplasmose**. São Paulo: Sarvier; 1982 (Série "Clínica Médica").

Amato Neto V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS. **Toxoplasmose**. 2a ed. São Paulo: Sarvier; 1995.

* Segundo a Guia de Apresentação de Teses da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Apt W, Niedmann G, Pasmanic S, Thierman E. **Toxoplasmosis**. Santiago de Chile: Universidad de Chile; 1973.

Arambulo P V., Cabrera BD, Alge MH. Serological survey of toxoplasmosis in pigs in the Philippines. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 1974; 5: 9-11.

Araujo FG. Anticorpos anti-**Toxoplasma gondii** em doadores de sangue. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1970; 12: 105-11.

Avicultura Profesional. Avicultura en América del Sur y su inserción en el mercado mundial. **Avicult Profes** 1996; 14: 12-5.

Bahia MT, Vitor RWA, Caldas RP, Antunes CMF, Chiari CA. A avidéz de anticorpos específicos anti-toxoplasma da classe IgG e sua utilização na diferenciação entre toxoplasmose recente e crônica em caprinos. **Braz J Vet Anim Sci** 1995; 32:11-6.

Bartoszcze M, Krupa K, Roszkowski J. ELISA for assessing **Toxoplasma gondii** antibodies in pigs. **Zentralbl Veterinarmed B** 1991; 38:263-4.

Behymer RD, Harlow DR, Behymer DE, Franti C. Serologic diagnosis of toxoplasmosis and prevalence of **Toxoplasma gondii** antibodies in selected feline, canine and human population. **JAVMA** 1973; 162: 959-63.

Berends BR, Smeets JMF, Harbers AHM, Van Knapen F, Snijders JMA. Investigations with enzyme-linked immunosorbent assays for **Trichinella spiralis** and **Toxoplasma gondii** in the Dutch "Integrated quality control for finishing pigs" research project. **Vet Q** 1991; 13: 190-8.

Beverley JKA, Beattie CP, Roseman C. Human toxoplasma infection. **J Hyg** 1954; 52: 37-46.

Beverley JKA. Toxoplasmosis. **Br Med J** 1973; 2:475-8.

Blackburn NK, Besselaar TG, Schoub BD, O'Connell KF. Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. **J Med Virol** 1991; 33: 6-9.

Bout DJC, Dugimont JC, Farag H, Capron A. Le diagnostic immunoenzymologique dans affections parasitaires. Immunoenzymologie quantitative (ELISA). **Lille Med** 1975; 20: 561-6.

Boyden SV. The adsorption of protein on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. **J Exp Med** 1951; 93:107-20.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 72: 248-52.

Buck A A,e Gart J J. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. **Am J Parasitol** 1966; 83: 586-592.

Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1964; 6: 117-8.

Camargo ME, Leser PG, Rocca ^a Rheumatoid factors as a cause for the false positive IgM antitoxoplasma fluorescence tests. A technique for specific results. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1972; 14: 310-3.

Camargo ME, Ferreira AW. O laboratório no diagnóstico da toxoplasmose. **Laes-Haes** 1989; 61:44-56.

Camargo ME, Silva SM, Leser PG, Granato CH. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de Infecção primária recente pelo **Toxoplasma gondii** **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1991; 33: 213-8.

Carlier Y, Bout D, Dessaint JP, Capron A, Van Knapen F, Ruitenberg EJ et al. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological tests for the diagnosis of toxoplasmosis. **Bull World Health Organ** 1980; 58: 99-105.

Catár G, Berendi L, Holkova R.. Isolation of **Toxoplasma gondii** from swine and cattle. **J.Parasitol** 1969; 55: 952-5.

Chang G, Tsai S, Kuo M, Dubey JP. Epidemiology of swine toxoplasmosis in Taiwan. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 1991; 22 Suppl: 111-4.

Chargelegue D, O'Toole CM, Clovin BT. A longitudinal study of the IgG antibody response to HIV-1 p17 gag protein in HIV-1⁺ patients with haemophilia: titre and avidity. **Clin Exp Immunol** 1993; 93: 331-6.

Chargelegue D, Stanley CM, O'Toole CM, Colvin BT, Steward MW. The affinity of IgG antibodies to gag p24 and p17 in HIV-1-infected patients correlates with disease progression. **Clin Exp Immunol** 1995; 99: 175-81.

