

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

KAMILA DA CUNHA COVRE

**FREQUÊNCIA DE RESULTADOS POSITIVOS PARA *Toxoplasma gondii* EM
EXAMES SOROLÓGICOS REALIZADOS EM CÃES E GATOS NA REGIÃO
METROPOLITANA DE VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

VITÓRIA

2014

KAMILA DA CUNHA COVRE

**FREQUÊNCIA DE RESULTADOS POSITIVOS PARA *Toxoplasma gondii* EM
EXAMES SOROLÓGICOS REALIZADOS EM CÃES E GATOS NA REGIÃO
METROPOLITANA DE VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.
Orientador: Prof^a. Dra. Blima Fux

VITÓRIA
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C937f Covre, Kamila da Cunha, 1988-
Frequência de resultados positivos para *Toxoplasma gondii*
em exames sorológicos realizados em cães e gatos na Região
Metropolitana de Vitória, Espírito Santo, Brasil / Kamila da
Cunha Covre. – 2014.
68 f. : il.

Orientador: Blima Fux.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. *Toxoplasma*. 2. Estudos Soroepidemiológicos. 3. Cães. 4.
Gatos. 5. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 6. Técnica
Indireta de Fluorescência para Anticorpo. I. Fux, Blima. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda KAMILA DA CUNHA COVRE apresentou a dissertação intitulada “**Frequencia de resultados positivo para *Toxoplasma gondii* em exames sorológicos realizados em cães e gatos na região metropolitana de Vitória, Espírito Santo, Brasil**” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestra em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação, habilitando a farmacêutica KAMILA DA CUNHA COVRE o Grau de **MESTRA EM DOENÇAS INFECCIOSAS**.

Vitória, ES, 11 de abril de 2014

Ana Carolina Carneiro

Profa. Dra. Ana Carolina de Aguiar Vasconcelos Carneiro
(Membro Externo)

Crispim Cerutti Jr

Prof. Dr. Crispim Cerutti Júnior
(Membro Interno)

Blima Fux

Profa. Dra. Blima Fux
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Blima Fux, minha orientadora, pela confiança e ensinamentos na área da toxoplasmose. Obrigada por sempre transmitir otimismo nos momentos de aflição durante o mestrado.

Ao Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, responsável pelo Laboratório de Toxoplasmose da UFMG, pelo suporte à realização dos ensaios sorológicos e pronta disponibilidade em ajudar na elaboração deste trabalho.

À Rosálda Estevam Nazar Lopes, técnica do Laboratório de Toxoplasmose da UFMG, pela paciência e disposição ao me ensinar cada passo na execução das técnicas sorológicas e, principalmente, pela recepção amável em Belo Horizonte.

Ao Dr. Reynaldo Dietze e ao mestre Marco André Loureiro Tonini, por terem gentilmente cedido parte das amostras de cães utilizadas.

Aos veterinários dos CCZ de Vitória, Vila Velha, Serra e Cariacica; aos responsáveis pelos Abrigos de cães e gatos (Priscila Siqueira - Patinhas Carentes, Leilane Simonetti - Animais Carentes, Angelita Minelio – Tabuazeiro, Maria Augusta Venturini – Vila Velha), e a todos os proprietários dos animais, especialmente Angélica Christina Barreiro e Neida Vaz. MUITÍSSIMO obrigada por permitir a coleta das amostras clínicas, fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

À veterinária e colega de mestrado, Priscila Camargo Granadeiro Farias, pela disponibilidade em me acompanhar e coletar grande parte das amostras avaliadas. A sua ajuda foi essencial!

Ao Dr. Crispim Cerutti Junior, pelas sugestões oferecidas à discussão deste trabalho.

À Julyana Buery, que gentilmente se disponibilizou para corrigir esta dissertação, oferecendo dicas valiosas.

À Dra. Elenice Moreira Lemos, do Laboratório de Leishmaniose do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI), pelas sugestões e disposição em colaborar com o

desenvolvimento desta pesquisa, mesmo que os experimentos não tenham continuado.

Aos colegas do Laboratório de Leishmaniose do NDI, Laura, Juliana, Aline, Giuliana, Mariela, Natália e Renata, seja pelo apoio técnico ou pelos momentos divertidos que passamos juntos.

Aos colegas do Departamento de Patologia (área Parasitologia) da UFES, em especial Steveen, Tamiris e Cynara, pelo auxílio técnico e pelos momentos de descontração que tornaram mais agradáveis as horas passadas no laboratório.

Aos professores e colegas da turma de 2013 do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas da UFES, obrigada pelos ensinamentos e convivência agradável.

Aos amigos da turma de Farmácia e Bioquímica 2007/1 da UFES, pelo companheirismo e boas risadas durante e após nossa graduação.

Aos meus pais Arnoldo e Lucy, e a minha irmã Pollyanna, pelo incentivo e suporte durante toda a vida.

A Joaquim Ferreira, pelo carinho e palavras de conforto e incentivo durante as “crises” do mestrado.

À CAPES e ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância.”*

(John F. Kennedy)

RESUMO

A toxoplasmose, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, apresenta grande soroprevalência em humanos e animais em todo mundo. O perfil sorológico da infecção em animais domésticos, como cães e gatos, é um indicativo da contaminação ambiental pelo parasito e do risco potencial para o homem. Neste trabalho, avaliou-se a frequência de resultados positivos para *T. gondii* em exames sorológicos realizados em cães e gatos na Região Metropolitana de Vitória, no estado do Espírito Santo. Foram analisadas amostras de soro de 378 cães e 79 gatos provenientes de Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) e de abrigos temporários, além de dados epidemiológicos sobre município, origem, sexo, raça e idade de cada animal. Imunoglobulinas da classe IgG anti-*T. gondii* foram avaliadas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A frequência de anticorpos em cães foi de 39,4% (149/378) pelo ELISA e de 38,1% (142/373) pela RIFI, e em gatos foi de 15,2% (12/79) pelo ELISA e de 7,6% (6/79) pela RIFI. Os fatores associados à infecção canina foram a origem errante e a idade igual ou superior a um ano. Sorologia positiva por ELISA foi relacionada ao sexo dos felinos, com fêmeas apresentando maior chance de infecção. A avaliação dos resultados dos cães mostrou uma excelente concordância entre as técnicas ($\kappa = 0,82$), sem diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,377$). Entre os felinos, apesar de ter havido concordância entre os testes ($\kappa = 0,63$), eles foram significativamente diferentes de acordo com as análises estatísticas ($p = 0,041$). Os resultados demonstram alta contaminação do ambiente pelo parasito, sugerindo grande risco de infecção humana e de outros animais. Este é o primeiro estudo de determinação da frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães e gatos no Espírito Santo.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Estudos Soroepidemiológicos. Cães. Gatos. ELISA. Técnica Indireta de Fluorescência para Anticorpo. Brasil.

ABSTRACT

Toxoplasmosis, caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, has high seroprevalence in humans and animals worldwide. The serological profile of infection in domestic animals, such as dogs and cats, is indicative of the environmental contamination by the parasite and the potential risk to humans. In this study, we evaluated the frequency of positive results for *T. gondii* in serological tests performed in dogs and cats in the metropolitan region of Vitória, state of Espírito Santo. Serum samples from 378 dogs and 79 cats from Centers for Zoonosis Control (CCZ) and temporary shelters were analyzed, as well as epidemiological data on municipality, origin, sex, breed and age of each animal. Immunoglobulin class IgG anti-*T. gondii* were evaluated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT). The frequency of antibodies in dogs was 39.4% (149/378) by ELISA and 38.1% (142/373) by IFAT, and in cats was 15.2% (12/79) by ELISA and 7.6% (6/79) by IFAT. Factors associated with canine infection were stray origin and equal to or higher than a year old. Positive serology by ELISA was related to the sex of cats, with females showing higher chance of infection. The evaluation of the results of the dogs revealed excellent agreement between techniques ($\kappa = 0.82$), with no statistically significant differences ($p = 0.377$). Among the cats, despite agreement between both tests ($\kappa = 0.63$), there was differences according to statistical analysis ($p = 0.041$). The results demonstrate high contamination of the environment by the parasite, suggesting high level risk of human infection and other animals. This is the first study to determine frequency of antibodies anti-*T. gondii* in dogs and cats in Espírito Santo.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Seroepidemiologic Studies. Dogs. Cats. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Fluorescent Antibody Technique, Indirect. Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> | 17 |
| Figura 2 - Municípios analisados no ES (círculo vermelho)..... | 31 |
| Quadro 1 - Relação entre os valores de <i>kappa</i> (κ) e a força de concordância entre os resultados de testes diagnósticos..... | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Características geográficas dos municípios Vitória, Vila Velha, Serra e Cariacica..... | 30 |
| Tabela 2 - Distribuição dos cães de acordo com origem, sexo, raça e idade em municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013..... | 38 |
| Tabela 3 - Frequência de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> em 378 soros de cães de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013, testados pelo ELISA (IR \geq 1,2) e pela RIFI (Título \geq 1:16)..... | 39 |
| Tabela 4 - Comparação dos resultados das técnicas ELISA (IR \geq 1,2) e RIFI (Título \geq 1:16) na avaliação de 373 soros de cães de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013..... | 39 |
| Tabela 5 - Frequência de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> , por ELISA, de acordo com origem, sexo, raça e idade, em 378 soros de cães de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013..... | 40 |
| Tabela 6 - Frequência de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> , por RIFI, de acordo com origem, sexo, raça e idade, em 373 soros de cães de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013..... | 41 |
| Tabela 7 - Distribuição dos gatos de acordo com origem, sexo, raça e idade em municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013..... | 42 |
| Tabela 8 - Frequência de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> em 79 soros de gatos de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013, testados pelo ELISA (IR \geq 1,2) e pela RIFI (Título \geq 1:16)..... | 43 |
| Tabela 9 - Comparação dos resultados das técnicas ELISA (IR \geq 1,2) e RIFI (Título \geq 1:16) na avaliação de 79 soros de gatos de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013..... | 44 |

Tabela 10 - Frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, por ELISA, de acordo com origem, sexo, raça e idade, em 79 soros de gatos de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013.....45

Tabela 11 - Frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, por RIFI, de acordo com origem, sexo, raça e idade, em 79 soros de gatos de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CCZ - Centro de Controle de Zoonoses
- CDC - *Centers for Diseases Control and Prevention*
- CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
- DT - *Sabin-Feldman dye test* – Teste do Corante Sabin-Feldman
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio Imunoenzimático
- ES - Espírito Santo
- FeLV - *Feline leukemia vírus* – Vírus da leucemia felina
- FITC - *Fluorescein isothiocyanate* - Isotiocianato de fluoresceína
- FIV - *Feline immunodeficiency virus* - Vírus da imunodeficiência felina
- HI - Hemaglutinação Indireta
- HIV - *Human immunodeficiency vírus* – Vírus da imunodeficiência humana
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IC95% - Intervalo de Confiança de 95%
- IgA - Imunoglobulina da classe A
- IgG - Imunoglobulina da classe G
- IgM - Imunoglobulina da classe M
- IJSN - Instituto Jones dos Santos Neves
- IR - Índice de reatividade
- LAT - *Latex agglutination test* – Teste de aglutinação em látex
- MAT - *Modified agglutination test* - Teste de aglutinação modificado
- n - Número descritivo da amostra
- OPD - *Ortho-Phenylenediamine* - o-fenilenodiamina
- OR - *Odds Ratio*
- P. A. - Para análise
- PBS - *Phosphate buffered saline* - Salina tamponada com fosfatos
- PCR - Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase
- RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
- RPM - Rotações por minuto
- rSAG2 - *Recombinant surface antigen 2* - Antígeno recombinante de superfície 2
- SAG1 - *Surface antigen 1* – Antígeno de superfície 1
- SNC - Sistema nervoso central
- SRD - Sem raça definida

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

WB - *Western Blotting*

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 TOXOPLASMOSE: ETIOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO DE <i>Toxoplasma gondii</i> | 16 |
| 1.2 TRANSMISSÃO E PREVENÇÃO DA TOXOPLASMOSE..... | 18 |
| 1.3 EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE EM CÃES | 19 |
| 1.4 EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE EM GATOS DOMÉSTICOS | 21 |
| 1.5 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CANINA E FELINA | 24 |
| 1.5.1 Métodos diretos..... | 24 |
| 1.5.2 Métodos indiretos..... | 25 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 28 |
| 3 OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 29 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 29 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 ÁREA DO ESTUDO | 30 |
| 4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO..... | 30 |
| 4.3 COLETA DE DADOS | 31 |
| 4.4 COLETA DE SANGUE..... | 32 |
| 4.5 ENSAIOS SOROLÓGICOS..... | 32 |
| 4.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>T. gondii</i> | 32 |
| 4.6.1 Preparação do antígeno..... | 32 |
| 4.6.2 Reação Imunoenzimática..... | 33 |
| 4.7 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>T. gondii</i> | 34 |
| 4.7.1 Preparação do antígeno..... | 34 |
| 4.7.2 Reação de Imunofluorescência Indireta | 35 |
| 4.8 ANÁLISE DOS DADOS..... | 36 |
| 4.9 ASPECTOS ÉTICOS..... | 37 |
| 5 RESULTADOS | 38 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÃES | 38 |
| 5.2 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> EM CÃES | 38 |
| 5.3 ANÁLISE BIVARIADA DE FATORES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> EM CÃES | 40 |
| 5.3.1 Resultados do Ensaio Imunoenzimático (ELISA)..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 5.3.2 Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) | 41 |
| 5.4 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE GATOS..... | 42 |
| 5.5 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> EM GATOS | 43 |
| 5.6 ANÁLISE BIVARIADA DE FATORES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> EM GATOS..... | 44 |
| 5.6.1 Resultados do Ensaio Imunoenzimático (ELISA)..... | 44 |
| 5.6.2 Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) | 45 |
| 6 DISCUSSÃO | 47 |
| 6.1 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR <i>T. gondii</i> EM CÃES E GATOS..... | 47 |
| 6.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS SOROLÓGICAS ELISA E RIFI | 52 |
| 7 CONCLUSÃO | 54 |
| REFERÊNCIAS | 55 |
| ANEXOS | 65 |
| ANEXO A - CARTA AOS CENTROS DE CONTROLE DE ZOONOSES (CCZ) E ABRIGOS | 65 |
| ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 66 |
| ANEXO C - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO..... | 67 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 TOXOPLASMOSE: ETIOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO DE *Toxoplasma gondii*

