

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-
Toxoplasma gondii EM AMOSTRAS DE SOROS DE
CÃES DOENTES E APARENTEMENTE SADIOS
PELOS MÉTODOS DE IFI, ELISA E “WESTERN-
BLOT”**

Elaine Vicente Lourenço

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

UBERLÂNDIA - MG
JUNHO - 1997

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-
Toxoplasma gondii EM AMOSTRAS DE SOROS DE
CÃES DOENTES E APARENTEMENTE SADIOS
PELOS MÉTODOS DE IFI, ELISA E “WESTERN-
BLOT”**

Elaine Vicente Lourenço

Prof. Dr^o José Roberto Mineo

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

UBERLÂNDIA - MG
JUNHO - 1997

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

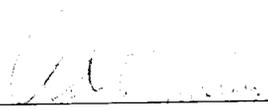
**ANÁLISE DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-
Toxoplasma gondii EM AMOSTRAS DE SOROS DE CÃES
DOENTES E APARENTEMENTE SADIOS PELOS MÉTODOS
DE IFI, ELISA E “WESTERN-BLOT”**

Elaine Vicente Lourenço

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM ___/___/___ Nota ___



Prof. Dr.º José Roberto Mineo



MSc Neide Maria da Silva



Prof.ª MSc Dagmar Diniz Cabral

Uberlândia, ___ de _____ de _____.

"Anular a capacidade de trabalho de um indivíduo é roubar-lhe a própria essência de viver.

Eliminar as dificuldades e os problemas que lhe cercam a sobrevivência é privar o seu raciocínio e inibir a sua criatividade, alienando-a no comodismo e jogando-a no tédio. Pois, somente se compreende a vida como uma luta constante, quando a esperança do amanhã e a vontade de participar e realizar estejam presentes em cada gesto e atitude, porque o desafio é que nos difere das demais espécies.

Temos a capacidade de pensar, produzir, realizar, guiar nosso futuro pelas nossas próprias mãos."

Olavo Bilac

À minha família, que distante procura estar presente através das orações e palavras de conforto.

À minha irmã Emília, pela amizade, companheirismo e compreensão nos meus momentos de dificuldades.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, pela admirável humildade e paciência com que me orientou. Pelo respeito à minha imaturidade e incentivo ao crescimento.

À Deise Aparecida de Oliveira e Silva, pela amizade e participação intensa na realização deste trabalho.

Agradecimentos

À amiga Neide Maria da Silva, pela confiança, bons ensinamentos e por ter acreditado na minha capacidade.

Ao Sr. Alcides, Dona Selma e Everson, pelo aconchego familiar e participação nos momentos de alegria e de dificuldades.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia: Antônio Tomás, Elizabeth, Flávia, Guilherme, Hélio júnior, Maria Aparecida, Maria de Fátima, Patrícia, Sílvia, Simone, pelo incentivo, carinho, paciência e cooperação.

À amiga Elizabeth Oliveira, pela presença constante, atenção e presteza sempre que precisei.

Ao grande amigo Regildo Márcio, pelos agradáveis momentos de lazer e bons ensinamentos.

Aos colegas de curso, Kleber Simônio e Juarez, pela participação no momento de importante decisão.

Às amigas Lícia e Karen Miura, pelos momentos de alegria.

À super mãe Glória Miura, pelas conversas agradáveis, carinho e brilhante exemplo de vida.

Ao Fúlvio e Kazuo Miura, pelo afeto e amizade.

À secretária da coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Edna, pelo estímulo nos momentos de dificuldades.

Às Profs. do Curso de Ciências Biológicas, Ana Coelho, Ana Cunha, Inês, Nora-Ney, pela dedicação à boa formação profissional dos alunos do curso de Ciências Biológicas.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro

Resumo

Toxoplasmose é uma infecção que acomete o homem e animais domésticos e silvestres, porém a manifestação clínica da doença é rara. Em cães, ela se apresenta mais freqüentemente no feto (forma congênita), nos jovens, quando o sistema imune está ainda imaturo ou nos adultos imunodeprimidos apresentando infecções concorrentes.

Este estudo teve como objetivo analisar o perfil imunológico e a reatividade de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soros de cães doentes e aparentemente saudáveis, procedentes do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia e Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia-MG.