Chhabra MB, Mahajan RC. Ocurrance of **Toxoplasma gondii** in slaughter pigs in India. **Trop Geogr Med** 1979; 31: 123-6.

Chhabra M B, Gupta SL, Gautam OP. Toxoplasma seroprevalence in animals in northern India. **Int J Zoon** 1985; 12: 136-142.

Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educ Psychol Measur** 1960; 20: 37-46.

Corrêa MOA, Hyakutake S, Tognoli JF. Incidência de reagentes à prova de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da toxoplasmose entre escolares do município de Presidente Prudente. **Rev Inst Adolfo Lutz** 1972; 32: 41-6.

Coutinho E. **Tratado de clínica das doenças infectuosas, parasitárias e peçonhentas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1957.

D'Angelino JL. **Toxoplasmose suína: contribuição para o estudo epidemiológico**. São Paulo; 1983 [Tese de Doutorado.- Faculdade de Saúde Pública da USP].

D'Angelino JL, Ishizuka MM. Toxoplasmose suína. 1. Inoculação experimental com taquizoítos de **Toxoplasma gondii** por via intraperitoneal. Evolução de anticorpos revelados pelas provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. **Bol Oficina Sanit Panam** 1986a; 100: 400-9.

D'Angelino JL, Ishizuka MM. Toxoplasmose suína. 3. Avaliação da prevalência de infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pela prova de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. **Bol Oficina Sanit Panam** 1986b; 100: 634-45.

Daniel WW. **Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud**. México DF: Limusa; 1996.

Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis: A prospective study of 378 pregnancies. **N Eng J Med** 1974; 290: 1110-6.

Devey ME, Bleasdale K, Lee S, Rath S. Determination of the functional affinity of IgG1 and IgG4 antibodies to tetanus toxoid by isotype-specific solid-phase assays. **J Immunol Methods** 1988; 106: 119-125.

Dubey JP, Murrell KD, Fayer R. Persistence of encysted **Toxoplasma gondii** in tissues of pigs fed oocysts. **Am J Vet Res** 1984; 45: 1941-3.

Dubey JP. A review toxoplasmosis in pigs. **Vet Parasitol** 1986; 19: 181-223.

Dubey JP, Urban JF. Diagnosis of transplacentally induced toxoplasmosis in pigs. **Am J Vet Res** 1990; 51: 1295-9.

Dubey JP, Urban JF, Davis SW. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of **Toxoplasma gondii**. **Am J Vet Res** 1991; 52: 1316-69.

Dubey JP, Andrews CD, Lind P, Kwok OCH, Thulliez P, Lunney K.. Antibody responses measured by various serologic tests in pigs orally inoculated with low numbers of the **Toxoplasma gondii** oocysts. **Am J Vet Res** 1996; 57: 1733-7.

Durfee PT, Chien J. Transmission of **Toxoplasma gondii** to cats via ingestion of infected pork. **JAVMA** 1971; 159: 1783-8

Durfee PT, Ma CH, Wang CF, Cross JH. Infectivity and pathogenicity of toxoplasma oocysts for swine **J Parasitol** 1974; 60:886-7.

Eisen HN, Siskind GW Variations in affinities of antibodies during the immune response. **Biochemistry** 1964; 3: 996-1008.

Elsaid MMA, Bahia MT, Machado-Coelho GL, Vitor RWA. Diagnosis of human toxoplasmosis by a dot enzyme-linked immunosorbent assay. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1995; 37: 117-22.

Erdman DD, Heath JL, watson JC, Markowitz LE, Bellini WJ. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. **J Med Virol** 1993; 41: 44-8.

Farrell RL, Docton FL, Chamberlain DM, Cole CR. Toxoplasmosis. I. Toxoplasma isolated from swine. **Am J Vet Res** 1952; 13: 181-5.

Feldman HÁ, Miller LT. Serological study of toxoplasmosis prevalence. **Am J Hyg** 1956; 64: 320-35.

Fernandes WJ, Barbosa W. Toxoplasmose – notas sobre sua ocorrência em animais domésticos em Goiânia – (1970). **Rev Pat Trop** 1972; 1: 259-65.

Folkers C, Kuil H. The prevalence of antibodies against toxoplasma in pigs in Suriname, Dutch Guiana. **Am Trop Med Parasitol** 1964; 58:3-5.