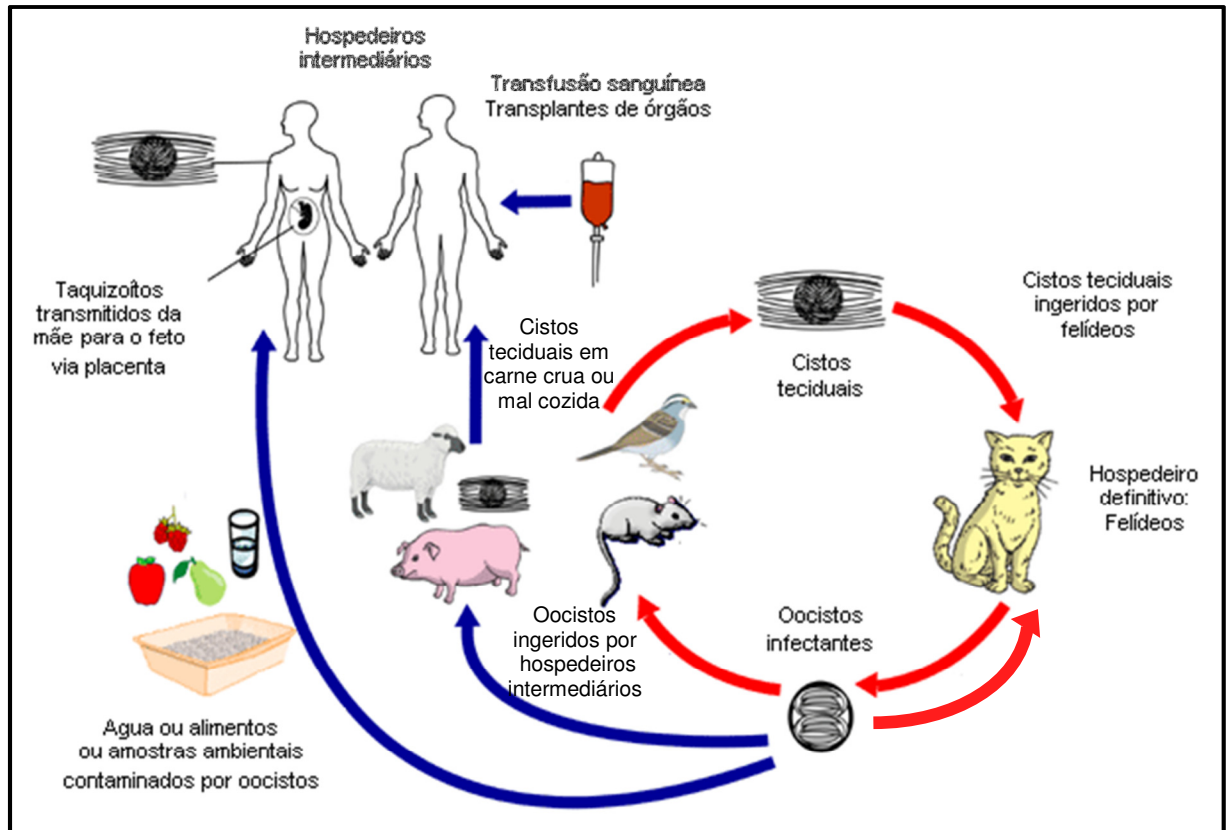
Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um parasito intracelular obrigatório de distribuição mundial, descoberto simultaneamente em 1908 por Nicolle e Manceaux na Tunísia, isolado de um roedor (*Ctenodactylus gundi*), e por Splendore no Brasil, isolado de um coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) (DUBEY *et al.*, 2012). Pertence ao Filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae e sub-família Toxoplasmatinae (LEVINE *et al.*, 1980, LEVINE, 1988).

O protozoário apresenta prevalência sorológica alta em aves e mamíferos, inclusive no homem. Em humanos, a frequência de infecção varia entre 10 e 80%, sendo que as maiores taxas são encontradas na América Latina, com destaque para o Brasil, e nos países tropicais da África (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009).

O parasito apresenta ciclo de vida heteroxeno, sendo os felídeos os hospedeiros definitivos e os hospedeiros intermediários todos os animais homeotérmicos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; Figura 1). A infecção dos felídeos pode ocorrer pela ingestão de qualquer uma das três formas infectantes (esporozoítos, taquizoítos ou bradizoítos), porém é mais eficiente pela ingestão de bradizoítos contidos em cistos teciduais de hospedeiros intermediários, como pássaros e pequenos roedores (DUBEY; FRENKEL, 1976). Os parasitos liberados no estômago invadem os enterócitos e se reproduzem assexuadamente por esquizogonia, desenvolvendo merozoítos dentro de esquizontes. Em seguida, ocorre a diferenciação de gametas, fecundação e formação de oocistos (DUBEY; FRENKEL, 1972). Estes são liberados dos enterócitos e saem juntamente com as fezes dos felídeos, ainda não esporulados. Dentro de um a cinco dias, eles esporulam no ambiente, sob condições adequadas de oxigenação, umidade e temperatura. Cada oocisto contém dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada, e pode se manter viável por até 18 meses no solo (FRENKEL; RUIZ; CHINCHILLA, 1975), devido a sua parede dupla que confere grande resistência às condições ambientais. A ingestão de cistos teciduais pode levar a eliminação de milhões de oocistos, três a dez dias após a infecção, por aproximadamente 20 dias (DUBEY; FRENKEL, 1972).

O período pré-patente após a ingestão de oocistos ou taquizoítos é mais longo, de 18 dias ou mais (DUBEY; FRENKEL, 1976; DUBEY, 1996).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.



Fonte: Adaptado de CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*), 2013.

Após a ingestão de cistos ou oocistos por hospedeiros suscetíveis, por exemplo o homem, o cão, e o próprio gato, os parasitos são liberados no estômago, invadem o epitélio intestinal e se diferenciam em taquizoítos. Esses se multiplicam rapidamente por endodiogenia e podem infectar qualquer célula nucleada, a qual se rompe após novas divisões do parasito. A disseminação dessas formas pela linfa ou sangue circulante pode ser assintomática ou causar linfadenopatia cervical ou febre, associadas a mialgia, astenia ou outros sinais inespecíficos, caracterizando a fase aguda da infecção. Pode evoluir para morte do hospedeiro, principalmente em fetos e em indivíduos imunossuprimidos, ou pode cessar, por meio da resposta imune específica, com redução do parasitismo e eliminação dos parasitos extracelulares do organismo. Alguns parasitos podem originar bradizoítos, que se multiplicam lentamente formando cistos em células do sistema nervoso central (SNC), nos olhos

e nos músculos esquelético e cardíaco, preferencialmente. Essa fase crônica permanece por longo período e pode ser reativada por mecanismos ainda desconhecidos, acarretando desde manifestações clínicas semelhantes à primoinfecção até problemas mais graves, como lesões oculares e neurológicas (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

1.2 TRANSMISSÃO E PREVENÇÃO DA TOXOPLASMOSE

Na maioria das vezes a infecção horizontal do homem pelo *T. gondii* é causada pela ingestão de carne crua ou mal cozida de hospedeiros intermediários contendo cistos teciduais, como ovinos, suínos e caprinos, ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos esporulados ou pela exposição direta às fezes de gato. Mais raramente, pode ocorrer por transplante de órgãos contendo cistos teciduais, cujo maior risco é o de coração, ou via taquizoítos transmitidos por transfusão de sangue, por ingestão de leite de cabra não pasteurizado, ou por acidentes de laboratório (ESCH; PETERSEN, 2013).

A transmissão vertical pelo *T. gondii* é de grande importância tendo em vista a possibilidade de aborto ou de anomalias graves que podem acometer o feto, principalmente no tecido cerebral, como hidrocefalia, calcificações cerebrais, deficiência neurológica ou psicomotora e convulsões, e no tecido ocular, como retinocoroidite, microftalmia, cegueira. Em geral, a infecção congênita resulta da infecção materna primária adquirida durante a gestação, mas pode ocorrer em imunocompetentes devido à reinfecção materna ou por reativação de infecção passada em mulheres HIV-positivas. Em todos os casos, os taquizoítos podem colonizar a placenta e atingir o feto (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Na ausência de uma vacina efetiva para humanos, a melhor abordagem é limitar a exposição ao parasito. A prevenção inclui a adoção de medidas de higiene, como utilizar luvas ao manipular o solo e lavar frutas e vegetais crus; congelar carnes a -12°C por 24 horas ou cozinhá-las até a temperatura interna atingir 66°C, e beber somente água tratada ou, em caso de necessidade, filtrá-la (filtro de 1 µm) ou fervê-la para eliminar o parasito. Cães e gatos devem ser mantidos no domicílio a fim de

evitar hábitos de caça e o contato com oocistos, e devem ser nutridos com alimento comercial. A caixa de areia de gatos deve ser limpa diariamente, devido a rápida esporulação dos oocistos, e deve-se evitar o acesso desses animais a reservatórios de água. Os cães devem ser vacinados contra o vírus da cinomose, já que muitos casos de toxoplasmose grave são observados nas coinfeções. Vacinas que reduzem ou previnem a liberação dos oocistos estão sendo testadas e têm mostrado bons resultados (ELMORE *et al.*, 2010, JONES; DUBEY, 2010).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE EM CÃES

O primeiro relato de toxoplasmose fatal em um animal doméstico foi descrito por Mello em 1910, na cidade de Turin, Itália, em uma cadela que veio a óbito por toxoplasmose visceral aguda. No Brasil, a infecção canina foi descoberta posteriormente por Carini, em 1911. Desde então, a doença canina é reportada em vários países com elevado índice de animais infectados, inclusive no Brasil (BRESCIANI *et al.*, 2008).

Os cães são hospedeiros intermediários do *T. gondii* e também adquirem a infecção pela ingestão de carnes cruas contendo cistos ou pela ingestão de oocistos no solo ou em água e alimentos contaminados. Bresciani e colaboradores (1999, 2009) evidenciaram, em estudos experimentais, a possibilidade de infecção fetal nesses animais. Posteriormente, AL-QASSAB e colaboradores (2009) isolaram o parasito do cérebro de filhotes e anticorpos IgM e IgG foram detectados por *western blotting* no soro da mãe, indicando provável transmissão congênita.

Em geral, a infecção é assintomática, porém a doença clínica é frequentemente associada à cinomose, à erliquiose, ou à terapia com glicocorticoide. As manifestações clínicas mais comuns resultam do comprometimento dos sistemas respiratório, neuromuscular ou gastrointestinal, enquanto lesões oculares são pouco relatadas. A forma generalizada, caracterizada por febre, tonsilite, dispneia, diarreia e vômitos, acomete principalmente cães menores de um ano de idade, enquanto que, em animais mais velhos, os sinais mais graves resultam de problemas neuromusculares, como convulsões, tremores, ataxia, paresia ou paralisia, marcha

anormal, perda de massa muscular, ou rigidez. Muitos sinais clínicos são comuns à infecção causada pelo *Neospora caninum*, um parasito que tem como hospedeiro definitivo o cão, sendo importante a inclusão dessa doença no diagnóstico diferencial da toxoplasmose (DUBEY; LINDSAY; LAPPIN, 2009).

A infecção canina tem sido associada a alguns fatores, como o acesso à rua, dieta, idade, raça e convívio com outros animais, como felinos. De Souza e colaboradores (2003), ao avaliarem cães provenientes do Paraná e da cidade de São Paulo, observaram soroprevalência de *T. gondii* em 31,6% (193/610) dos errantes e em 34,3% (46/134) daqueles de área rural, enquanto os domiciliados apresentaram 5,2% (26/500) de positivos, sugerindo maior oportunidade dos primeiros de ingerir tecidos de animais infectados ou oocistos do ambiente. Em Santa Catarina, De Moura e colaboradores (2009) encontraram maior frequência de anticorpos anti-*T. gondii* entre cães que tinham acesso à rua, não apresentavam raça definida e recebiam dieta caseira, relacionando os resultados ao tipo de manejo a que são submetidos. Outros estudos mostraram que a infecção tende a aumentar com a idade dos cães, uma vez que animais mais velhos estão a mais tempo expostos às fontes de infecção (CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2005; LANGONI *et al.*, 2006). No estudo de Azevedo e colaboradores (2005), na Paraíba, o contato com gatos foi associado à presença de anticorpos anti-*T. gondii* em cães, evidenciando a participação dos felídeos na propagação da toxoplasmose, por serem os únicos capazes de eliminar oocistos nas fezes.

Ferreira e colaboradores (2009) observaram que a presença de cães nos domicílios pode ter sido um fator de proteção em área rural do estado do Acre, pois são capazes de afugentar gatos e felinos selvagens, reduzindo o risco de contaminação ambiental com oocistos. Entretanto, Frenkel e colaboradores (1995) realizaram uma coorte na Cidade do Panamá e identificaram a presença de cães como fator de risco para infecção por *T. gondii* em crianças, superior à associação com a presença de gatos. O mesmo resultado foi encontrado por Etheredge e colaboradores (2004), também no Panamá, ao analisar as comunidades com maior prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em crianças. Nesse mesmo estudo, houve maior risco de infecção quando havia também gatos na residência.

Alguns pesquisadores acreditam que os cães poderiam atuar na transmissão mecânica de oocistos infectantes, contaminando o solo ou diretamente o homem. Após a ingestão de fezes de gatos infectadas, oocistos esporulados ingeridos poderiam ser liberados ainda intactos no ambiente (LINDSAY *et al.*, 1997; SCHARES *et al.*, 2005). Ademais, eles poderiam abrigar oocistos em sua pelagem após rolarem sobre fezes de gatos contaminadas e o homem poderia se infectar, por via oral, ao acariciá-los (FRENKEL; PARKER, 1996).