Foram analisadas 307 amostras, sendo 173 de cães doentes e 134 de cães aparentemente saudáveis, por meio dos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e imunoenzimático (ELISA). Deste total, 69% das amostras foram também analisadas por “western-blotting” (WB), sendo consideradas positivas as amostras de soros que apresentaram reatividade para o antígeno de superfície SAG-1 (P30) de taquizoítas de *T. gondii*. O critério de positividade para os testes IFI e ELISA foi determinado pelo perfil de reatividade do WB, sendo consideradas amostras positivas quando estas apresentavam título ≥ 32 para IFI e ≥ 64 para ELISA.

Observou-se 143 (46,6%) amostras concordantes positivas IFI+ / ELISA+ e 109 (35,5%) amostras concordantes negativas IFI - / ELISA - ; como resultados discordantes foram encontradas 44 (14,3%) amostras IFI - / ELISA + e 11 (3,6%) amostras IFI + / ELISA -. Os títulos de anticorpos variaram de 32 a 4.096 para IFI e 64 a 32.768 para ELISA, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos de animais doentes e aparentemente saudáveis ($p > 0,05$).

O perfil imunológico das amostras analisadas pelo WB revelou que a predominância de anticorpos com reatividade para SAG-1 (P30) e outras proteínas foi diretamente proporcional aos títulos crescentes de anticorpos detectados pela IFI e ELISA.

O total de positividade nas amostras de soros de animais doentes (42,2%) não foi estatisticamente diferente da positividade encontrada nas amostras de soros de animais aparentemente saudáveis (52,2%). Entretanto, este grupo apresentou índices de positividade significativamente maiores ($p < 0,05$), em relação ao sexo, raça e idade.

Estes resultados indicam que a reação de WB associada aos testes IFI e ELISA constituem métodos eficazes para o estabelecimento seguro da soroprevalência de *T. gondii* em cães.

Palavras chaves: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose canina, testes sorológicos.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Histórico	1
1.2. Taxonomia e habitat	2
1.3. Ciclo biológico do parasita	2
1.4. Morfologia do parasita	4
1.5. Mecanismos de infecção da célula hospedeira pelo <i>Toxoplasma gondii</i>	6
1.5.1. Adesão dos taquizoítas à célula hospedeira	6
1.5.2. Invasão da célula hospedeira	7
1.5.3. Formação do vacúolo parasitóforo	8
1.6. Perfil da toxoplasmose	9
1.7. Toxoplasmose e sistema imune do hospedeiro	11
1.8. <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>	14
1.9. Epidemiologia	15
2. Objetivos	20
3. Material e Métodos	21
3.1. Procedência das amostras de soros	21
3.2. Avaliação sorológica	22
3.2.1. Reação de imunofluorescência indireta	22
3.2.1.1. Preparo do antígeno e das lâminas de imunofluorescência	22
3.2.1.2. Titulação do conjugado anti-IgG de cão-FITC	23
3.2.1.3. Triagem e titulação das amostras de soros de cães pela reação de imunofluorescência indireta	23
3.2.2. Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos	

IgG anti- <i>Toxoplasma</i> nas amostras de soros	24
3.2.2.1. Preparo do antígeno	24
3.2.2.2. Titulação do conjugado Proteína A-peroxidase	25
3.2.2.3. Titulação das amostras de soros pelo teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	25
3.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e “western-blot”	26
3.2.3.1. Obtenção do antígeno	26
3.2.3.2. Preparação do antígeno criólise	27
3.2.3.3. Dosagem protéica	27
3.2.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
3.2.3.5. Reação de “western-blot”	29
3.3. Cálculo das sensibilidade e especificidade e análises estatísticas	30
4. Resultados	32
4.1. Títulos de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de soros de cães doentes e aparentemente saudáveis	31
4.2. Comparação dos resultados da sorologia por imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA com “western blot”	36
4.3. Cálculo da sensibilidade e especificidade das reações de IFI e ELISA	39
4.4. Resultados discordantes e concordantes por imunofluorescência indireta e ELISA	42
4.5. “Western blot” de amostras com resultados concordantes positivos por imunofluorescência indireta e ELISA	46
4.6. “Western blot” de amostras com resultados discordantes por imunofluorescência indireta e ELISA	47

4.7. “Western blot” de amostras com resultados concordantes negativos por imunofluorescência indireta e ELISA	50
4.8. Agrupamento das amostras de soros	52
4.9. Soroprevalência de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> nas amostras de soros pelos testes IFI e ELISA segundo “western blot”	52
5. Discussão	55
6. Conclusões	62
7. Referências Bibliográficas	64

INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

Toxoplasma gondii, protozoário parasita intracelular obrigatório, infecta uma ampla variedade de células de mamíferos e aves. Foi descrito pela primeira vez em 1908 por Splendore em coelho de laboratório no Brasil e por Nicole e Manceaux, no mesmo ano, que o encontrara no cérebro de um roedor do Norte da África (Pessôa, 1982). Posteriormente, ele foi identificado em inúmeras espécies de animais domésticos, silvestres e no homem.