Folkers C, Perié NM. The prevalence of antibodies against **Toxoplasma gondii** in slaughter-pigs in the Netherlands. **Trop Geogr Med** 1963; 15: 268-70.

Frenkel JK, dubey JP, Miller NL. **Toxoplasma gondii** in cats: fecal stages identified as Coccidian oocysts. **Science** 1970; 167: 893-6.

Frenkel JK. Toxoplasmosis: mechanisms of infection, laboratory diagnosis and management. **Curr Top Pathol** 1971; 54: 29-75.

Frenkel J K. Toxoplasmosis in and around us. **Bioscience** 1973; 23:343-52.

Freyre A, Colombo AS, D'Angelo JM, Falcón J. Prevalencia de la infección toxoplásmica en cerdos en el Uruguay y su significación zoonótica. **Avanc Cienc Vet** 1991; 6: 166-71.

Fukuda C. La producción porcina en el Perú y el rol del cerdo como alternativa de producción de carne. In **Anales de la 12a Reunión Científica Anual APPA**; 1989 oct. 23-27; Lima, Perú. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM; 1989, p.1-25.

Gandahusada S. Serological study for antibodies to **Toxoplasma gondi** in Jakarta, Indonesia. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 1978; 9: 308-11.

Garcia Z, rosario CR, Diaz GG, Hernández BO. Seroprevalence of **Toxoplasma gondii** infection in cattle, swine and goats in four Mexican states. **Prev Vet Med** 1993; 17:127-32

Gascon J. Sero-epidemiología de la toxoplasmosis en dos comunidades de Rwanda (Africa Central). **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1989; 31:399-402.

Germano PML, Erbolato EB, Ishizuka MM. Estudo sorológico da toxoplasmose canina, pela prova de imunofluorescência indireta, na cidade de Campinas, 1981. **Rev Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo** 1985; 22: 53-8.

Germano PML. Toxoplasmose. **Comp Infect** 1995; 11:15-22.

Goldblatt D, Van Etten L, Van Milligen FJ, Aalberse RC, Turner MW. The role of pH in modified ELISA procedures used for the estimation of functional antibody affinity. **J Immunol Meth** 1993; 166: 281-5.

Gomes MCO. Epidemiologia da toxoplasmose. Investigação em profissionais do distrito sede do município de Sorocaba. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1970; 12: 266-71.

Gray JJ, Cohen BJ, Desselberger U. Detection of human parvovirus B19-specific IgM and IgG antibodies using a recombinant viral VP1 antigen expressed in insect cells and estimation of time on infection by testing for antibody avidity. **J Virol Methods** 1993; 44: 11-24.

Grogl M, Marinkelle CJ, Alvarado R, Sánchez N, Guhl F. El cerdo como fuente potencial de toxoplasmosis e isosporosis humana en Colombia. **Antioq Med** 1979; 28: 14-6.

Hagiwara T, Katsube Y. Detection of toxoplasma infection in pork by Sabin-Feldman's Dye Test with meat extract. **Jpn J Vet Sci** 1981; 43: 763-5.

Hedman K, Seppaia I. Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J Clin Immunol** 1988; 8:214-21.

Hedman K, Lappalainen M, Seppaia I, Makela O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J Infec Dis** 1989; 159:36-740.

Hedman K, Rousseau SA. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. **J Med Virol** 1989; 27:288-92.

Hidaka Y, Aoki T, Akeda H, Miyazaki C, Ueda L. Serological and clinical characteristics of measles vaccine failure in Japan. **Scand J Infec Dis** 1994; 26: 725-30.

Hirvelä-Koski V. Evaluation of ELISA for the detection of toxoplasma antibodies in swine sera. **Acta Vet Scand** 1990; 31: 413-22.

Hirvelä-Koski V. The prevalence of toxoplasma antibodies in swine sera in Finland. **Acta Vet Scan** 1992; 33:21-25.

Holliman RE, Raymond R, renton N, Johnson JD. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidemiol Infect** 1994; 112: 399-408.

Hoare CA. The developmental stages of toxoplasma. **J Trop Med Hyg** 1972; 75(3): 56-8.

Hugh-Jones ME, Broussard JJ, Stewart TB, Raby C, Morison JE. Prevalence of toxoplasma antibodies in southern Louisiana swine. **Int J Zoon** 1986; 13: 25-31.