Garcia e colaboradores (1999b), bem como o estudo citado por eles, de Ulón e Marder (1990), observaram correlação positiva e altamente significativa entre a distribuição dos títulos de anticorpos de humanos e cães, sugerindo que vias de transmissão comuns possam existir entre eles, como hábitos alimentares carnívoros e o próprio ambiente. Apesar de diferenças entre os comportamentos higiênicos, a prevalência de toxoplasmose canina pode ser um indicador epidemiológico do risco a que a população humana está submetida (GERMANO; ERBOLATO; ISHIZUKA, 1985; JACKSON; HUTCHISON; SIIM, 1987; MEIRELES *et al.* 2004).

1.4 EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE EM GATOS DOMÉSTICOS

Os membros da família *Felidae*, incluindo os gatos domésticos (*Felis catus*), são os únicos hospedeiros definitivos para *T. gondii* e portanto capazes de liberar oocistos junto com as fezes, contaminando o solo e a água. Acredita-se que a maioria dos gatos só libere oocistos uma vez na vida (DAVIS; DUBEY, 1995), apesar de estudos de infecção experimental terem demonstrado a possibilidade de novos episódios, após imunossupressão com corticosteroides ou em caso de reinfecção (DUBEY; FRENKEL, 1974; DUBEY, 1995). Em geral, a quantidade e o tempo de liberação dessas formas após infecção secundária é menor do que na exposição primária, e fatores ligados ao hospedeiro, tais como idade na infecção primária, condição imune e nutricional, e também ao parasito, como cepa e quantidade ingerida, podem influenciar neste processo (DUBEY, 2010).

Dubey (1976) mostrou que gatos cronicamente infectados com *T. gondii*, ao serem inoculados com *Cystoisospora felis*, um coccídeo comum nesse hospedeiro,

apresentaram nova liberação de oocistos, apesar da ocorrência do evento na natureza ser incerta. Ao contrário, estudos de coinfeção com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) não afetaram a liberação de oocistos de *T. gondii*, e a imunidade permaneceu após nova exposição ao parasito (LAPPIN *et al.*, 1992, 1996). De acordo com Dubey e colaboradores (2009), os dados disponíveis sobre a imunidade em coinfeções naturais com FIV ou demais causadoras de imunossupressão, como o vírus da leucemia felina (FeLV) e *Bartonella* spp., são ainda escassos, pois na maioria dos estudos não houve a coleta de amostras fecais para análise.

É difícil reconhecer quando está ocorrendo a liberação de oocistos, pois em geral não há anormalidades clínicas detectáveis durante esse período e a doença tende a continuar de forma subclínica. Apesar de mais raras, a transmissão congênita ou via amamentação são mais prováveis de desencadear manifestações clínicas graves, podendo levar a morte por problemas pulmonares ou hepáticos (LAPPIN, 2010). Os sinais clínicos resultam da inflamação do fígado, pâncreas, SNC e, em especial, dos pulmões. Pode haver aumento do abdômen, icterícia, febre intermitente ou persistente, anorexia, vômitos, diarreia, letargia, dispneia, hiperestesia muscular, rigidez da marcha, dermatite, convulsões e deficiências neurológicas. A toxoplasmose ocular pode ocorrer de forma isolada, sendo comuns uveíte anterior ou posterior, irite e retinocoroidite (DUBEY; LINDSAY; LAPPIN, 2009). A doença disseminada tem sido reportada após coinfeção experimental com vírus que causam imunossupressão, como FIV ou FeLV, e também após administração de ciclosporina ou transplante renal, mas não há evidências conclusivas de que o processo natural altere o curso da toxoplasmose em gatos (DUBEY *et al.*, 2009).

A soroprevalência mundial de *T. gondii* relatada em gatos varia muito, podendo chegar a 80% em algumas regiões (JONES; DUBEY, 2010). No Brasil, Dubey e colaboradores (2012) observaram que há pouco conhecimento sobre esta frequência e a maioria dos estudos se concentram no estado de São Paulo. De forma geral, a soroprevalência varia com a idade e com o estilo de vida do felino, pois o aumento da idade e o hábito de caçar, associado ao acesso à rua, aumentam a chance de exposição ao parasito, que pode ser encontrado no solo contaminado por oocistos e em pássaros e pequenos roedores, sob a forma de cistos teciduais

(LAPPIN, 2010). A dieta parece também influenciar de forma marcante o nível da infecção, pois mesmo gatos mantidos estritamente em apartamentos podem apresentar prevalência considerável, provavelmente devido aos hábitos alimentares, como a ingestão de carne/víscera crua ou mal passada (GAUSS *et al.*, 2003; LOPES; CARDOSO; RODRIGUES, 2008; OPSTEEGH *et al.*, 2012).

A presença de gatos nos domicílios, em algumas ocasiões, foi associada à infecção por *T. gondii*. Souza e colaboradores (1987) avaliaram crianças em idade escolar de áreas rural e urbana do Rio de Janeiro e verificaram que a transmissão da doença foi influenciada pelo hábito de consumo de carne crua ou mal cozida e pela presença de gatos no domicílio, particularmente no ambiente rural. Em estudo retrospectivo em 500 residentes de Ribeirão das Neves, no estado de Minas Gerais, Camargo, Antunes e Chiari (1995) obtiveram maior soropositividade entre indivíduos que tinham contato com gatos, galinhas e suínos, não sendo encontrada diferença quanto ao contato com cães. Entretanto, de acordo com Robert-Gangneux e Dardé (2012), o contato direto com gatos não é considerado um grande risco para humanos, pois a infectividade dos oocistos se inicia entre um a cinco dias após sua liberação.

Apesar da baixa prevalência de oocistos nas fezes, cerca de 1% (JONES; DUBEY, 2010), e do seu curto período de liberação, a contaminação ambiental pode ser muito alta considerando a hipótese de que cada gato pode excretar mais de 100 milhões. Esse nível, entretanto, pode variar de acordo com a densidade de gatos no local e da incidência de infecção neles (AFONSO; THULLIEZ; GILOT-FROMONT, 2010).

Um surto de toxoplasmose aguda em humanos foi associado ao consumo de água contaminada de um reservatório municipal, na cidade de Santa Isabel do Ivaí, no Paraná, entre novembro de 2001 e janeiro de 2002 (DE MOURA *et al.*, 2006). Esse episódio motivou um estudo em gatos domésticos na cidade, mostrando que 84,4% (49/58) deles apresentavam anticorpos anti-*T. gondii*, sendo o parasito isolado em 37 de 54 animais (DUBEY *et al.*, 2004). Os resultados sugerem que o ambiente dessa região era altamente contaminado por oocistos, representando um grande risco de infecção para o homem e demais hospedeiros.

Devido à elevada prevalência do parasito no mundo, em particular no Brasil, e a surtos de doença aguda que foram relacionados à contaminação da água com oocistos de *T. gondii* (ARAMINI *et al.*, 1999; DE MOURA *et al.*, 2006; BALASUNDARAM *et al.*, 2010), torna-se relevante a pesquisa de gatos infectados. Como é provável que a maioria dos gatos soropositivos já liberaram oocistos, pois, em geral, anticorpos específicos não são detectáveis durante esse período, informações sobre a soroprevalência da infecção em gatos são convenientes para avaliar a distribuição ambiental do parasito e o risco para a saúde pública (JONES; DUBEY, 2010).

1.5 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CANINA E FELINA

1.5.1 Métodos diretos

O diagnóstico definitivo de toxoplasmose pode ser feito pela demonstração de taquizoítos ou cistos em fluidos corporais e tecidos, respectivamente, ou pela identificação de oocistos nas fezes de felinos, porém é incomum devido ao curso subclínico da doença.

Os taquizoítos são melhor visualizados após confecção de esfregaços da amostra clínica centrifugada e coloração pelo método de Giemsa. Após biópsia dos tecidos suspeitos, os cistos são identificados com o uso de métodos de imuno-histoquímica (MONTROYA, 2002). Entretanto, o padrão-ouro para detecção do parasito é a inoculação de espécimes clínicas em camundongos, seguida da visualização das formas infectantes em lâminas histológicas ou detecção de anticorpos específicos no soro da cobaia (JAMES *et al.*, 1996). Apesar de ser um método sensível e específico, poucos laboratórios tem estrutura para executá-lo, devido à necessidade de manter animais em biotério, o que torna o método custoso. Além disso, o aparecimento dos taquizoítos somente na infecção aguda e desenvolvimento dos cistos de seis a oito semanas e dos anticorpos de duas a seis semanas após a infecção, também restringe o uso desse método (DUBEY, 2010). A pesquisa do DNA do *T. gondii* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras clínicas é um método mais rápido do que o bioensaio, porém ainda apresenta um

alto custo e necessita de melhor padronização (KOMPALIC-CRISTO; BRITTO; FERNANDES, 2005).

A detecção de oocistos em exames fecais de rotina para gatos também é rara e o achado deles não garante a infecção por *T. gondii*, visto que existem outros coccídeos cujos oocistos são morfologicamente semelhantes, como *Hammondia hammondi*, *H. heydorni*, *N. caninum* e *Besnoitia* spp (DUBEY, 2004). A PCR parece ser eficiente neste caso, porém a detecção é limitada por inibidores presentes nas fezes e pela dificuldade de liberação do DNA, além da técnica não indicar a viabilidade das formas, ao contrário do bioensaio (SCHWAB; MCDEVITT, 2003).

1.5.2 Métodos indiretos

Considerando que a infecção é assintomática ou, em alguns casos, com manifestações inespecíficas confundíveis com outras etiologias, a demonstração do parasito é limitada. Neste caso, a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* assume relevante importância no diagnóstico da toxoplasmose felina e canina.

Em geral, é feita a pesquisa de anticorpos das classes IgM ou IgG, enquanto IgA, que apresenta um padrão semelhante a IgG, se restringe à pesquisa científica (LAPPIN, 2010). Anticorpos IgG para *T. gondii* surgem por volta de três a quatro semanas após a infecção em gatos, permanecendo detectáveis por muitos anos, devido a presença de antígenos do parasito nos tecidos (DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995). Em cães, segundo Silva e colaboradores (2002), esses anticorpos foram encontrados no sétimo dia após a infecção, permanecendo pelos 62 dias de estudo. Já anticorpos IgM específicos são visualizados mais cedo, entre duas a quatro semanas de infecção, tornando-se negativos dentro de 16 semanas pelo ELISA IgM (LAPPIN *et al.*, 1989). Em alguns casos, porém, IgM permanece por meses ou anos após a infecção (IgM residual) ou pode nunca ser detectado (LAPPIN, 2010). A resposta imune do hospedeiro e as diferentes sensibilidades dos testes sorológicos determinam as variações temporais na observação dos anticorpos.

Devido a permanência de IgG por, teoricamente, toda a vida do animal, sua pesquisa é a mais utilizada em estudos soropidemiológicos para indicar exposição prévia ao *T. gondii*. Para estimar o tempo de infecção é necessário avaliar a presença de anticorpos IgM ou observar a elevação dos títulos de IgG (aumento de quatro vezes ou mais) em amostras pareadas coletadas num intervalo de duas a quatro semanas, sugestivos de infecção recente (BARRS; MARTIN; BEATTY, 2006). A avidéz de IgG específica também pode ser útil neste caso; em infecções agudas, uma alta porcentagem desses anticorpos apresenta baixa avidéz, enquanto que em infecções crônicas há um predomínio de anticorpos de grande afinidade (JENUM; STRAY-PEDERSEN; GUNDERSEN, 1997).

Vários testes sorológicos são relatados na literatura; alguns não são mais utilizados, como o Teste do Corante Sabin-Feldman (DT) e outros empregados com menor frequência, como o *Western Blotting* (WB) e o Teste de Aglutinação em Látex (LAT). Entre os mais citados, estão a Hemaglutinação Indireta (HI), o Teste de Aglutinação Modificado (MAT), a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

A Hemaglutinação Indireta (HI) utiliza hemácias de aves recobertas com antígenos totais do *T. gondii*, aglutináveis por anticorpos IgM e IgG específicos. É um teste de alta sensibilidade, simples, não necessita de conjugados espécie-específicos e não exige equipamento sofisticado, sendo de baixo custo e bom para triagem da toxoplasmose na rotina laboratorial e levantamentos epidemiológicos. Entretanto, é inadequado para o diagnóstico precoce e métodos mais específicos devem ser usados para confirmar a infecção (DA COSTA *et al.*, 2007).

O Teste de Aglutinação Modificado (MAT) consiste em suspensões de taquizoítos preservados em formalina que se aglutinam na presença de anticorpos específicos, IgM ou IgG. Segundo Dubey e Thulliez (1989) e Dubey, Lappin e Thulliez (1995), o ensaio, que apresenta vantagens semelhantes à HI, foi mais sensível em relação ao DT, ao ELISA IgM ou IgG, à HI e ao LAT, na detecção de anticorpos em gatos infectados com cistos teciduais por via oral. Comparado com a RIFI, Macri e colaboradores (2009) observaram uma concordância quase perfeita ($\kappa = 0,98$) ao analisar gatos infectados naturalmente. Já para cães, a sensibilidade e especificidade do teste não têm sido descritas, apesar do estudo de Cañón-Franco e

colaboradores (2003) ter mostrado baixa sensibilidade (85%) do ensaio em relação à RIFI.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) substituiu o DT na rotina laboratorial, pela maior praticidade e segurança, além de apresentar resultados comparáveis e permitir a identificação de anticorpos específicos segundo classes, como IgM, IgG e IgA. A maior segurança desse ensaio provém do uso de taquizoítos intactos, preservados em formalina e fixados em lâminas de microscopia, cuja fluorescência em torno de todo parasito é vista após incubação do soro-teste positivo com conjugados específicos marcados com fluorocromos. Pode haver resultados falso-positivos de anticorpos IgM por interferência de fatores reumatóides presentes no soro ou resultados falso-negativos de IgM, por competição com IgG (CAMARGO; LESER; ROCCA, 1972). Apesar da necessidade de microscopia de fluorescência e da relativa subjetividade da leitura, é considerado o padrão-ouro na sorologia de cães devido a sua alta especificidade (CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2003).