O nome do roedor onde foi primeiramente encontrado (*Ctenodactylus gondi*) deu nome à espécie do parasita (Pfefferkorn, 1990), o nome do gênero deriva das letras gregas *taxon* (arco) e *plasma* (forma), devido à forma de lua crescente em que o parasita é mais comumente observado (Neto et al., 1995).

1.2- Taxonomia e Habitat

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário pertencente ao Reino Protista, Sub-Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidia, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *T. gondii*.

Apresenta ampla distribuição geográfica infectando diversos tipos de células de hospedeiros que compreende o homem, aves e mamíferos domésticos e silvestres. Nestes hospedeiros, é encontrado infectando células e tecidos como fígado, baço, pulmão, retina, sistema nervoso central, músculo estriado esquelético e músculo estriado cardíaco. Sobrevive em líquidos orgânicos como saliva (Dubey, 1985), esperma, líquido peritoneal, humor aquoso e leite (Hall, 1992).

1.3- Ciclo Biológico do Parasita

O *Toxoplasma gondii* apresenta ciclo de vida heteroxeno, ou seja, necessita hospedeiros definitivos e hospedeiros intermediários para completar seu ciclo.

Durante o ciclo, apresenta uma fase enteroepitelial que ocorre no epitélio dos felídeos, hospedeiros definitivos, principalmente do gato doméstico e uma fase extra-intestinal, nos hospedeiros intermediários, onde ocorre a reprodução assexuada (Pessôa, 1982; Neto, 1995).

Quando os felídeos se infectam, o parasita invade as células epiteliais da mucosa intestinal reproduzindo-se assexuadamente e sexuadamente (Pessôa, 1982). Da reprodução sexuada resulta oocistos imaturos que são eliminados nas fezes dos gatos no período de duas a três semanas após a infecção. No ambiente, eles necessitam de no mínimo 24 horas para se tornarem maduros (Sullivan &

Pardo, 1993) sob condições ótimas de temperatura e umidade (Feldman, 1982). Após a maturação, eles se tornam infectantes para gatos, aves e outros animais mamíferos silvestres e domésticos, inclusive o homem. Na forma infectante, oocistos maduros, apresentam no seu interior 2 esporocistos cada um com 4 esporozoítas (Rey, 1991).

No meio externo, os oocistos maduros resistem vários meses. Quando os oocistos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, os esporozoítas são liberados no tubo digestivo destes e penetram nas células do sistema fagocítico monocitário (SFM). Multiplicam-se rapidamente sob a forma de taquizoítas no interior das células hospedeiras que são lisadas liberando esses parasitas para o meio extracelular onde estão livres para invadir novas células (Sullivan & Pardo, 1993).

Essa multiplicação rápida com a formação de taquizoítas (do grego *tachys*= rápido) compreende a fase aguda ou proliferativa da infecção (Pessoa, 1982). Aproximadamente 8 - 10 dias após a infecção, em resposta ao estabelecimento de uma resposta imune, os parasitas se encistam em vários tecidos, especialmente no cérebro caracterizando a fase crônica e latente da infecção. Nesta fase, os protozoários são denominados bradizoítas (do grego *bradys*= lento) e se diferem dos taquizoítas por apresentarem multiplicação lenta e alta resistência à pepsina (McLeod *et al.*, 1991).

Os protozoários permanecem nesta forma cística até por ocasião de uma queda na resistência do sistema imune ou, caso isto não ocorra, perdura por toda a vida do hospedeiro (Rey, 1991; Ambroise-Thomas & Pelloux, 1993).

1.4- Morfologia do Parasita

Os protozoários medem 4 a 8 μm de comprimento por 2 a 4 μm de largura. Apresentam núcleo localizado no meio do corpo ou próximo à extremidade posterior, uma membrana externa simples e uma membrana interna dupla que é fenestrada e incompleta (Rey, 1991).

Na extremidade anterior (mais afilada), também denominada pólo apical, encontram-se o conóide, roptrias e micronemas (Neves, 1991). O conóide é uma concavidade no pólo anterior revestida por proteínas capazes de aderir à célula hospedeira, tendo ainda o anel polar a sua volta que lhe dá uma estrutura relativamente estável (Neto et al., 1995)

Os cistos que se formam na fase crônica da infecção medem entre 20 a 200 μm , podendo ser alongados ou achatados dependendo do tecido onde se encontram (Rey, 1991).