Hunter B. Isolated spontaneous toxoplasma abortion in young sow. **Can Vet J** 1979; 20:116.

Hutchison WM. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature** 1965; 206: 961-2.

Hutchison WM. The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1967; 61:80-9.

Hutchison WM, Dunachie JF, ork K. The faecal transmission of *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1968; 74: 462-4.

Industria Avícola. El supermercado de la agricultura brasileña. **Ind Avic** 1993; 40: 24-6.

Inouye S, Hasegawa A, Matsuno S, Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections; detection by an immunosorbent assay in wich a mild protein-denaturing agent is employed. **J Clin Microbiol** 1984; 20: 525-9.

Ishii A, Noboru Y, Kawai Y. Indirect hemagglutination test for toxoplasma infection in pigs and men on Amami Oshima Island, Southern Japan. **Jpn J Exp Med** 1972 42: 81-3.

Ishizuka MM, Miguel O, Brogliato. Estudo comparativo das provas de Sabin-Feldman (SF) e imunofluorescência indireta (IFI) com a de hemaglutinação (HA) para a avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros de cães. **Rev Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo**, 1974; 11:133-8.

Ishizuka MM. 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 São Paulo** 1978a; 15: 45-9.

Ishizuka MM. Avaliação da frequência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta (anti IgG) em magarefes. **Rev Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo** 1978b; 15:155-8.

Ishizuka MM, D'Angelino JL, Souza JMP. Toxoplasmose suína. 2. Estudo comparativo das provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, para a avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros suínos. **Bol Oficina Sanit Panam** 1986; 100:524-30.

Jacobs L, Lunde MN. A hemagglutination test for toxoplasmosis. **J Parasitol** 1957; 43: 308-14.

Jacobs L, Melton ML. A procedure for testing meat samples for toxoplasma, with preliminary results of a survey of pork and beef samples. **J Parasitol** 1957; 43 Suppl: 38.

Jacobs L, Remington JS, Melton ML. A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted toxoplasma. **J Parasitol** 1960; 46:23-8.

Jacobs L. New knowledge of toxoplasma and toxoplasmosis. **Adv Parasitol** 1973; 11: 631-59.

Jamra LF, Deane MP, Guimarães EC. On isolation of *Toxoplasma gondii* from human food of animal. Partial results in the city São Paulo (Brasil). **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1969; 11:169-76.

Jones MA, Hunter DH. *Toxoplasma* infection in a newborn piglet. **Vet Rec** 1979; 104:529.

Jones SR. Toxoplasmosis: A review. **JAVMA**, 1973; 163:1038-42.

Joynson DH, Payne RA, Rawal BK. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis **J Clin Pathol** 1990; 43: 1032-3.

Junker AK, TILLEY P. Varicella-zoster virus antibody avidity and IgG –subclass patterns in children with recurrent chickenpox. **J Med Virol** 1994; 43: 119-24.

Junqueira LCU, Junqueira LMS. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos; 1983.

Kawarabayashi M, Cerqueira RL, Castanho MLS, Kyakutake S. Levantamento sorológico para toxoplasmose na região do Baixo-Médio São Francisco, Estado da Bahia, Brasil. **Rev Inst Adolfo Lutz** 1980; 40:1-7.

Ko RC, Wong FWT, Todd D, Lam KC. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the Chinese population of Hong Kong. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1980; 74:351-4.

Krogstad DJ, Juranek DD, Walls KW. Toxoplasmosis, with comments on risk of infection from cats. **Ann Int Med** 1972; 77:773-8.

Lappalainen M, Keskela P, Kskiniemi M, Ammala P, Hilesmaa V, Teramo K et al. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. **J Infect Dis** 1993; 167:691-7.

Larsson C E. **Aspectos epidemiológicos da toxoplasmose**. São Paulo; 1976 [Dissertação Mestrado. Faculdade de Saúde Pública da USP].

Lehtonen OP, Meurman OH. An ELISA for the estimation of high-avidity and total specific IgG and IgM antibodies to rubella virus. **J Virol Methods** 1982; 5: 1-10.

Leighty JC. Strategies for control of toxoplasmosis. **JAVMA** 1990; 196: 281-6.

Lozano J, Campos BM, Mañas AI, Reyes M. Estudio seroepidemiológico de la toxoplasmosis canina en la provincia de Granada. **Rev Iber Parasitol** 1986; 46: 185-8.