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para toxoplasmose é um dos testes mais utilizados na rotina laboratorial para humanos e também na pesquisa para animais, como cães e gatos. Assim como a RIFI, o teste permite a detecção de diferentes classes de anticorpos (IgM, IgG e IgA), pelo uso de conjugados espécie-específicos, porém é mais sensível e objetivo, pois a leitura é feita diretamente por um equipamento, além de avaliar uma grande quantidade de amostras simultaneamente. A sensibilidade e a especificidade do teste são altas, variando de acordo com o tipo de antígeno utilizado. Os mais comuns são antígenos solúveis e totais de taquizoítos, proteínas nativas purificadas por meio de cromatografia de afinidade e proteínas recombinantes de antígenos imunodominantes dos parasitos. O antígeno SAG1 (antígeno de superfície 1) ou P30 é a proteína mais abundante nos taquizoítos e está presente apenas nessa forma evolutiva. Distribuído na superfície e no interior do parasito, estimula a produção de altos níveis de anticorpos específicos durante infecção aguda ou crônica (LETSCHER-BRU *et al.*, 2003). O ELISA utilizando o antígeno SAG1 parece ser de alta sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em animais domésticos, como cães e gatos (KIMBITA *et al.*, 2001; HOSSEININEJAD *et al.*, 2009; HOSSEININEJAD, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença de distribuição mundial que se apresenta sob a forma benigna ou branda, em geral. Esta zoonose, entretanto, pode causar problemas visuais em indivíduos imunocompetentes e mortes e alta morbidade em fetos e imunossuprimidos.

Estudos soroepidemiológicos para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em cães e gatos são úteis para avaliar a contaminação ambiental pelo parasito e, por consequência, o risco potencial de infecção humana no local avaliado. A proximidade entre esses animais domesticados e o homem, bem como o compartilhamento de alguns hábitos alimentares e do ambiente, permite o uso de tais hospedeiros como sentinelas do espaço urbano.

No estado do Espírito Santo, ainda há uma carência de dados sobre a distribuição da toxoplasmose, sendo que nenhum estudo avaliou a infecção em cães e gatos. Considerando a importância desses hospedeiros no conhecimento da epidemiologia da doença, este trabalho avaliou a frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soros de cães e gatos na Região Metropolitana de Vitória, no estado do Espírito Santo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a frequência de resultados positivos para *Toxoplasma gondii* em exames sorológicos realizados em cães e gatos na Região Metropolitana de Vitória, no estado do Espírito Santo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soros de cães e gatos pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).
- Identificar fatores associados à infecção de cães e gatos pelo *T. gondii*.
- Avaliar a concordância entre o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em cães e gatos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DO ESTUDO

Os animais analisados neste estudo foram provenientes dos municípios de Vitória, Vila Velha, Serra e Cariacica, todos pertencentes à Região Metropolitana de Vitória (Figura 2). A região apresenta clima tropical úmido, com temperatura média anual de 23°C e volume de precipitação superior a 1.400 mm por ano, com chuvas concentradas no verão (ESPÍRITO SANTO, 2013). Na Tabela 1 foram resumidas as características geográficas de cada município amostrado.

Tabela 1 - Características geográficas dos municípios Vitória, Vila Velha, Serra e Cariacica.

| Município | Área territorial | Altitude | Latitude | Longitude | População |
|-------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| Vitória | 98,194 km ² | 1 m | 20° 19' 15" | 40° 20' 10" | 327.801 |
| Vila Velha | 210,067 km ² | 4 m | 20° 19' 48" | 40° 17' 31" | 414.586 |
| Serra | 551,687 km ² | 65 m | 20° 7' 44" | 40° 18' 28" | 409.267 |
| Cariacica | 279,859 km ² | 37 m | 20° 15' 50" | 40° 25' 12" | 348.738 |

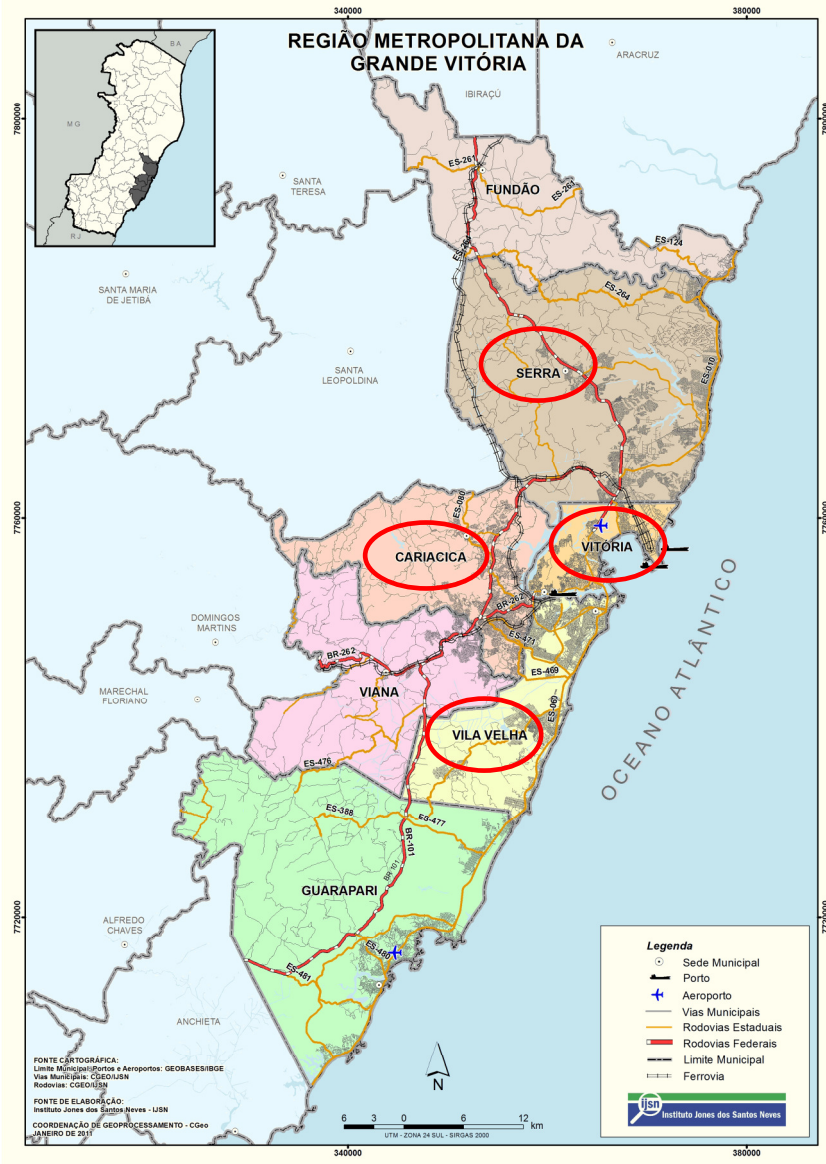
Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2010.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram cedidas para o estudo 167 amostras de soro de cães, obtidas entre 2008 e 2010, capturados em vias públicas (errantes) ou entregues por seus proprietários (domiciliados) aos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) dos respectivos municípios. A seguir, foram coletadas amostras de sangue de 211 cães, entre 2010 e 2013 (N = 378), e de 79 gatos no ano de 2013, ambas por conveniência. As coletas foram realizadas em animais capturados por abrigos temporários ou por CCZ, ou naqueles levados até o CCZ de Cariacica para castração. A maioria apresentava-se saudável, enquanto os doentes apresentavam manifestações

clínicas decorrentes de várias causas, como infestação por carrapatos, sarna, miíase, tumores e cinomose.

Figura 2 - Municípios analisados no ES (círculo vermelho).



Fonte: Instituto Jones dos Santos Neves (IJSN), 2011.

4.3 COLETA DE DADOS

Para identificar fatores associados à infecção pelo *T. gondii*, foram coletadas informações referentes à origem, ao sexo, à raça e à idade dos cães e gatos. Cada variável foi classificada em duas categorias. Quanto à origem, os animais foram categorizados em domiciliados, quando tinham um proprietário, e errantes quando

presentes em abrigos ou em CCZ. Quanto à raça, foram classificados em raça pura e sem raça definida (SRD). Quanto à idade, divididos em menores de um ano e com um ano ou mais, dependendo da dentição. Somente para os gatos domiciliados do CCZ de Cariacica, foram colhidos dados em relação ao acesso à rua, à alimentação, à moradia e ao convívio com outros animais (ANEXO C)

4.4 COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular ou radial, usando tubos do tipo *Vacutainer®* sem anticoagulante, obtendo-se 2 mL de cada animal. Após a coagulação, as amostras foram mantidas em temperatura de 2-8°C por no máximo 24h e os soros foram obtidos por centrifugação a 3.500 RPM por dez minutos. Os soros foram acondicionados em tubos do tipo *Eppendorf®* e armazenados em *freezer* a -20°C até a realização dos ensaios sorológicos.

4.5 ENSAIOS SOROLÓGICOS

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foram realizados com a colaboração do professor Dr. Ricardo W. A. Vitor, no Laboratório de Toxoplasmose do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*T. gondii*

4.6.1 Preparação do antígeno

O antígeno foi preparado segundo o protocolo de Elsaid e colaboradores (1995) modificado. Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, obtidos do exsudato peritoneal de camundongos suíços infectados, foram lavados por centrifugação a 2.000 RPM por dez minutos. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado ao sedimento 2 mL de

solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2. O material foi sonificado (Ultrasonic Homogenizer – 4710; Coler-Palmer Instrument Co) a 40 Hz, em banho de gelo, de sete a dez vezes durante 45 segundos, com intervalos de dois minutos, sendo observado o rompimento dos parasitos em microscópio óptico durante o processo. O material foi centrifugado a 10.000 RPM a 4°C por 30 minutos, e o sobrenadante (antígeno solúvel) recolhido em tubos tipo *Eppendorf*® e estocado em *freezer* a -20°C. A concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951) modificado.

4.6.2 Reação Imunoenzimática

A reação imunoenzimática foi executada conforme técnica descrita por Voller e colaboradores (1976) modificada. Foi realizada em microplacas de polietileno com 96 orifícios de fundo chato (Sasterdt®), as quais foram sensibilizadas com antígenos de *T. gondii* contendo 5 µg de proteína/mL, a 4°C durante 18 horas. Posteriormente, a solução de antígeno foi desprezada e a placa foi lavada duas vezes com solução de lavagem (NaCl 0,87% contendo Tween 20 à 0,05% em H₂O destilada). A placa foi bloqueada com PBS suplementada com caseína 2% (PBS-Caseína 2%) a 37°C por 30 minutos. A seguir, a placa foi lavada duas vezes e 100 µL do soro de cão ou gato previamente diluídos (1:100 e 1:200, respectivamente) em PBS-T20-0,5%/Caseína 0,25% (PBS-T/caseína) foram adicionados em cada orifício, em duplicata, seguida da incubação a 37°C durante 45 minutos. Após esta etapa, a placa foi vertida, lavada quatro vezes e foram adicionados a cada orifício 100 µL do conjugado anti-IgG de cão (SIGMA, nº A9042) ou gato (SIGMA, SAB3700059) marcados com peroxidase e diluídos em PBS-T/caseína (1:6.000 e 1:15.000, respectivamente). A placa foi incubada novamente, a 37°C por 45 minutos, e depois vertida e lavada quatro vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados, em cada orifício, 100 µL do substrato cromogênico (solução OPD: 3 µg de o-fenilenodiamina, 3 µL de peróxido de hidrogênio e 15 mL de ácido cítrico) preparado no momento do uso. Após incubação a 37°C, por 20 minutos, no escuro, a reação foi interrompida adicionando 25 µL de ácido sulfúrico 4N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Bio-Rad modelo 3550) em filtro de 490 nm.

Em todos os experimentos, foram utilizados controles positivos e negativos, previamente definidos por reação de imunofluorescência indireta, e avaliada a ligação inespecífica do anticorpo secundário, por meio da incubação do antígeno solúvel na ausência de soro, porém na presença do conjugado (controle interno).

O ponto de *cut off* considerado foi a média da absorbância de seis soros de cão ou de gato negativos para *T. gondii* mais três desvios padrão, incluídos em cada placa (ANDRADE *et al.*, 2013). A média da absorbância dos soros testados em duplicata foi dividida pelo valor do *cut off* da placa para determinação do índice de reatividade (IR). Foram considerados positivos soros com valores de $IR \geq 1,2$, a partir de um ajuste realizado para diminuir o número de reações falso-positivas.

As diluições ideais do soro e do conjugado de felinos foram padronizadas no laboratório. Foram testadas diferentes diluições do soro (1:100, 1:200 e 1:400) e do conjugado anti-IgG de gato marcado com peroxidase (1:5.000, 1:10.000, 1:15.000, 1:20.000, 1:25.000 e 1:30.000). Foram utilizados seis soros de gatos, dois positivos e quatro negativos para toxoplasmose pela RIFI, em duplicata. A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA utilizando filtro de 490 nm. Para determinar o *signal-to-noise* (razão S/N), a média dos resultados de absorbâncias dos soros controles positivos foi dividida pela média dos negativos (RAJASEKARIAH *et al.*, 2001), considerando como ponto ótimo de padronização os valores de S/N mais elevados obtidos nas diferentes diluições testadas. Nessas condições, as diluições ideais foram 1:200 para o soro e 1:15.000 para o conjugado.

4.7 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*T. gondii*

4.7.1 Preparação do antígeno

O antígeno foi preparado segundo a técnica descrita por Camargo (1964) modificada. Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram recolhidos por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos suíços infectados, realizada com PBS pH 7,2. O material foi centrifugado a 2.000 RPM por 20 segundos para retirada de células contaminantes do camundongo. O sobrenadante foi coletado e a ele adicionado

formol P.A. até a concentração de 0,5% do volume final. Após homogeneização, o material foi centrifugado a 2.500 RPM por dez minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensado em PBS pH 7,2, homogeneizado e centrifugado (2.500 RPM, dez minutos). Este processo foi repetido duas vezes. A suspensão final de taquizoítos foi distribuída em lâminas marcadas (uma gota por orifício), que após secagem foram estocadas em *freezer* à - 20°C até a realização dos ensaios sorológicos.