Embora entre a forma estrutural de taquizoítas e bradizoítas não haja muita diferença, a estrutura antigênica do parasita é complexa. Durante o ciclo de vida do *Toxoplasma* há antígenos específicos para cada estágio (Lunde & Jacobs, 1983) e antígenos comuns entre eles. Proteínas da forma taquizoíta da cepa RH de aparente peso molecular 41 (P43), 35 (P35), 32 (P30), 23 (P23) e 21 (P22) kDa foram descritas e estudadas por vários autores (Couvreur et al., 1988; Parmley et al., 1992). Nos estágios oocistos e esporozoítos foram detectados antígenos de aproximadamente 25, 67 e 190 kDa (Sharma, 1990; Kasper et al., 1984). Weiss e colaboradores, identificaram em bradizoítas antígenos de 28 kDa e 116 kDa que não estão presentes em taquizoítas (Weiss et al., 1992).

A P43, P35, P30 e P22 são os quatro principais antígenos de superfície de taquizoítas (Couvreur et al., 1988), mas foi observado que a P43 apresenta reação positiva com soro de camundongo e rato anti-bradizoíta (Darcy et al., 1990). A presença de antígenos específicos de bradizoítas antes da formação de cistos,

durante a transição da fase aguda para a fase crônica da infecção, revela a ocorrência de um estágio intermediário na diferenciação de taquizoítas em bradizoítas (Soete et al., 1993).

Outras evidências de antígenos comuns entre estágios diferentes foram determinadas por meio de reação de imunofluorescência. Através desta, antígenos do estágio taquizoíta, bradizoíta e esporozoíta apresentaram marcação fluorescente frente a antisoros heterólogos (Ángel et al, 1991).

Foram descritas também características antigênicas entre diferentes cepas. Darcy e colaboradores (1990), descreveram que os antígenos de taquizoítas da cepa RH com pesos moleculares 63, 43, 39 e 28,5 kDa compartilham epitopos comuns a antígenos de bradizoítas da cepa 76K. Entretanto, a P30 e P22 mostraram ser mais eficientemente reconhecidas por soro anti-cepa RH do que por soro anti - cepas P e C, em ensaios de imunoblot (Ware & Kasper, 1987).

Essas diferenças antigênicas entre os tipos de cepas virulentas e avirulentas não é significativa visto que soro de camundongo cronicamente infectado com uma determinada cepa precipita mesmas proteínas reconhecidas por diferentes soros de camundongos infectados com outras cepas (Handman et al, 1980).

Entre os antígenos da forma taquizoíta, a SAG-1 (P₃₀) é uma proteína altamente imunogênica que apresenta peso molecular compreendido entre 30-35 kDa. Constitui cerca de 5% do total das proteínas neste estágio do protozoário (McLeod, 1991) e, juntamente com a SAG-2 (P22), está homogeneamente distribuída por toda a membrana do taquizoíta (Grimwood e Smith, 1995). A habilidade de diferentes anticorpos monoclonais reconhecerem uma única região da P30 e de inibirem 25 a 50% da ligação de anticorpos de pacientes com toxoplasmose para extratos de taquizoítas demonstra que uma única região desta molécula contem a maior parte da atividade imunogênica (Rodriguez et al., 1985)

1.5- Mecanismos de infecção da célula hospedeira pelo *Toxoplasma gondii*

1.5.1- Adesão dos taquizoítas à célula hospedeira

Um dos eventos muito discutidos entre pesquisadores e que não está totalmente elucidado se refere ao processo de invasão ou penetração do parasita na célula hospedeira.

Segundo Mineo e colaboradores (1994), o primeiro passo requerido para que ocorra invasão é o ligamento do parasita à membrana da célula hospedeira via receptores de membrana. Estudos têm revelado que SAG-1 (P30) pode ser um importante ligante do receptor da célula hospedeira, visto que anticorpos monoclonais e policlonais contra este antígeno inibem significativamente a adesão de taquizoítas para estas células (Grimwood & Smith, 1992; Kasper & Mineo, 1994; Mineo *et al.*, 1994; Grimwood & Smith, 1996). Por outro lado, anticorpos contra outra proteína de superfície de taquizoíta, a SAG-2 (P22), não alteraram a infecção *in vitro*. Também, anticorpos produzidos contra parasitas mutantes deficientes de P30, não apresentaram efeito significativo na infecção da célula hospedeira por cepas que expressam a P30 (Kasper & Mineo, 1994).