Lutz E, Ward Kn, Gray JJ. Maturation of antibody avidity after primary human cytomegalovirus infection is delayed in immunosuppressed solid organ transplant patients. **J Med Virol** 1994; 44: 317-22.

Manuel MF, Mendoza CB, Navarro JA. A serological survey of the incidence of toxoplasmosis in swine. **Philipp J Vet Med** 1974; 13: 187-99.

Manuel MF, Tubongbanua R. A serological survey on the incidence of toxoplasmosis among slaughtered pigs in Metro Manila. **Philipp J Vet Med** 1977; 16: 9-19.

Manuel MF. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in swine in the Philippines. **Philipp J Vet Med** 1981; 20: 71-9.

Marbella CO. *Toxoplasma gondii* in swine: serological, histopathologic and isolation studies. **Philipp J Vet Med** 1983; 22: 75-86.

Martinez R, Machin R, Suárez M, Fachado E. Aspectos seroepidemiológicos de la toxoplasmosis en 2 municipios de la provincia de Ciego de Avila. Septiembre de 1985. **Rev Cub Med Trop** 1989; 41: 214-25.

Martinez R, Bacallao GR, Aberti AE, Alfonso BL Prevalencia de infección toxoplásmica en gestantes de la provincia La Habana. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1994; 36: 445-50.

Mayer HF, Boehringer IK. Nuevas comprobaciones sobre toxoplasmosis animal en la Argentina. **Rev Med Vet B Aires** 1967; 48:341-9.

McIlwain PK, Fargo ND. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic animals of North Dakota. **Arch Environ Health** 1969; 19:885-6.

McKinney HR A study of toxoplasma infections in cats as detected by the indirect fluorescent antibody method. **Vet Med Small Anim Clin** 1973; 68:493-5.

Miguel O. Técnicas de amostragem para exames laboratoriais. **Hig Alim** 1982, 1: 84-86.

Mineo JR, Camargo ME, Ferreira AW. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infect Immun** 1980; 27: 283-87.

Mond J, Kim YT, Siskind GW. Studies on the control of antibody synthesis. V. Effect of nonspecific modification of the magnitude of the immune response on the affinity of the antibody synthesized. **J Immunol** 1974; 112: 1255-63.

Monici N, Ribeiro LOC. Constatação de toxoplasmose em suínos. **Biológico** 1960; 26: 210-9.

Montoya F, Ramírez L, Loaiza A, Henao J, Murillo G. Prevalencia de anticuerpos para **Toxoplasma gondii** en bovinos y porcinos. **Bol Oficina Sanit Panam** 1981; 91: 219-27.

Moreda-Vásquez A. Aportación al estudio de la epidemiología de la toxoplasmosis. **Rev Iber Parasitol** 1976; 36: 297-346.

Muccioli C, Belfort Jr, Lottenberg C, Abreu MT. Toxoplasmose ocular (TO) em pacientes infectados pelo HIV. **Rev Soc Bras Med Trop** 1995; 28 Suppl 1:244.

Nääs I. Productividade com ambiência. **Suinocult Amb** 1997; 97(129): 32-8.

Nene SS, Joshi BN, Patki J. Toxoplasma antibodies in local domestic animals. **Int J Zoon** 1986; 13(3): 187-189.

Nicolle C, Manceaux, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi (*Toxoplasma n. ge*). **C R Acad Sci** 1908; 147: 763-6.

Nobuto K Hanaki T, Koizumi T, Yonemochi K. Some aspects of natural infection of toxoplasmosis in pigs. **Natl Inst Anim Health Q** 1969; 9: 136-48.

Norman GR, S DL. **Bioestadística**. Madrid: Mosby/Doyma; 1996.

Nossal GJV. The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. **Cell** 1992; 68: 1-2.

Oliveira-Sequeira TCG, Amarante AFT, Salata E, Sogaar R. Serological survey for **Toxoplasma gondii** infection in sheep in São Paulo State, Brazil. **Vet Zoot São Paulo** 1993; 5: 121-5.

Olsen CW. Vaccination of cats against emerging and reemerging zoonotic pathogens. **Adv Vet Med** 1999; 41:333-46.

Omata Y, DiLorenzo C, Boren J, Venturini L. **Toxoplasma gondii**: Diagnóstico serológico y aislamiento en cerdos de consumo. **Vet Arg** 1993; 10(91): 12-15.