4.7.2 Reação de Imunofluorescência Indireta

Os soros foram titulados em série de diluições quádruplas a partir de 1:16 em PBS pH 7,2 e uma gota de cada diluição foi adicionada nos respectivos orifícios das lâminas previamente sensibilizadas com o antígeno. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos. Depois de lavadas com PBS pH 7,2 por três minutos e com água destilada, foram secas e a elas foi adicionado o conjugado anti-IgG de cão ou de gato marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, SIGMA) diluído (1:500 cão e 1:600 gato) em Azul de Evans (1:5.000 em PBS-T80 a 2%), uma gota por orifício. Após incubação em estufa a 37°C por 30 minutos, as lâminas foram novamente lavadas com PBS pH 7,2 por três minutos e com água destilada. Depois de secas, foram preparadas com glicerina tamponada e lamínula.

A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus IX70-FLA), sendo considerada reação positiva quando houve fluorescência verde-amarelada em torno de todo parasito, e reação negativa quando os parasitos apresentavam coloração vermelha ou verde-amarelada em apenas alguns pontos. Foram considerados positivos os animais que apresentaram título de anticorpos iguais ou maiores que 1:16 (BARBOSA *et al.*, 2003). Em todos os experimentos foram utilizados controles positivos e negativos, previamente definidos.

4.8 ANÁLISE DOS DADOS

A partir de um banco de dados contendo informações sobre os animais e os respectivos resultados sorológicos, as análises foram realizadas pelo programa SPSS versão 20 e GraphPad Software, com a probabilidade (p) menor que 0,050 como estatisticamente significativa.

A frequência de positivos foi calculada a partir dos resultados das duas técnicas sorológicas avaliadas. As variáveis categóricas (município, origem, sexo, raça e idade) foram expressas por seus valores absolutos e relativos. A comparação dos resultados do testes em relação às variáveis categóricas foi realizada pelo teste Qui-quadrado, exceto quando os valores esperados para a hipótese nula foram menores que cinco, em cuja situação foi utilizado o teste Exato de Fisher ou o teste da Razão da Máxima Verossimilhança. As associações foram avaliadas calculando a *odds ratio* (OR), com intervalo de 95% de confiança. A análise multivariada não foi realizada para os cães pela grande quantidade de dados incompletos e, para os gatos, pelos valores de “n” muito pequenos em algumas “caselas” mostradas na análise bivariada.

Os resultados do ELISA e da RIFI, para as duas espécies, foram comparados pelo teste de McNemar e foi calculado o índice *kappa* (κ) de concordância entre testes. A relação entre os valores de *kappa* e a força de concordância são mostrados no Quadro 1.

Quadro 1 - Relação entre os valores de *kappa* (κ) e a força de concordância entre os resultados de testes diagnósticos.

| Índice <i>Kappa</i> | Concordância |
|----------------------------|---------------------|
| 0,00 | Péssima |
| 0,01 a 0,20 | Ruim |
| 0,21 a 0,40 | Razoável |
| 0,41 a 0,60 | Boa |
| 0,61 a 0,80 | Muito boa |
| 0,81 a 1,00 | Excelente |

Fonte: Adaptado de Landis e Koch, 1977.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES nº 021/2010 para cães e nº 053/2013 para gatos). As coletas nos CCZ e abrigos foram autorizadas pelos respectivos responsáveis (ANEXO A) e, posteriormente, foi obtida a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) dos proprietários dos animais (ANEXO B).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÃES

Dos 378 cães avaliados no estudo, 74,1% eram animais errantes alocados em abrigos temporários e nos canis dos CCZs dos municípios de Vitória, Vila Velha, Serra e Cariacica, e 25,9% eram cães de domicílios das mesmas cidades. Em relação ao sexo, 56,9% eram fêmeas e 39,9% machos, enquanto 12 amostras não foram identificadas. Em relação ao tipo racial, a maioria (84,4%) não apresentava padrão definido e apenas 14,8% eram de raça pura, sendo três cães não identificados. Os dados sobre a idade não foram coletados em 41,0% da amostra; 52,7% tinham idade igual ou superior a um ano e 6,3% tinham menos de um ano de vida. A Tabela 2 ilustra a distribuição dos cães de acordo com origem, sexo, raça e idade nos diferentes municípios.

Tabela 2 - Distribuição dos cães de acordo com origem, sexo, raça e idade em municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013.

| Município | N | Origem | | Sexo | | Raça | | Idade | |
|-------------------|------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| | | Domiciliado n (%) | Errante n (%) | Macho n (%) | Fêmea n (%) | SRD n (%) | Pura n (%) | < 1 ano n (%) | ≥ 1 ano n (%) |
| Vitória | 127 | 32 (25,2) | 95 (74,8) | 64 (50,4) | 60 (47,2) | 106 (83,5) | 21 (16,5) | 3 (2,3) | 66 (52,0) |
| Vila Velha | 109 | 21 (19,3) | 88 (80,7) | 40 (36,7) | 68 (62,4) | 102 (93,6) | 7 (6,4) | 13 (11,9) | 85 (78,0) |
| Serra | 116 | 31 (26,7) | 85 (73,3) | 40 (34,5) | 68 (58,6) | 93 (80,2) | 20 (17,2) | 1 (0,9) | 29 (25,0) |
| Cariacica | 26 | 14 (53,8) | 12 (46,2) | 7 (26,9) | 19 (73,1) | 18 (69,2) | 8 (30,8) | 7 (26,9) | 19 (73,1) |
| Total* | 378 | 98 (25,9) | 280 (74,1) | 151 (39,9) | 215 (56,9) | 319 (84,4) | 56 (14,8) | 24 (6,3) | 199 (52,7) |

*Total de cães avaliados: 378 animais (origem), 366 animais (sexo), 375 animais (raça), 223 animais (idade). SRD: sem raça definida.

5.2 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii* EM CÃES

As amostras de soro de cães testadas pelo ELISA apresentaram IR entre 0,0 e 6,6. Dos 378 cães, anticorpos IgG anti-*T. gondii* foram encontrados em 39,4% (IC95% = 34,7 – 44,4), considerando IR ≥ 1,2. Dos 149 soros positivos, em 25,5% o IR estava entre 1,2 e 2,2; 57,1% entre 2,3 e 3,3; 16,1% entre 3,4 e 4,4 e 1,3% apresentou IR ≥ 4,5.

Por falta de amostra disponível, cinco não foram testadas pela RIFI. Das 373 analisadas por tal método, 38,1% (IC95% = 33,0 – 43,4) foram positivas, apresentando títulos iguais ou superiores a 1:16. Das 142 amostras positivas, 9,9% apresentavam título de 1:16, 18,3% de 1:64, 37,3% de 1:256, 20,4% de 1:1.024, 12,0% de 1:4.096, 0,7% de 1:8.192 e 1,4% de 1:16.384. Não houve diferença estatisticamente significativa entre frequência de cães positivos e o município de procedência, nem pelo ELISA ($p = 0,807$) e nem pela RIFI ($p = 0,186$), como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 378 soros de cães de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013, testados pelo ELISA (IR $\geq 1,2$) e pela RIFI (Título $\geq 1:16$).

| Município | Amostras examinadas | Amostras positivas | | | |
|--------------|---------------------|--------------------|-------------|------------|-------------|
| | | ELISA | | RIFI | |
| | | n | % | n | % |
| Vitória | 127 | 52 | 40,9 | 55 | 43,3 |
| Vila Velha | 109 | 40 | 36,7 | 41 | 37,6 |
| Serra* | 116 | 45 | 38,8 | 34 | 30,6 |
| Cariacica | 26 | 12 | 46,2 | 12 | 46,2 |
| Total | 378 | 149 | 39,4 | 142 | 38,1 |

*Cinco amostras não foram testadas pela RIFI.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos pelo ELISA e pela RIFI na análise de 373 amostras de cães, agrupados de acordo com a concordância ou não entre as técnicas. Foram positivas 148 (39,7%) amostras pelo ELISA e 142 (38,1%) pela RIFI, sendo 161 (43,2%) positivas em pelo menos um dos testes. O número de copositivos foi 129 (34,6%) e o de conegativos 212 (56,8%), resultando numa concordância total de 91,4%, com um índice kappa (κ) de 0,82 (IC95% = 0,76 - 0,88). A análise pelo Teste de McNemar não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as técnicas ($p = 0,377$).

Tabela 4 - Comparação dos resultados das técnicas ELISA (IR $\geq 1,2$) e RIFI (Título $\geq 1:16$) na avaliação de 373 soros de cães de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013.

| | | RIFI | | Total |
|--------------|----------|------------|------------|------------|
| | | Positivo | Negativo | |
| ELISA | Positivo | 129 | 19 | 148 |
| | Negativo | 13 | 212 | 225 |
| Total | | 142 | 231 | 373 |

$p = 0,377$ (Teste McNemar com correção de continuidade)

5.3 ANÁLISE BIVARIADA DE FATORES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii* EM CÃES

5.3.1 Resultados do Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A Tabela 5 apresenta os resultados das frequências de anticorpos determinadas por ELISA em relação as variáveis analisadas. Dos 280 cães errantes, 43,6% foram soropositivos, e dos 98 domiciliados, 27,6%, sendo observada associação estatisticamente significativa entre a sorologia positiva e o fator origem, com OR de 2,030 (IC95% = 1,229 – 3,355, $p = 0,005$), mostrando que cães errantes apresentam cerca de duas vezes mais chance de ser soropositivos em relação aos domiciliados.

Tabela 5 - Frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, por ELISA, de acordo com origem, sexo, raça e idade, em 378 soros de cães de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013.

| Variáveis | n | ELISA IgG | | Odds Ratio (IC95%) |
|-------------------------|-----|-------------------|-------------------|---|
| | | Positivo n (%) | Negativo n (%) | |
| Origem (N**=378) | | | | |
| Domiciliado | 98 | 27 (27,6) | 71 (72,4) | 1 |
| Errante | 280 | 122 (43,6) | 158 (56,4) | 2,030 (1,229 – 3,355) $p = 0,005^*$ |
| Sexo (N**=366) | | | | |
| Macho | 151 | 56 (37,1) | 95 (62,9) | 1 |
| Fêmea | 215 | 88 (40,9) | 127 (59,1) | 1,176 (0,766 – 1,803) $p = 0,459$ |
| Raça (N**=375) | | | | |
| SRD | 319 | 123 (38,6) | 196 (61,4) | 1 |
| Pura | 56 | 24 (42,9) | 32 (57,1) | 1,195 (0,672 – 2,125) $p = 0,543$ |
| Idade (N**=223) | | | | |
| < 1 ano | 24 | 3 (12,5) | 21 (87,5) | 1 |
| ≥ 1 ano | 199 | 90 (45,2) | 109 (54,8) | 5,780 (1,670 – 20,003) $p = 0,002^*$ |

* p -valor < 0,050. N**: número amostral com respostas.

Dos 199 cães que tinham um ano ou mais de vida, 45,2% apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, e dos 24 jovens, 12,5% foram positivos. Foi observada associação significativa entre a presença de anticorpos e a idade, com OR de 5,780 (IC95% = 1,670 – 20,003, $p = 0,002$), revelando que cães adultos apresentam cerca de seis

vezes mais chance de ser soropositivos quando comparados aos jovens. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de anticorpos e o sexo ou a raça dos cães ($p = 0,459$ e $p = 0,543$, respectivamente).

5.3.2 Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A Tabela 6 apresenta os resultados sorológicos da RIFI em relação as variáveis analisadas. Em relação à origem, 41,4% dos 278 errantes e 28,4% dos 95 domiciliados apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, revelando associação estatística significativa entre a sorologia positiva e fator origem, com OR de 1,777 (IC95% = 1,072 – 2,946, $p = 0,025$). Assim, cães errantes apresentam cerca de duas vezes mais chance de ser soropositivos em relação aos domiciliados.

Tabela 6 - Frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, por RIFI, de acordo com origem, sexo, raça e idade, em 373 soros de cães de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2008-2013.

| Variáveis | n | RIFI | | Odds Ratio (IC95%) |
|-------------------------|-----|-------------------|-------------------|---|
| | | Positivo n (%) | Negativo n (%) | |
| Origem (N**=373) | | | | |
| Domiciliado | 95 | 27 (28,4) | 68 (71,6) | 1 |
| Errante | 278 | 115 (41,4) | 163 (58,6) | 1,777 (1,072 – 2,946) $p = 0,025^*$ |
| Sexo (N**=361) | | | | |
| Macho | 150 | 56 (37,3) | 94 (62,7) | 1 |
| Fêmea | 211 | 82 (38,9) | 129 (61,1) | 1,067 (0,693 – 1,642) $p = 0,768$ |
| Raça (N**=370) | | | | |
| SRD | 317 | 119 (37,5) | 198 (62,5) | 1 |
| Pura | 53 | 21 (39,6) | 32 (60,4) | 1,092 (0,602 – 1,981) $p = 0,772$ |
| Idade (N**=220) | | | | |
| < 1 ano | 24 | 3 (12,5) | 21 (87,5) | 1 |
| ≥ 1 ano | 196 | 88 (44,9) | 108 (55,1) | 5,704 (1,647 – 19,750) $p = 0,002^*$ |

* p -valor < 0,050. N**: número amostral com respostas.

Quanto à idade, 44,9% dos 196 cães com um ano ou mais e 12,5% dos 24 jovens apresentaram sorologia positiva, sendo observada associação estatística significativa entre a presença de anticorpos e a idade do animal, com OR de 5,704 (IC95% = 1,647 – 19,750, $p = 0,002$). Dessa forma, cães adultos apresentam cerca de seis vezes mais chance de ser soropositivos quando comparados aos jovens. Semelhante aos resultados do ELISA, não houve associação estatística significativa entre a presença de anticorpos e o sexo ou a raça dos cães ($p = 0,768$ e $p = 0,772$, respectivamente).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE GATOS

Dos 79 gatos avaliados no estudo, 43,0% eram de origem errante alocados no canil do CCZ da Serra e em abrigos temporários dos municípios de Vitória e Vila Velha, e 57,0% eram de domicílios das cidades de Vitória e Cariacica. Em relação ao sexo, 54,4% eram fêmeas e 43,0% machos, sendo dois animais não identificados. Em relação ao tipo racial, a maioria (87,3%) não apresentava padrão definido, enquanto apenas 12,7% eram de raça pura. Em relação à idade, 75,9% tinham idade igual ou superior a um ano, e apenas 20,3% tinham menos de um ano de vida, sendo três animais não identificados. A Tabela 7 ilustra a distribuição dos gatos de acordo com origem, sexo, raça e idade nos diferentes municípios.