A eficiência da adesão do parasita à célula hospedeira pode estar diretamente relacionada com a fase do ciclo celular. A capacidade do *T. gondii* infectar células de mamíferos parece aumentar durante a passagem da fase G₁ para a fase S do ciclo de crescimento e diminuir quando as células entram na fase G₂ (Youn *et al.*, 1991 apud Mineo e Kasper, 1994). Na fase S, é maior o número de receptores na superfície celular podendo explicar o aumento na taxa de adesão dos parasitas para as células que se apresentam nesta fase (Grimwood *et al.*, 1996).

No reconhecimento da célula hospedeira pelo parasita podem ainda estarem envolvidas moléculas “lectin-like” presentes na superfície do parasita

(Kasper & Mineo, 1994). Lectinas são proteínas ligantes de carboidrato que medeiam interações célula-a-célula. Receptores de glicoproteínas e de lectinas foram indentificados em *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Entamoeba* que estão envolvidos na interação parasita-célula hospedeira (Werk, 1985; Saffer & Petri Junior, 1991).

Foi demonstrado que *Toxoplasma gondii* se liga fortemente a glicosamida de soroalbumina bovina, glicosamida-BSA (Robert et al., 1991). Esta glicoproteína bloqueia competitivamente a infecção de fibroblastos humanos por diferentes tipos de taquizoítas positivos para P30, enquanto tem pouco efeito na infecção por parasitas deficientes de P30 (Mineo et al., 1993). Pelo fato de glicoproteínas estarem presentes na superfície de uma grande variedade de células, o entendimento da característica da ligação do *Toxoplasma* para esta glicoproteína poderá confirmar se esta interação representa um evento crítico no mecanismo pelo qual este parasita entra na célula hospedeira (Robert et al., 1991).

1.5.2- Invasão da célula hospedeira

Uma vez na superfície da célula, se dá invasão, um evento que é concluído entre 10 a 15 segundos, aproximadamente. Este processo envolve organelas do complexo apical (conóide, roptrias e micronemas), microfilamentos de actina (Sibley, 1995) e os movimentos de ondulação apresentados pelo parasita (Werk, 1985; Joiner & Dubremetz, 1993).

Com a extremidade anterior em contato com a membrana plasmática do hospedeiro, o conóide é protraído e as roptrias e micronemas secretam uma substância denominada “penetration-enhancing factor” (Werk, 1985; 1986; Werk, 1989; Pfefferkorn, 1990). O papel bioquímico deste material permanece

incerto mas, provavelmente altera as propriedades da membrana promovendo a penetração do *Toxoplasma gondii* na célula hospedeira.

Além dos microtúbulos presentes no citoesqueleto de taquizoítas há ainda miosina e actina na extremidade anterior do parasita, sendo que actina distribui-se também pelo citoplasma. Provavelmente elas estão envolvidas com a protusão do conóide no início da invasão (Joiner & Dubremetz, 1993).

1.5.3- Formação do Vacúolo Parasitóforo

Durante a invasão, a célula hospedeira parece apresentar um papel ativo no processo produzindo invaginação na região anterior dos taquizoítas aderidos (Werk, 1985). Esta invaginação prossegue envolvendo o parasita até o final da invasão constituindo a membrana do vacúolo parasitóforo (Kimata *et al.*, 1987), onde o parasita iniciará seu crescimento. Este vacúolo é incapaz de acidificar ou fundir com organela ligante de membrana dentro do sistema endocítico da célula hospedeira dando condições de sobrevivência ao parasita (Joiner & Dubremetz, 1993).

Parece que esta propriedade de não sofrer fusão com as membranas lisossomais da célula hospedeira e, conseqüentemente, a ausência de enzimas digestivas se deve a modificações da membrana do vacúolo em relação à membrana da célula hospedeira (Werk, 1989; Sibley, 1995). Segundo Kimata & Tanabe (1987), esta membrana é modificada por uma proteína de 66 kDa, secretada pelo parasita durante a penetração, e pela proteína de 30 kDa (P30), secretada durante o desenvolvimento no interior do vacúolo.

1.6- Perfil da Toxoplasmose

A toxoplasmose, zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, pode ocorrer pela via congênita ou adquirida.