Omata Y, DiLorenzo C, Venturini C, Venturini L, Igarashi I, Saito A et al. Correlation between antibody levels in **Toxoplasma gondii** infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. **Vet Parasitol** 1994; 51: 205-210.

Pandey V S, Van Knapen F. The seroprevalence of toxoplasmosis in sheepgoats and pigs in Zimbabwe. **Ann Trop Med Parasitol** 1992; 86: 313-5.

Paradisi F, Bartolini A, Aquilini D, Roselli M, Nunez LE, Manzone G et al. Serological survey of toxoplasmosis in the Santa Cruz region of Bolivia. **Trans R Soc Med Hyg** 1989; 83: 213-4.

Pérez ER. Diagnósticos y perspectivas de la porcicultura en América Latina y el Caribe. **Mundo Porcino** 1993; 6(16):15-22.

Perez-Rendon GJ, Moren MT, Becerra C, Martínez CMS. Seroprevalencia de la toxoplasmosis humana en Córdoba. **Rev Sanid Hig Pública Madr** 1992; 66: 83-91.

Pessôa SB, Martins AV **Parasitología Médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1974.

Piekarski G. **Tratado de parasitología**. Madrid: Aguilar; 1959.

Pop A, Oprisan A, Pop A, Cerbu A, Stavarace M, Nitu R. Toxoplasmosis prevalence parasitologically evaluated in meat animals. **Arch Roum Pathol Exp Microbiol** 1989; 48:373-8.

Pullen GR, Fitzgerald MG, Hosking CS. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. **J Immunol Methods** 1986; 86: 83-7.

Pyndiah N, Krech U, Price P, Wilhelm J. Simplified chromatographic separation of immunoglobulin M from G and its application to toxoplasma indirect immunofluorescence. **J Clin Microbiol** 1979; 9:170-4.

Quinn PJ, McGraw BM. Current status of toxoplasma and toxoplasmosis: a review. **Can Vet J** 1972; 13: 247-262.

Radkowski M, Laskus T, Goch A, Slusarczyk J. Affinity of anti-gp41 antibody in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. **Eu J Clin Invest** 1993; 23: 455-8.

Radkowski M, Roger S, Zarnowska H, Cholewinska G, Olszynska M, Dziubek Z et al. Antibody avidity in diagnosis of toxoplasmosis. **Pol Tyg Lek** 1996; 51: 336-7.

Riemann HP, Brant PC, Franti CE, Reis R, Buchanan AM, Strmont C et al. Antibodies to **Toxoplasma gondii** and **Coxiella burnetii** among students and other personnel in veterinary colleges in California and Brazil. **Am J Epidemiol** 1974; 100: 197-208.

Roberts T. Microbial pathogens in raw pork, chicken and beef: benefit estimates for control using irradiation. **Am J Agric Econ Assoc** 1985; 67: 957-65.

Roever-Bonnet H, Lelyveld J, Marinkelle e col. Toxoplasmosis in Latin-american countries. **Trop Geog Med** 1969; 21:451-5.

Roitt MI. **Imunologia**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu; 1995.

Roitt MI. **Inmunología**. 4ª ed. Madrid: Harcourt Brace; 1997.

Romero T, Bermúdez M, Dosil PG, Montiel M, Ruiz A. Estudio comparativo entre los métodos de hemaglutinación indirecta e inmunoanálisis enzimática en el diagnóstico de la toxoplasmosis. **Kasmera** 1995; 23: 69-88.

Ruiz A. Isolation of **Toxoplasma gondii** from swine in Costa Rica. **Ann Trop Med Parasitol** 1966; 60: 429-31.

Sato U, Hanaki T, Nobuto K. Hemagglutination teste for porcine toxoplasmosis with T.S.C. antigen. **J Jpn Vet Med Assoc** 1962; 15: 273-8.

Schenk MAM, Lima JD, Schenk JAP. Isolamento de **Toxoplasma gondii** em suínos do estado de Minas Gerais. **Arq Esc Vet UFMG** 1977; 29: 25-30.

Schlögel F. Ocorrência de toxoplasmose em cães suspeitos de raiva. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1967; 9: 304-8.

Sengbusch HG, Sengbusch LA. Toxoplasma antibody prevalence in veterinary personnel and a selected population not exposed to cats. **Am J Epidemiol** 1976; 103: 595-7.