Tabela 7 - Distribuição dos gatos de acordo com origem, sexo, raça e idade em municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013.

| Município | N | Origem | | Sexo | | Raça | | Idade | |
|---------------|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | Domiciliado n (%) | Errante n (%) | Macho n (%) | Fêmea n (%) | SRD n (%) | Pura n (%) | < 1 ano n (%) | ≥ 1 ano n (%) |
| Vitória | 34 | 20 (58,8) | 14 (41,2) | 17 (50,0) | 17 (50,0) | 29 (85,3) | 5 (14,7) | 1 (2,9) | 33 (97,1) |
| Vila Velha | 13 | 0 | 13 (100,0) | 5 (38,5) | 6 (46,2) | 13 (100,0) | 0 | 0 | 13 (100,0) |
| Serra | 7 | 0 | 7 (100,0) | 3 (42,9) | 4 (57,1) | 7 (100,0) | 0 | 3 (42,9) | 3 (42,9) |
| Cariacica | 25 | 25 (100,0) | 0 | 9 (36,0) | 16 (64,0) | 20 (80,0) | 5 (20,0) | 12 (48,0) | 11 (44,0) |
| Total* | 79 | 45 (57,0) | 34 (43,0) | 34 (43,0) | 43 (54,4) | 69 (87,3) | 10 (12,7) | 16 (20,3) | 60 (75,9) |

*Total de gatos avaliados: 79 animais (origem), 77 animais (sexo), 79 animais (raça), 76 animais (idade). SRD: sem raça definida.

Dos 45 gatos domiciliados, a maioria tinha acesso à rua (28) e eram alimentados apenas com ração (34). Seis animais recebiam comida caseira, além da comercial. A maioria deles vivia em casas (31) e convivia com cães ou outros gatos (37). Cinco não tiveram recolhidos os dados sobre alimentação, moradia e convivência com outros animais.

5.5 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii* EM GATOS

As amostras de soro de gatos avaliadas pelo ELISA apresentaram IR entre 0,1 e 5,3. Dos 79 gatos, anticorpos IgG anti-*T. gondii* foram encontrados em 15,2% (IC95% = 7,6 – 22,8), considerando IR \geq 1,2. Dos 12 soros positivos, em oito o IR estava entre 1,2 e 2,2 e quatro tiveram IR \geq 2,3.

Todas as amostras foram avaliadas também pela RIFI, sendo 7,6% (IC95% = 2,5 - 13,9) positivas, apresentando títulos iguais ou superiores a 1:16. Das seis amostras positivas, duas apresentavam título de 1:16, uma de 1:64, duas de 1:256 e uma de 1:1.024. Nenhuma das sete amostras do município da Serra foi positiva, para ambos os testes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre frequência de gatos positivos e o município de procedência, nem pelo ELISA ($p = 0,410$) e nem pela RIFI ($p = 0,757$), como visualizado na Tabela 8.

Tabela 8 - Frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 79 soros de gatos de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013, testados pelo ELISA (IR \geq 1,2) e pela RIFI (Título \geq 1:16).

| Município | Amostras examinadas | Amostras positivas | | | |
|--------------|---------------------|--------------------|-------------|----------|------------|
| | | ELISA | | RIFI | |
| | | n | % | n | % |
| Vitória | 34 | 5 | 14,7 | 3 | 8,8 |
| Vila Velha | 13 | 3 | 23,1 | 1 | 7,7 |
| Serra | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cariacica | 25 | 4 | 16,0 | 2 | 8,0 |
| Total | 79 | 12 | 15,2 | 6 | 7,6 |

Os resultados obtidos pelo ELISA e pela RIFI na análise de 79 amostras de soro de gatos são apresentados na Tabela 9. Foram positivas 12 (15,2%) amostras pelo ELISA e 6 (7,6%) pela RIFI. O número de copositivos foi 6 (7,6%) e o de conegativos

foi 67 (84,8%), gerando concordância total de 92,4%, com índice kappa (κ) de 0,63 (IC95% = 0,36 - 0,89). O Teste McNemar mostrou diferença estatisticamente significativa entre as técnicas ($p = 0,041$).

Tabela 9 - Comparação dos resultados das técnicas ELISA ($IR \geq 1,2$) e RIFI (Título $\geq 1:16$) na avaliação de 79 soros de gatos de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013.

| | | RIFI | | Total |
|-------|----------|----------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | |
| ELISA | Positivo | 6 | 6 | 12 |
| | Negativo | 0 | 67 | 67 |
| Total | | 6 | 73 | 79 |

$p = 0,041$ (Teste McNemar com correção de continuidade)

5.6 ANÁLISE BIVARIADA DE FATORES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii* EM GATOS

5.6.1 Resultados do Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os resultados sorológicos do ELISA em relação as variáveis analisadas são apresentados na Tabela 10. Em relação ao sexo dos felinos, 25,6% das 43 fêmeas e 2,9% dos 34 machos apresentaram sorologia positiva, sendo detectada associação estatística significativa, com OR de 11,344 (IC95% = 1,383 – 93,017, $p = 0,007$), entre a presença de anticorpos e o gênero. A chance de gatos fêmeas serem positivos é cerca de 11 vezes maior em relação aos machos. Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre a sorologia positiva e a origem, a raça ou a idade dos felinos ($p = 0,597$, $p = 0,644$ e $p = 0,060$, respectivamente).

Os dados referentes à origem e à idade foram cruzados com aqueles do sexo dos felinos, mas não foram encontradas diferenças na distribuição das respectivas variáveis entre os sexos ($p = 0,181$ e $p = 0,289$, respectivamente).

Tabela 10 - Frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, por ELISA, de acordo com origem, sexo, raça e idade, em 79 soros de gatos de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013.

| Variáveis | n | ELISA IgG | | Odds Ratio (IC95%) |
|------------------------|----|-------------------|-------------------|--|
| | | Positivo n (%) | Negativo n (%) | |
| Origem (N**=79) | | | | |
| Domiciliado | 45 | 6 (13,3) | 39 (86,7) | 1 |
| Errante | 34 | 6 (17,6) | 28 (82,4) | 1,393 (0,407 – 4,772) $p = 0,597$ |
| Sexo (N**=77) | | | | |
| Macho | 34 | 1 (2,9) | 33 (97,1) | 1 |
| Fêmea | 43 | 11 (25,6) | 32 (74,4) | 11,344 (1,383 – 93,017) $p = 0,007^*$ |
| Raça (N**=79) | | | | |
| SRD | 69 | 10 (14,5) | 59 (85,5) | 1 |
| Pura | 10 | 2 (20,0) | 8 (80,0) | 1,475 (0,273 – 7,980) $p = 0,644$ |
| Idade (N**=76) | | | | |
| < 1 ano | 16 | 0 (0) | 16 (100,0) | - |
| ≥ 1 ano | 60 | 12 (20,0) | 48 (80,0) | $p = 0,060$ |

* p -valor < 0,050. N**: número amostral com respostas.

5.6.2 Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A Tabela 11 apresenta os resultados das frequências de anticorpos determinadas pela RIFI em relação às variáveis analisadas. Não houve diferenças estatísticas significativas entre a infecção e a origem, a raça ou a idade dos felinos ($p = 0,394$, $p = 1,000$, $p = 0,333$, respectivamente). Ao contrário dos resultados do ELISA, 11,6% das fêmeas e 2,9% dos machos foram reagentes, mas sem diferença estatística significativa ($p = 0,220$).

Tabela 11 - Frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, por RIFI, de acordo com origem, sexo, raça e idade, em 79 soros de gatos de municípios da Região Metropolitana de Vitória, ES, 2013.

| Variáveis | n | RIFI | | Odds Ratio (IC95%) |
|------------------------|----|-------------------|-------------------|--|
| | | Positivo n (%) | Negativo n (%) | |
| Origem (N**=79) | | | | |
| Domiciliado | 45 | 2 (4,4) | 43 (95,6) | 1 |
| Errante | 34 | 4 (11,8) | 30 (88,2) | 2,867 (0,493 – 16,667) <i>p</i> = 0,394 |
| Sexo (N**=77) | | | | |
| Macho | 34 | 1 (2,9) | 33 (97,1) | 1 |
| Fêmea | 43 | 5 (11,6) | 38 (88,4) | 4,342 (0,482 – 39,076) <i>p</i> = 0,220 |
| Raça (N**=79) | | | | |
| SRD | 69 | 6 (8,7) | 63 (91,3) | - |
| Pura | 10 | 0 | 10 (100,0) | <i>p</i> = 1,000 |
| Idade (N**=76) | | | | |
| < 1 ano | 16 | 0 | 16 (100,0) | - |
| ≥ 1 ano | 60 | 6 (10,0) | 54 (90,0) | <i>p</i> = 0,333 |

p*-valor < 0,050. N: número amostral com respostas.

6 DISCUSSÃO

6.1 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR *T. gondii* EM CÃES E GATOS

Esta foi a primeira pesquisa a determinar a frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de cães e gatos no estado do Espírito Santo. Comparar resultados de soroprevalências da toxoplasmose é difícil, pois existem muitos fatores associados à distribuição da infecção. Além de diferenças em relação às características regionais, como clima e hábitos culturais, o período do estudo, o tamanho amostral e a população estudada influenciam nas frequências encontradas. Devido às particularidades dos ensaios sorológicos, foram feitas comparações entre estudos que utilizaram testes semelhantes e valores de *cut off* diversos.

A amostragem realizada foi por conveniência, com coletas pontuais; nos CCZ, devido à rotina de trabalho, e nos abrigos, pela entrada de animais em períodos irregulares. Esse tipo de amostragem apresenta algumas limitações, como a possibilidade de não representar de forma fidedigna a população da qual foi retirada, ocasionando diferenças entre os valores reais de interesse e os resultados obtidos. Portanto, a partir dos resultados e associações encontrados, não é possível fazer inferências para a população da qual amostra foi extraída (DE OLIVEIRA, 2001).

A frequência de anticorpos anti-*T. gondii* avaliada pela técnica ELISA em 378 cães foi 39,4% (IC95% = 34,7 – 44,4), sendo obtido valor semelhante, de 38,1% (IC95% = 33,0 – 43,4), na análise de 373 soros pela RIFI. Os resultados demonstram contaminação ambiental alta por oocistos, sugerindo grande risco de infecção para seus hospedeiros. Frequências semelhantes foram obtidas em cães atendidos em hospital veterinário de Araçatuba, em São Paulo – 36,8% (GENNARI *et al.*, 2006), e em cães domiciliados e errantes de Uberlândia, em Minas Gerais – 36,7% (SILVA *et al.*, 2007). Valores ainda maiores foram encontrados em animais domiciliados de Uberlândia, em Minas Gerais – 52,7% (CABRAL *et al.*, 1998), e de Pernambuco - 57,6% (FIGUEREDO *et al.*, 2008), atingindo 84,1% (GARCIA *et al.*, 1999a) em área rural do Paraná, e 63,5% (BARBOSA *et al.*, 2003) entre errantes e sem raça definida de Salvador, na Bahia. Outros estudos revelam frequências menores que as encontradas neste trabalho, como 27,2% (ULLMANN *et al.*, 2008) em cães enviados

ao Serviço de Diagnóstico de Zoonoses de Botucatu, em São Paulo, e 22,3% (DE MOURA *et al.*, 2009) em domiciliados das cidades de Lages e Balneário Camboriú, em Santa Catarina.

A frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em 79 gatos foi 7,6% (IC95% = 2,5 - 13,9) pela RIFI e 15,2% (IC95% = 7,6 - 22,8) pelo ELISA, semelhantes estatisticamente. O resultado foi relativamente baixo quando comparado à maioria dos inquéritos sorológicos realizados em outros estados brasileiros e no mundo; entre os que utilizaram a RIFI, esta foi a menor frequência detectada no Brasil. Os resultados foram maiores em gatos domiciliados de Lages, em Santa Catarina - 14,3% (DALLA ROSA *et al.*, 2010), de São Paulo - 17,7% (LUCAS *et al.*, 1999) e de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul - 37,9% (PINTO *et al.*, 2009), atingindo 50,5% (BRAGA *et al.*, 2012) em peridomiciliados de São Luís, no Maranhão. Diferenças ainda maiores foram visualizadas nos estudos de Garcia e colaboradores (1999a), que encontraram 73,0% (119/163) de gatos positivos em Jaguapitã, no Paraná, e por Cavalcante e colaboradores (2006), que obtiveram 87,3% (55/63) de positivos, em Monte Negro, no estado de Rondônia. Ambos avaliaram amostras provenientes de áreas rurais, o que pode ter influenciado na maior frequência, já que estudos sobre a prevalência na população humana evidenciaram maior risco de infecção em ambiente rural (SOUZA *et al.*, 1987; EXCLER *et al.*, 1988), devido aos hábitos e ao contato frequente com as fontes de infecção.

Resultados semelhantes aos obtidos por ELISA neste trabalho foram observados em gatos domiciliados da Cidade do México – 21,8% (BESNÉ-MÉRIDA *et al.*, 2008) e da China - 14,9% (YU *et al.*, 2008), entre errantes do estado da Flórida, nos Estados Unidos – 10,8% (LURIA *et al.*, 2004), e entre domésticos e errantes da Holanda – 18,2% (OPSTEEGH *et al.*, 2012) e de Jerusalém, em Israel – 16,8% (SALANT; SPIRA, 2004). Frequências superiores foram notadas em gatos errantes de áreas urbanas de São Paulo - 40% (MEIRELES *et al.*, 2004), entre domiciliados e errantes da Irlanda – 33,7% (JUVET *et al.*, 2010), e entre gatos domésticos da cidade de Merida, no México – 91,8% (CASTILLO-MORALES *et al.*, 2012) e da Romênia – 47,0% (GYÖRKE *et al.*, 2011). Hong e colaboradores (2013) obtiveram prevalência inferior (2,2%), na Coreia do Sul, e associaram o resultado à restrição da dieta à carne crua ou mal cozida e ao acesso limitado dos felinos à rua.