A infecção adquirida ocorre quando a pessoa ou animal está na fase adulta do seu desenvolvimento. Toxoplasmose adquirida pós-natalmente se desenvolve normalmente pela ingestão de cistos ou oocistos maduros em comida contaminada. Na França, a causa mais freqüente de contaminação na população é a transmissão de cistos através de carne mal cozida, enquanto a contaminação pela ingestão de oocistos é muito rara (Desmonts et al., 1965 apud Ambroise-Thomas & Pelloux, 1993).

Geralmente a infecção é assintomática sendo a toxoplasmose aguda e infecção em indivíduos imunocomprometidos as mais sérias formas da doença. Não é conhecida a proporção do total de casos em que a infecção é assintomática, mas provavelmente varia de acordo com a linhagem do parasita adquirido (Hall, 1992).

Após a aquisição inicial do parasita ocorre uma ampla distribuição do parasita pelo corpo do hospedeiro (Hall, 1992). A fase aguda da infecção, caracterizada pela multiplicação ativa de taquizoítas no interior de células nucleadas, muda para fase latente durante a qual os organismos se encistam em muitos tecidos, principalmente no músculo esquelético, cardíaco e cérebro (Hall, 1992; Rothova, 1993).

A multiplicação ativa dos taquizoítas dentro das células nucleadas durante o estágio agudo da infecção é bloqueada por mecanismos imunológicos. Taquizoítas extracelulares são destruídos por anticorpos. A imunidade celular apresenta também importante papel principalmente quando os parasitas estão no interior das células (Ambroise-Thomas & Pelloux, 1993).

Na fase crônica, os parasitas permanecem encistados e viáveis durante toda a vida do hospedeiro sem afetar a saúde de hospedeiros imunocompetentes. Sua existência é indicada pela presença de anticorpos IgG específicos para *Toxoplasma* e a prevalência de soropositivos varia entre diferentes populações, dependendo dos hábitos alimentares, clima, etc (Rothova, 1993).

Em caso de imunodepressão, como em pacientes que se submeteram a cirurgia para transplante de órgão ou em pacientes com AIDS, os cistos podem ser reativados e induzir sérios problemas. Nos dois casos a depleção do sistema imune pode induzir reativação de infecção latente com liberação de taquizoítas dos cistos causando infecção disseminada (Ambroise-Thomas & Pelloux, 1993), que pode ter sérias consequências como encefalite, miocardite, danificar o tecido local como na retinocoroidite toxoplásmica (Hall, 1992). Entretanto, em casos de transplante de órgãos a infecção pode ainda ser devido a reativação de cistos presentes no próprio órgão transplantado (Ambroise-Thomas & Pelloux, 1993).

Em pessoas com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a toxoplasmose é a mais comum causa de lesões cerebrais e se desenvolve em aproximadamente um terço dos soropositivos (Sharma, 1990).

A infecção congênita pode ocorrer quando uma mulher grávida é infectada ou por ocasião de reagudização de infecção latente. Durante a parasitemia, o *Toxoplasma* atravessa a placenta e invade os tecidos do feto em desenvolvimento. As consequências da infecção dependem do tempo de gestação, sendo mais grave a infecção adquirida durante os primeiros estágios de gravidez (Rothova, 1993).

Aproximadamente 40% das crianças de mães infectadas se tornarão também infectadas e destas, somente uma pequena proporção exibirá sinais clínicos logo após o nascimento (Rothova, 1993; Hall, 1992). Isto acontece porque a rápida multiplicação dos taquizoítas nos tecidos do feto ocorre por um

curto período de tempo se transformando em bradizoítas e encistando devido a presença de anticorpos maternos no local (Ambroise-Thomas & Pelloux, 1993).

Muitos bebês com toxoplasmose congênita são assintomáticos no nascimento ou apresentam sintomas não específicos como crescimento intrauterino retardado e hepatoesplenomegalia, podendo ou não, em seguida, desenvolver sequelas. Ao passo que, uma minoria de recém-nascidos infectados congenitamente apresentam manifestações severas no nascimento ou durante a infância. Dentre as manifestações incluem hidrocefalia, calcificação intracranial e retinocoroidite (Hall, 1992).

Das crianças infectadas congenitamente e assintomáticas no nascimento, aproximadamente oitenta por cento (80%) desenvolverão em algum período da vida sequelas neurológicas e/ou oculares (Rothova, 1993).