Siegel S. **Estatística não-paramétrica**. São Paulo: McGraw-Hill; 1975.

Silva JML. Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos. **Arq Esc Sup Vet** 1959; 12:425-8.

Silva NRS, Chaplin EL, Mendez LDV, Araújo FAP. Determinação de anticorpos toxoplásmicos em soros de suínos obtidos em matadouros, na região do Alto Taquarí, RS, Brasil. **Arq Fac Vet UFRGS P Alegre** 1981; 9:33-8.

Simon E, Rahmy C, Krivine A, Levine M, Pepin JM, Lapierre D et al. Antibody avidity measurement and immune complex dissociation for serological diagnosis of vertically acquired HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr** 1993; 6: 201-97.

Soltys MA, Woo PTK. Immunological methods in diagnosis of protozoan diseases in man and domestic animals. **Z Tropenmed Parasitol** 1972; 27: 172-87.

Souza VAUF. **A avidéz de anticorpos IgG antisarampo e sua importância na avaliação da eficácia vacinal**. São Paulo; 1996 [Tese e Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da USP].

Stagno S, Thiernann E. Acquisition of toxoplasma infection by children in a developing country. **Bull World Health Organ** 1973; 49:627-31.

Steiner LA, Eisen HN. The relative affinity of antibodies synthesized in the secondary response. **J Exp Med** 1967; 126: 1185-205.

Tamayo R, Contreras MC, Ménez M, Castro M. Toxoplasmosis en cerdos beneficiados en las plantas faenadoras de Temuco y Valdivia, Chile. **Arch Med Vet** 1990; 22: 95-9.

Tarazón S. Estudio comparativo entre las reacciones de hemaglutinación, inmunofluorescencia y aglutinación en el diagnóstico de la toxoplasmosis. **Kasmera** 1980; 8:1-22.

Thomas HIJ e Morgan-Capner P. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. **Epidemiol Infect** 1988; 101: 591-8.

Thomas HIJ, Morgan-Capner P, Enders F, O'Shea S, Caldicott D, Best JM. Persistence of specific of IgM and low avidity specific IgG₁ following primary rubella. **J Virol Methods** 1992; 39: 149-55.

Thuler LCS. Correlação entre o diagnóstico e os achados de necrópsia em pacientes com neuro-AIDS. **Rev Soc Bras Med Trop** 1995; 28 Suppl 1:233.

Tokutomi G, Ikegami T. A survey of pork samples from retail meat shops for the presence of toxoplasma. **Jpn J Vet Sci** 1965; 27 Suppl: 346.

Tokutomi G, Ikegami, T, Ohtsuka Y. Recovery of *Toxoplasma gondii* from pork obtained from retail meat shops in Tokyo. **Bull Inst Public Health** 1980; 29: 45-8.

Tuokko H. Detection of acute measles infections by indirect and μ -capture enzyme immunoassays for immunoglobulin M antibodies and measles immunoglobulin G antibody avidity enzyme immunoassay. **J Med Virol** 1995; 45: 306-11.

Underwood PA. Measurement of the affinity of antiviral antibodies. **Advan Virus Res** 1988; 34: 283-309.

Valcavi PP, Natali A, Soliani L, Montali S, Dettori G, Cheezi C. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in the population of the area of Parma (Italy). **Eu J Epidemiol** 1995; 11: 333-7.

Vasconcelos OT, Costa AJ, Avila FA. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos. **Científica** 1979; (nº especial): 83-7.

Vásquez R. **Estudio serológico sobre toxoplasmosis en ganado porcino beneficiado en Lima-Perú.** Lima; 1986 [Tesis de Bachiller. Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM].

Vecchio TJ. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. **N Engl J Med** 1966; 274: 1171-73.

Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or Lies, Damned Lies and ELISAs. **Parasitol Today** 1993; 9:228-32.

Vidotto O, Costa AJ, Balarin MRS, Rocha MA. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. I. Observações clínicas e hematológicas. **Arq Bras Med Vet Zootec** 1987; 39:623-39.

Vidotto O, Costa AJ. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. II. Parasitemia e resposta imunitária humoral. **Arq Bras Med Vet Zootec** 1987; 39: 783-94.

Vitor RWA. Demonstração do *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos inoculados experimentalmente. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1991; 33 Supl: S20.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehim B. A microplate enzymeimmunoassay for toxoplasma antibody. **J Clin Pathol** 1976; 29: 150-3.