A análise dos resultados obtidos por município de procedência indica soropositividade semelhante entre eles. Apesar do número de amostras coletadas não ser ideal para estimar a frequência da infecção por cidade, os resultados similares podem estar relacionados à grande proximidade entre as áreas, que compartilham características geográficas e climáticas. Além disso, a possibilidade de migração entre municípios pode gerar imprecisão de análise por região.

Os títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* avaliados pela RIFI mais frequentes nos caninos foram 1:256 (37,3%) e 1:1024 (20,4%), semelhante aos resultados de Canón-Franco e colaboradores (2004), pela RIFI, e de Cabral e colaboradores (1998), pela HI, enquanto títulos iguais ou superiores a 1:4096 representaram 14,1% dos soros positivos. Quanto aos felinos, os mais frequentes foram 1:16 e 1:256 (33,3% em cada), semelhante aos obtidos por Cruz e colaboradores (2011) e Langoni e colaboradores (2001), ambos pela RIFI. Os resultados indicam que os animais foram expostos ao parasito em algum momento, mas não permite avaliar se a infecção é aguda ou crônica, sendo necessário avaliar a presença de anticorpos da classe IgM ou a avidéz alta de anticorpos de classe IgG, sugestivos de infecção recente.

A menor frequência de anticorpos detectada em gatos comparado com cães pode estar relacionada ao fato da maior parte destes serem errantes (74,1% de 378), enquanto a maioria dos felinos, domiciliados (57,0% de 79), sugerindo maior risco de infecção entre os cães. A alimentação mais seletiva dos gatos, em geral, somada a menor ingestão de água e comida, podem expô-los menos à infecção pelo parasito, como discutido por Meireles e colaboradores (2004).

Maior soropositividade foi detectada entre cães errantes, justificada pela maior suscetibilidade deles aos fatores de risco para a infecção, como por exemplo, a ingestão de restos de alimentos encontrados no lixo humano, o contato com roedores e com fezes de gato contaminadas. Os resultados concordam com Mineo e colaboradores (2004) em Uberlândia, estado de Minas Gerais, que encontraram maior prevalência em amostras de CCZ (46,8%, 44/94) em relação às de clínicas veterinárias (17,7%, 11/62) e às de um hospital veterinário (26,8%, 57/213), sugerindo que a origem e a condição de vida do animal parecem influenciar a infecção pelo parasito. Cães de proprietários, porém com acesso à rua, também

estão mais sujeitos à infecção, quando comparado àqueles que vivem estritamente em domicílio, como reportado por De Moura e colaboradores (2009) em Santa Catarina.

A menor frequência de infecção em cães domiciliados pode ser devido a ingestão de comida industrializada e ao menor contato com ambiente externo, reduzindo a possibilidade de transmissão do parasito. Sorologia positiva nesses animais, entretanto, permite a hipótese de que a residência, os alimentos ou a água de abastecimento podem estar contaminados pelas formas infectantes do *T. gondii*, como os oocistos, representando uma possível fonte de infecção para os moradores.

Ao contrário dos cães, não foi encontrada diferença significativa entre gatos errantes e domiciliados quanto à presença de anticorpos anti-*T. gondii*, concordando com DeFeo e colaboradores (2002). Entretanto, Salant e Spira (2004) obtiveram maior prevalência nos domiciliados sem acesso à rua (39%) em relação aos que viviam exclusivamente na rua (14,2%), apesar de terem sugerido que o resultado ocorreu devido a maior idade dos domiciliados, levantando a hipótese de confusão. Discordando dos resultados observados neste estudo, Miró e colaboradores (2004), na Espanha, observaram maior prevalência entre gatos errantes e de áreas rurais (36,4%, 133/365) do que nos domiciliados (25,5%, 56/220), semelhante ao obtido por Dalla Rosa e colaboradores (2010), no município de Lages, Santa Catarina (16,08% e 4,44%, respectivamente).

Dos gatos de domicílio avaliados, mais da metade tinha acesso à rua e a maioria recebia ração diariamente, inclusive aqueles alocados nos abrigos, sendo poucos mantidos com comida caseira. Segundo Afonso, Thulliez e Gilot-Fromont (2006), a alimentação regular dos animais e a ausência ou baixa densidade de presas podem limitar a predação, o que poderia explicar a baixa proporção de positivos observada neste estudo, mesmo o acesso à rua sendo um fator de risco importante, como visto por Lucas e colaboradores (1999) em São Paulo. Além disso, a natureza não aleatória da amostra obtida pode ter contribuído para a frequência de anticorpos reduzida e, somado ao número amostral pequeno, pode ter dificultado a detecção de variáveis associadas a infecção por *T. gondii*.

A idade adulta, de um ano ou superior, foi considerada fator de risco para a infecção canina, e pode ser justificada pela exposição mais prolongada dos adultos ao parasito durante a vida. Resultados semelhantes foram obtidos por Barbosa e colaboradores (2003), que encontraram 70,2% de positivos entre adultos e 14,8% entre jovens, ao avaliar cães errantes da cidade de Salvador. Azevedo e colaboradores (2005) avaliaram 286 amostras coletadas durante uma campanha de vacinação antirrábica, na Paraíba, e também encontraram que a chance de ter anticorpos anti-*T. gondii* aumenta com a idade dos cães, com aqueles maiores de um ano apresentando maior *odds ratio*. Discordando dos resultados deste estudo, Germano, Erbolato e Ishizuka (1985) não encontraram relação com a idade, mas isso se deve a estratificação feita por eles, que considerou faixas etárias variando de um ano (até a idade de dez anos).

Sorologia positiva só foi observada nos gatos adultos e a idade não foi associada à infecção por *T. gondii*. De forma semelhante, Jackson, Hutchison e Siim (1987), ao avaliar gatos errantes e domiciliados na Escócia, não encontraram diferença significativa entre a infecção de felinos com idade inferior ou superior a seis meses de vida. A significância estatística encontrada em nosso estudo ($p = 0,060$), porém, pode revelar uma tendência maior de infecção por *T. gondii* em felinos adultos, como mostrado por Pena e colaboradores (2006), que observaram maior soropositividade entre gatos adultos (maiores de um ano, 41,4%) em relação aos filhotes (13,7%), e por Lopes, Cardoso e Rodrigues (2008), que identificaram a idade igual ou superior a 36 meses como fator de risco.

No caso dos cães, o sexo não foi associado com a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, o que pode ser devido as condições de risco semelhantes a que estão submetidos machos e fêmeas, concordando com os achados de Cabral e colaboradores (1998) e Canón-Franco e colaboradores (2004). Ao contrário, De Brito e colaboradores (2002) demonstraram maior soropositividade em machos, mas isto foi significativo somente quando associado ao consumo de carne crua ou de vísceras, fator de risco importante para a infecção canina.

A detecção por ELISA indicou maior frequência de positivos entre gatos fêmeas, semelhante aos resultados de Jittapalapong e colaboradores (2007), que detectaram anticorpos em 13,7% das fêmeas e em 7,4% dos machos, em gatos errantes da

Tailândia. Da mesma forma, Besné-Mérida e colaboradores (2008), ao avaliar gatos de proprietários da Cidade do México, observaram maior frequência de infecção em fêmeas, propondo que razões genéticas ou endócrinas poderiam explicar o fato. Tal hipótese se aplica ao nosso estudo, pois não foi verificada diferença na distribuição da origem ou da idade entre os sexos ($p = 0,181$ e $p = 0,289$, respectivamente), mas também pode haver algum elemento não identificado confundindo a associação. Ao contrário dos resultados obtidos, porém mais comum, não foi observada relação entre o sexo dos felinos e a infecção nos estudos de Garcia e colaboradores (1999a) e Salant e Spira (2004).

O padrão racial dos cães e gatos avaliados não influenciou na presença de anticorpos específicos, corroborado por Azevedo e colaboradores (2005) e Pinto e colaboradores (2009), respectivamente. Discordando dos resultados observados, Cabral e colaboradores (1998), em amostras de cães domiciliados de Uberlândia, Minas Gerais, observaram maior frequência de positivos entre os mestiços (59,6%, 96/161) do que entre aqueles com raça pura (33,3%, 19/57), associando o resultado aos diferentes manejos sanitário e nutricional a que são submetidos. Entretanto, é provável que a infecção diferencial, se ocorrer, seja devido a outros fatores que aumentam a exposição às fontes infecciosas, como o acesso à rua e a alimentação com carne crua ou mal cozida.

6.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS SOROLÓGICAS ELISA E RIFI

Os resultados encontrados para os cães mostraram uma concordância excelente entre ELISA e RIFI ($\kappa = 0,82$) e as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,377$). Para as amostras dos felinos, houve concordância muito boa ($\kappa = 0,63$), mas as diferenças foram significantes ($p = 0,041$), decorrendo talvez do pequeno número amostral de gatos, o que deixaria mais evidente resultados distintos entre as técnicas. As variações na concordância podem decorrer das diferentes sensibilidades e especificidades dos testes, da condição imunológica e da suscetibilidade das espécies canina e felina, como discutido por Zhu, Cui e Zhang (2012).

Semelhante aos resultados obtidos para as amostras de cães, Silva e colaboradores (1997), em Minas Gerais, analisaram 40 amostras de soro de cães suspeitos de infecção por *T. gondii* e encontraram correlação positiva e significativa (0,69, $p < 0,01$) entre os resultados da RIFI e do ELISA-IgG, recomendando o uso dessas técnicas no diagnóstico da toxoplasmose canina. Ao contrário, Higa e colaboradores (2000), ao avaliar 203 amostras de soro de cães com diferentes condições de saúde, em São Paulo, obtiveram 35,96% de positivos pela RIFI e 81,28% pelo ELISA-IgG, encontrando maior sensibilidade pelo último, com diferença estatística significativa entre os testes. O título de 1:40 na RIFI (contra 1:16 neste trabalho) e o cálculo do *cut off* do ELISA considerado pelos autores podem ter contribuído para as variações em relação aos resultados observados neste estudo. Na avaliação de várias técnicas para detecção de anticorpos em gatos infectados experimentalmente, Dubey e Thulliez (1989) e Dubey, Lappin e Thulliez (1995) observaram que o MAT foi mais sensível em relação ao ELISA-IgG. Entretanto, Zhu, Cui e Zhang (2012) recomendam ambos os testes nas investigações epidemiológicas de toxoplasmose em gatos. Além disso, a RIFI mostrou-se comparável ao MAT na análise de gatos infectados naturalmente, como relatado por Macri e colaboradores (2009), podendo ser também utilizada.

Apesar da RIFI ser o padrão-ouro no sorodiagnóstico da toxoplasmose, devido a sua alta especificidade, o ELISA apresenta muitas vantagens em relação à técnica anterior. Por ser semiautomatizado, a leitura é feita diretamente por um equipamento que detecta a absorbância, tornando-o mais sensível e objetivo quando comparado com a RIFI, cujo resultado é obtido pela visualização das lâminas em microscópio de fluorescência. A sensibilidade também é superior devido ao uso de antígenos sonicados, enquanto a RIFI utiliza o parasito intacto e apenas os antígenos de superfície são apresentados aos anticorpos. Além disso, a realização das reações em microplacas permite a avaliação de várias amostras ao mesmo tempo, o que é muito interessante para pesquisas epidemiológicas que normalmente envolvem a participação de muitos indivíduos.

7 CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo de determinação da frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de cães e gatos no estado do Espírito Santo. Os resultados obtidos demonstram alta contaminação do ambiente pelo parasito e, dessa forma, um grande risco de infecção humana e de outros animais. Por outro lado, o elevado número de gatos suscetíveis alerta para a adoção de medidas preventivas a fim de reduzir a cadeia biológica deste patógeno.

Em síntese:

- Foi encontrada alta frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães, avaliados pelas técnicas de ELISA (39,4%) e RIFI (38,1%)
- A frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos foi pequena, pelo ELISA (15,2%) e RIFI (7,6%)
- Os fatores associados à infecção canina foram a origem errante e a idade igual ou superior a um ano
- O sexo foi único fator relacionado à infecção felina
- Houve excelente concordância ($\kappa = 0,82$) entre os resultados de ELISA e RIFI na avaliação de cães, sendo encontrada concordância muito boa ($\kappa = 0,63$) entre os testes na avaliação de gatos

REFERÊNCIAS

- AFONSO, E.; THULLIEZ, P.; GILOT-FROMONT, E. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 13, p. 1373-1382, Nov. 2006.
- AFONSO, E.; THULLIEZ, P.; GILOT-FROMONT, E. Local meteorological conditions, dynamics of seroconversion to *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*) and oocyst burden in a rural environment. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 8, p. 1105-1113, Aug. 2010.
- AL-QASSAB, S. *et al.* Isolation of *Toxoplasma gondii* from the brain of a dog in Australia and its biological and molecular characterization. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 335-339, Oct. 2009.
- ANDRADE, M. M. C. *et al.* Seroprevalence and risk factors associated with ovine toxoplasmosis in Northeast Brazil. **Parasite**, v. 20, n. 20, May 2013.
- ARAMINI, J. J. *et al.* Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Epidemiology and Infection**, v. 122, n. 2, p. 305-315, Apr. 1999.
- AZEVEDO, S. S. *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 1, p. 51-6, Aug. 2005.
- BALASUNDARAM, M. B. *et al.* Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. **Archives of Ophthalmology**, v. 128, n. 1, p. 28-32, Jan. 2010.
- BARBOSA, M. V. F. *et al.* Frequência de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros de cães errantes da cidade de Salvador-Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 457-465, 2003.
- BARRS, V. R.; MARTIN, P.; BEATTY, J. A. Antemortem diagnosis and treatment of toxoplasmosis in two cats on cyclosporin therapy. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, n. 1-2, p. 30-35, Jan.-Feb. 2006.
- BESNÉ-MÉRIDA, A. *et al.* Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3-4, p. 310-313, Nov. 2008.
- BRAGA, M. D. S. C. D. *et al.* Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cats with outdoor access in São Luís, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 107-111, Apr.-June 2012.
- BRESCIANI, K. D. S. *et al.* Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 143-145, Sept. 1999.
- BRESCIANI, K. D. S. *et al.* Toxoplasmose canina: aspectos clínicos e patológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 189-202, jan.-mar. 2008.