1.7- Toxoplasmose e Sistema Imune do Hospedeiro

A toxoplasmose é acompanhada pelo desenvolvimento da resposta imune mediada por célula e resposta imune humoral específica que destrói muitos taquizoítas. Nos homens com toxoplasmose, anticorpos IgM podem ser detectados nos primeiros 7 dias após a infecção. Anticorpos IgG aparecem dentro de 1 a 2 semanas pós infecção. O título aumenta rapidamente atingindo valor máximo dentro de aproximadamente 6 semanas declinando gradualmente até a persistência de baixos títulos durante toda a vida (Sharma, 1990). Entretanto, um título muito alto de IgG não é indicativo de infecção recente.

O desenvolvimento de títulos de anticorpos para *Toxoplasma* é influenciado também pela imunocompetência de indivíduos infectados, assim como pela forma e estágio da doença (Suter et al., 1984). Outros fatores como virulência da cepa, baixas quantidades de cistos ou oocistos e taquizoítas que

produziram a infecção natural, manuseio e condições de estoque dos soros podem interferir no nível de anticorpos (Svoboda, 1987).

Os taquizoítas que escapam da destruição se transformam em bradizoítas e ficam dentro de cistos. Desta forma, observa-se que a imunidade não determina o fim da infecção mas, impede a multiplicação de taquizoítas e a destruição de célula hospedeira (Sharma, 1990).

Os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ são as principais células efetoras na manutenção da infecção crônica. Estas células parecem agir sinergicamente para prevenir a reativação do parasita durante o estágio crônico da infecção (Yamamoto & Gonçalves, 1997). Segundo Gazzinelli e colaboradores (1991), estudando *in vivo* a imunidade a *T. gondii* induzida por vacina, o efeito sinérgico de células T $CD4^+$ está relacionado, provavelmente, ao aumento de $INF-\gamma$ pelas células $CD8^+$.

Em camundongos com infecção crônica e timectomizados foi observado o aparecimento de taquizoítas no exsudato peritoneal ao mesmo tempo em que apresentaram um declínio na porcentagem de subpopulação de linfócitos T. Baixos níveis de anticorpos nestes animais demonstraram que anticorpos não são importantes para estabelecer imunidade mas podem prevenir a disseminação dos parasitas durante a infecção crônica (Goyal et al., 1989). Cães que passaram por tratamento de imunossupressão química morreram com toxoplasmose generalizada (Dobos-Kovács & Varga, 1982).

Vollmer et al. (1987) apud Kasper & Boothroyd, 1993, estudaram a importância das subpopulações de células T helper $CD4^+$ em toxoplasmose experimental. Eles detectaram que camundongos com infecção aguda e crônica morrem quando depletados de linfócitos $CD4^+$.

Em relação às células T $CD8^+$, trabalhos sugerem que o *Toxoplasma* induz aumento no seu número. Um número maior de células T $CD8^+$ foi observado em

peessoas com infecção sintomática após estimulação com antígenos do parasita e em pessoas com infecção adulta (Kasper & Boothroyd.).

Muitos pesquisadores estão investigando a função das citocinas liberadas pelas células T. Células T CD4⁺ e CD8⁺ produzem INF- γ através da secreção de IL-2 e células Natural Killer (NK) (Gonçalves & Yamamoto, 1997). INF- γ apresenta papel importante na imunidade contra vários patógenos com ciclo intracelular facultativo ou obrigatório (Peleman et al., 1989; Suzuki et al, 1990; Silva et al., 1992; Hunter & Remington, 1994). Estudos em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* apresentaram um excelente modelo da importância de INF- γ no controle da infecção aguda em camundongos geneticamente resistentes. A parasitemia nestes animais teve significativo aumento em grupos tratados com anticorpo monoclonal anti-INF- γ (Silva et al, 1992).

Em camundongos infectados com *Toxoplasma*, a administração de INF- γ reduziu significativamente as lesões no cérebro sugerindo que esta citocina induz morte ou previne a proliferação de taquizoítas no cérebro (Suzuki et al., 1990).

A atividade protetora de INF- γ está associada principalmente com a ativação de macrófagos. INF- γ e TNF- α ativam macrófagos e estes inibem a replicação de parasitas através da produção de radicais livres de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio (RNI) (Hunter & Remington, 1994;).

T. gondii e outros patógenos podem estimular diretamente macrófagos a produzirem IL-12 e TNF- α (Hunter & Remington, 1994). Khan e colaboradores (1996), observaram que a administração exógena de IL-12 para camundongos da linhagem IRF-1^{-/-} infectados com *Toxoplasma* resultou em aumento significativo da sobrevivência dos animais. Porém, uma vez estabelecida a infecção a importância de IL-12 parece ser reduzida porque, mesmo continuando com a terapia, todos os camundongos morreram. Isto pode sugerir que IL-12 é um

importante modulador da resposta do hospedeiro somente durante o estágio agudo da infecção.