Waltman WD, Dreesen DW, Prickett MD, Blue JL, Olivr DC. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasmosis in swine: Interpreting assay results and comparing with other serologic tests. **Am J Vet Res** 1984; 45: 1719-25.

Walton BC, Arjona I, Benchoff M. Relationship of toxoplasma antibodies to altitude. **Am J Trop Med Hyg** 1966; 15: 492-95.

Wanke C, Tuazon CU, Kovacs A, Dina T, Davis DO, Barton N et al. Toxoplasma encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome: diagnosis and response to therapy. **Am J Trop Med Hyg** 1987; 36: 509-16.

Ward KN, Gray JJ. Primary human herpesvirus-6 infection is frequently overlooked as a cause of febrile fits in young children. **J Med Virol** 1994; 42: 119-223.

Ward KN, Dhaliwal W, Ashworth KL, Clutterbuck EJ, Teo CG. Measurement of antibody avidity for hepatitis C virus distinguishes primary antibody responses from passively acquired antibody. **J Med Virol** 1994; 43: 367-372.

Watson WA. Toxoplasmosis in human and veterinary medicine. **Vet Rec** 1972; 91: 254-8.

Weinman D, Chandler AH. Toxoplasmosis in man and swine. An investigation of the possible relationship. **JAMA** 1956; 161: 229-32.

Wen YM, Duan SC, Howard CR, Frew AF, Steward MW. The affinity of anti-HBc antibodies in acute and chronic hepatitis B infection. **Clin Exp Immunol** 1990; 79: 83-6.

Wende NM, Dienst RB. Endemic toxoplasmosis in isolated swine and cattle herds and its relationship to a human population. **Proc Soc Exp Biol Med** 1961; 106: 400-1.

Wilson CB, Remington MD, Stagno S, Reynolds MDI. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital toxoplasma infection. **Pediatrics** 1980; 66: 767-75.

Work K. Resistance of *Toxoplasma gondii* encysted in pork. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1968; 73: 85-92.

Work K, Ericksen L, Fennestad KL, Moller T, Siim JC. Experimental toxoplasmosis in pregnant sows. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1970; 78:129-39.

Yabiki T, Namioka S. Immunoglobulins in porcine umbilical cord blood and maternal placenta. **Am J Vet Res** 1976; 37: 535-40.

Zimmerman JJ, Dressen DW, Owen WJ, Berau GW. Prevalence of toxoplasmosis in swine from Iowa. **JAVMA** 1990; 196: 266-70.

ANEXOS

ANEXO 1 Algumas frequências de toxoplasmose suína diagnosticadas mediante a prova de ELISA

LUGAR	Frequência (%)	Autor e ano
USA	6,0	Zimmerman et al. 1990
Europa	36,4	Bartoszcze et al. 1991
Holanda	2,1	Berends et al. 1991
Taiwan	47,11	Chang et al. 1991
Finlândia	2,5	Hirvelä-Koski 1992
África	0,0	Pandey e VanKnapen 1992
África	10,0	Pandey e VanKnapen 1992
Mexico	8,9	Garcia et al. 1993

ANEXO 2 Algumas frequências de toxoplasmose suína diagnosticadas
mediante a prova de hemaglutinação indireta.

LUGAR	Frequência (%)	Autor e ano
Argentina	35,0	Mayer e Boehringer 1967
USA	14,4	McIlwain e Fargo 1969
Japão	35,0	Ishii et al. 1972
Filipinas	19,4	Arambulol et al. 1974
USA	19,0	Durfee et al. 1974
Manila	45,6	Manuel et al. 1974
Manila	25,4	Manuel e Tubongbanua 1977
Brasil	7,2	Silva et al. 1981
India	31,5	Chhabra e Mahajan 1979
Manila	19,1	Manuel 1981
Colômbia	30,0	Montoya et al. 1981
India	23,7	Chhabra et al. 1985
Brasil	42,7	D'Angelino e Ishizuka 1986b
Brasil	46,6	D'Angelino e Ishizuka 1986b
USA	19,2	Hugh-Jones e col. 1986
Brasil	42,1	Ishizuka et al. 1986
India	26,6	Nene et al. 1986
Peru	60,0	Vásquez 1986
Chile	30,1	Tamayo et al. 1990