BRESCIANI, K. D. S. *et al.* Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1213-1217, Apr. 2009.

CABRAL, D. D. *et al.* Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Uberlândia-MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 87-90, Aug. 1998.

CAMARGO, M. C. V. D.; ANTUNES, C. M. D. F.; CHIARI, C. D. A. Epidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* no município de Ribeirão das Neves, MG: I. importância dos animais domésticos como fonte de infecção do *T. gondii* para o homem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 3, p. 211-214, jul.-set. 1995.

CAMARGO, M. E. Improved Technique of Indirect Immunofluorescence for Serological Diagnosis of Toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 117-118, May-June 1964.

CAMARGO, M. E.; LESER, P. G.; ROCCA, A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-*Toxoplasma* fluorescent tests. A technique for specific results **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, n. 5, p. 310-313, Sept.-Oct. 1972.

CAÑÓN-FRANCO, W. A. *et al.* Evaluation of the performance of the modified direct agglutination test (MAT) for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 452-456, 2003.

CAÑÓN-FRANCO, W. A. *et al.* Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondonia, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 28, n. 2, p. 113-118, Feb. 2004.

CASTILLO-MORALES, V. J. *et al.* Prevalence and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Cats from the Tropics of Mexico Using Serological and Molecular Tests. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p. 6, 2012.

CAVALCANTE, G. T. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural Western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 863-864, Aug. 2006.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. **Toxoplasmosis: Biology**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>>. Acesso em: 28 set. 2013.

CRUZ, M. D. A. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats from Curitiba, Parana, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 256-258, July-Sept. 2011.

DA COSTA, T. L. *et al.* Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose. **NewsLab**, v. 85, p. 88-104, 2007.

DALLA ROSA, L. *et al.* *Toxoplasma gondii* antibodies on domiciled cats from Lages municipality, Santa Catarina State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 268-269, Oct.-Dec. 2010.

DAVIS, S. W.; DUBEY, J. P. Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 882-886, Dec. 1995.

DE BRITO, A. F. *et al.* Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 31-35, Jan. 2002.

DE MOURA, A. B. *et al.* Ocorrência de anticorpos e fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* em cães, nas cidades de Lages e Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 52-56, jul.-set. 2009.

DE MOURA, L. *et al.* Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 326-329, Feb. 2006.

DE OLIVEIRA, T. M. V. Amostragem não Probabilística: Adequação de Situações para uso e Limitações de amostras por Conveniência, Julgamento e Quotas. **Revista Administração on line. FECAP**, v. 2, n. 3, jul/ago/set. 2001. Disponível em: <http://www.fecap.br/adm_online/art23/tania2.htm>. Acesso em: 9 jan. 2013.

DE SOUZA, S. L. P. *et al.* Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 12, n. 1, p. 1-3, Jan.-Mar. 2003.

DEFEO, M. L. *et al.* Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 12, p. 1714-1717, Dec. 2002.

DUBEY, J. P. Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. **Nature**, v. 262, n. 5565, p. 213-214, July 1976.

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 410-415, June 1995.

DUBEY, J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 6, p. 957-961, Dec. 1996.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, Dec. 2004.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 38, 63-64.

DUBEY, J. P. *et al.* *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 721-726, Aug. 2004.

DUBEY, J. P. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and concurrent *Bartonella* spp., feline immunodeficiency virus, and feline leukemia virus infections in cats from Grenada, West Indies. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 5, p. 1129–1133, Oct. 2009.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, July 2012.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **The Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155-177, Feb. 1972.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, v. 11, n. 4, p. 350-379, July 1974.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, v. 23, n. 4, p. 537-546, Nov. 1976.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; THULLIEZ, P. Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 887-893, Dec. 1995.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. **The Veterinary Clinics of North America: Small animal practice**, v. 39, n. 6, p. 1009–1034, Nov. 2009.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 9, p. 1297-1299, May 1989.

ELMORE, S. A. *et al.* *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190-196, Apr. 2010.

ELSAID, M. M. *et al.* Diagnosis of human toxoplasmosis by a Dot enzyme-linked immunosorbent assay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 2, p. 117-122, Mar.-Apr. 1995.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58-85, Jan. 2013.

ESPÍRITO SANTO (Estado). **Espírito Santo: Geografia**. Disponível em: <<http://www.es.gov.br/EspiritoSanto/Paginas/geografia.aspx>>. Acesso em: 28 set. 2013.

ETHEREDGE, G. D. *et al.* The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 16, n. 3, p. 176-186, Sept. 2004.

EXCLER, J. L. *et al.* Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in Burundi. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 139-141, June 1988.

FERREIRA, M. U. *et al.* A community-based survey of human toxoplasmosis in rural Amazonia: seroprevalence, seroconversion rate, and associated risk factors. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 1, p. 171-176, July 2009.

FIGUEREDO, L. A. *et al.* Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1-2, p. 9-13, Oct. 2008.

FRENKEL, J. K. *et al.* Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 5, p. 458-468, Nov. 1995.

FRENKEL, J. K.; PARKER, B. B. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of xenosmophilia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 791, p. 402-407, July 1996.

FRENKEL, J. K.; RUIZ, A.; CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 3, p. 439-443, May 1975.

GARCIA, J. L. *et al.* Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, estado do Paraná. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 99-104, jan.-mar. 1999a.

GARCIA, J. L. *et al.* Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 6, n. 3, p. 157-163, set. 1999b.

GAUSS, C. B. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1067-1068, Oct. 2003.

GENNARI, S. M. *et al.* Presence of anti-*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with visceral leishmaniosis from the region of Araçatuba, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 613-619, 2006.

GERMANO, P. M. L.; ERBOLATO, E. B.; ISHIZUKA, M. M. Estudo sorológico da toxoplasmose canina, pela prova de imunofluorescência indireta, na cidade de Campinas, 1981. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 22, n. 1, p. 53-58, mar. 1985.

- GYÖRKE, A. *et al.* *Toxoplasma gondii* in Romanian household cats: evaluation of serological tests, epidemiology and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 4, p. 321-328, Dec. 2011.
- HIGA, A. C. *et al.* Evaluation of cross-reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antigens in dogs sera. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 91-95, Aug. 2000.
- HONG, S. H. *et al.* Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in household cats in Korea and risk factors. **Korean Journal of Parasitology**, v. 51, n. 3, p. 357-361, June 2013.
- HOSSEININEJAD, M. Evaluation of an indirect ELISA using a tachyzoite surface antigen SAG1 for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 556-560, Dec. 2012.
- HOSSEININEJAD, M. *et al.* Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 315-9, Oct. 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Brasil: Localidades, 2010**. Disponível em: <ftp://geoftp.ibge.gov.br/organizacao_territorial/localidades/Geomedia_MDB/BR_Localidades_2010_v1.mdb>. Acesso em: 28 set. 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades: Espírito Santo, 2010**. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/232fw>>. Acesso em: 28 set. 2013.
- INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES. **Espírito Santo em Mapas, 2011**. Disponível em: <http://www.ijsn.es.gov.br/Sitio/custom/mapas/es/imagens/MAX_20110510135408_1-2_RMGV.png>. Acesso em: 29 set. 2013.
- JACKSON, M. H.; HUTCHISON, W. M.; SIIM, J. C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in meat animals, cats and dogs in central Scotland. **British Veterinary Journal**, v. 143, n. 2, p. 159-65, Mar.-Apr. 1987.
- JAMES, G. S. *et al.* Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1572-5, Jun. 1996.
- JENUM, P. A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A. G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 1972-1977, Aug. 1997.
- JITTAPALAPONG, S. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 1-2, p. 138-41, Apr. 2007.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis - recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10–25, Jan. 2010.

JUVET, F. *et al.* Prevalence of selected infectious agents in cats in Ireland. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 6, p. 476-482, June 2010.

KIMBITA, E. N. *et al.* Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1–2, p. 35-44, Mar. 2001.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 4, p. 229-235, Ago. 2005.

LANDIS, J. R., KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LANGONI, H. *et al.* Nota prévia. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 243-244, 2001.

LANGONI, H. *et al.* Serological profile of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 142-148, 2006.

LAPPIN, M. R. Update on the diagnosis and management of *Toxoplasma gondii* infection in cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 3, p. 136–141, Aug. 2010.

LAPPIN, M. R. *et al.* Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii* infection in cats by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 9, p. 1580-1585, Sept. 1989.

LAPPIN, M. R. *et al.* Effect of primary phase feline immunodeficiency virus infection on cats with chronic toxoplasmosis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 35, n. 1-2, p. 121-131, Dec. 1992.

LAPPIN, M. R. *et al.* Primary and secondary *Toxoplasma gondii* infection in normal and feline immunodeficiency virus-infected cats. **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 5, p. 733-742, Oct. 1996.

LETSCHER-BRU, V. *et al.* Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6615-6619, Nov. 2003.

LEVINE, N. D. *et al.* A newly revised classification of the protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, Feb. 1980.

LEVINE, N. D. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 35, n. 4, p. 518-520, Nov. 1988.

LINDSAY, D. S. *et al.* Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 73, n. 1-2, p. 27-33, Dec. 1997.

LOPES, A. P.; CARDOSO, L.; RODRIGUES, M. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 3-4, p. 184-189, Aug. 2008.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.

LUCAS, S. R. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatient cats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 4, p. 221-224, July-Aug. 1999.

LURIA, B. J. *et al.* Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 5, p. 287-296, Oct. 2004.

MACRI, G. *et al.* Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. **Parasitology Research**, v. 105, n. 1, p. 35-40, June 2009.

MEIRELES, L. R. *et al.* *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, n. 8, p. 876-81, Aug. 2004.

MINEO, T. W. P. *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 414-417, June 2004.

MIRÓ, G. *et al.* Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 249-255, Dec. 2004.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, Suppl. 1, p. S73-S82, Feb. 2002.

OPSTEEGH, M. *et al.* Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 104, n. 3-4, p. 317-326, May 2012.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385-1394, Oct. 2009.

PENA, H. F. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 58-67, Aug. 2006.

PINTO, L. D. *et al.* Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2464-2469, Nov. 2009.

RAJASEKARIAH, G. H. *et al.* Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, n. 1-2, p. 105-119, June 2001.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, Apr. 2012.

SALANT, H.; SPIRA, D. T. A cross-sectional survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Jerusalem cats. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 3-4, p. 167-177, Oct. 2004.

SCHARES, G. *et al.* Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 14, p. 1525-1537, Dec. 2005.

SCHWAB, K. J.; MCDEVITT, J. J. Development of a PCR-enzyme immunoassay oligoprobe detection method for *Toxoplasma gondii* oocysts, incorporating PCR controls. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5819-5825, Oct. 2003.

SILVA, D. A. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in dogs. A comparative study of immunoenzymatic, immunofluorescent and haemagglutination titers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 785-789, Nov.-Dec. 1997.

SILVA, D. A. *et al.* Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 3, p. 181-195, Aug. 2002.

SILVA, D. A. *et al.* Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, Feb. 2007.

SOUZA, W. J. S. *et al.* Epidemiological aspects of toxoplasmosis in schoolchildren residing in localities with urban or rural characteristics within the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 475-482, Oct.-Dec. 1987.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, Nov. 2000.

ULLMANN, L. S. *et al.* Ações de vigilância continuada, papel do cão como animal sentinela para toxoplasmose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 345-347, 2008.

VOLLER, A. *et al.* A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. **Journal of Clinical Pathology**, v. 29, n. 2, p. 150-153, Feb. 1976.

YU, J. *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in pet dogs and cats in Beijing, China. **Acta Parasitologica**, v. 53, n. 3, p. 317-319, Sept. 2008

ZHU, C.; CUI, L.; ZHANG, L. Comparison of a Commercial ELISA with the Modified Agglutination Test for Detection of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Sera of Naturally Infected Dogs and Cats. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 7, n. 3, p. 89-95, 2012.

ANEXOS

ANEXO A - CARTA AOS CENTROS DE CONTROLE DE ZONÓSES (CCZ) E ABRIGOS

Vitória, _____ de 201_

Prezado Senhor (a) _____,

Venho através desta solicitar a colaboração do _____ para coleta de 2 mL de sangue de cães e de gatos que serão usados no Projeto de mestrado da aluna Kamila da Cunha Covre, intitulado “Frequência de resultados positivos para *Toxoplasma gondii* em exames sorológicos realizados em cães e gatos na Região Metropolitana de Vitória, Espírito Santo, Brasil”, que está sendo desenvolvido na Universidade Federal do Espírito Santo, sob minha orientação no Programa de Pós-Graduação de Doenças Infecciosas.

Atenciosamente,

Dra. Blima Fux
Orientadora

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadora: Kamila da Cunha Covre (Farmacêutica)

Título do Projeto: Frequência de resultados positivos para *Toxoplasma gondii* em exames sorológicos realizados em cães e gatos na Região Metropolitana de Vitória, Espírito Santo, Brasil

Eu, _____,
residente à Rua / Av.: _____ n° _____
Bairro: _____, no município
de _____, portador do RG _____ e
CPF _____, autorizo meu animal de nome
_____, sexo _____, idade _____, raça
_____, espécie _____, para a
realização de uma coleta de sangue, no volume máximo de 2 mL, objetivando o
diagnóstico da toxoplasmose para levantamento da prevalência dessa zoonose, sem
nenhum prejuízo para o animal.

Assinatura do responsável

Data

ANEXO C - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Pesquisadora: Kamila da Cunha Covre (Farmacêutica)

Título do Projeto: Frequência de resultados positivos para *Toxoplasma gondii* em exames sorológicos realizados em cães e gatos na Região Metropolitana de Vitória, Espírito Santo, Brasil

Proprietário: _____

Nome do animal: _____

1. **Moradia:** () casa () apartamento

Tem quintal de terra? _____

2. **Acesso à rua:** () sim () não

3. **O animal é seu desde que nasceu?** () sim () não

De onde ele veio? _____

4. **Tem outros animais em casa?** () sim () não

Quais e quantos? _____

5. **Dieta:** () ração () carne crua () leite Outros: _____

Assinatura do responsável

Data