As citocinas, IL-12 e TNF- α , produzidas por macrófagos, induzem a produção de INF- γ pelas células NK, e, conseqüentemente, a ativação da atividade microbicida de macrófagos. Estes eventos podem atuar como primeira linha de defesa na resistência a infecções antes do desenvolvimento da resposta de células T (Hunter & Remington, 1994).

1.8-*Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*

Até 1988, os sinais clínicos da neosporose, infecção em cães provocada pelo protozoário *Neospora caninum*, foram erroneamente diagnosticados como toxoplasmose (Lindsay *et al.*, 1990). Contrário à toxoplasmose, a neosporose é considerada ser um patógeno exclusivo de cães e a característica predominante da infecção é a paralisia dos membros posteriores (Dubey, 1989).

Não há reação sorológica cruzada entre *Toxoplasma gondii* e *N.caninum* (Dubey, 1989; Morales, 1995). Os dois se diferenciam antigenica e estruturalmente. Análises estruturais mostraram que somente bradizoítas de *T. gondii* apresentam microporos e grânulos de amilopectina são mais eletrodensos em *T. gondii* (Bjerkas & Dubey, 1991). Taquizoítas de *N. caninum* apresentam roptrias mais eletrodensas e forma cistos somente no tecido neural ao passo que cistos de *T. gondii* são encontrados em muitos órgãos e tecidos como músculo estriado cardíaco e esquelético, pulmão, fígado, sistema nervoso (Dubey & Lindsay, 1983).

1.9-Epidemiologia

Toxoplasma gondii apresenta ampla distribuição geográfica infectando diversos tipos de células de hospedeiros que compreende o homem, aves e mamíferos silvestres e domésticos. Causa lesões em diversos órgãos (Rothova, 1993). Lesões no músculo esquelético e cordão nervoso foram observadas em cães com menos de um ano de idade (Braund et al., 1986).

O parasita é responsável pela zoonose conhecida por toxoplasmose, uma enfermidade cujo grau de infecção varia de uma área a outra e há indicação da influência do clima na sua prevalência (Maldonado, 1986)

Estudos sorológicos em humanos indicam que de 20 a 90 % da população adulta foi infectada por *Toxoplasma* e sérias doenças devido a presença deste parasita ocorre em crianças congenitamente infectadas e em pacientes imunodeprimidos (Handman, 1980). No Brasil, pesquisas mostram uma frequência média em torno de 60% de contato com o parasita para mulheres adultas, com discretas variações regionais (Neto, 1995).

Animais domésticos como gatos, cães, equinos e bovinos apresentam evidências de sorologia positiva para *Toxoplasma gondii*. Cães capturados na província de Granada demonstraram alto índice de reações positivas (79,05%) para *T. gondii* demonstrando que são altamente susceptíveis à infecção (Maldonado e al., 1986).

No município de São Paulo resultados de soroprevalência para toxoplasmose em cães revelou a incidência de 63,8% de soropositivos (Ishizuka & Yasuda, 1981). Em Campinas, São Paulo, a prevalência da infecção nestes animais foi igual a 91% (Germano et al, 1985). Em nenhum dos dois estudos houve diferença estatisticamente significativa entre o sexo dos animais.

A toxoplasmose clínica em cães foi primeiramente descrita por Melo no ano de 1910, em Turin na Itália e, em 1911, por Carini (Brasil) e 1913 por Carini

e Maciel. Desde então, a toxoplasmose clínica e subclínica tem sido relatada em cães de muitos países (Pimenta *et al.*, 1993).

Nestes animais a toxoplasmose é secundária frequentemente concorrente com o vírus da cinomose (Dubey *et al.*, 1989; Dubey *et al.*, 1991; Ehrensperger & Pospischil, 1989) e outros agentes ou condições imunossupressoras (Harmelin, *et al.*, 1992). Antes da descoberta da vacina contra o vírus da cinomose, foi descrito numerosos casos de toxoplasmose canina fatal (Morales, 1995).

Não só os cães com cinomose desenvolvem toxoplasmose em atividade. Reimann *et al.* (1978) encontraram alta prevalência de sorologia positiva para o *T. gondii* entre cães com doenças renais ou com hiperfunção da adrenocortical, citando também o “stress” por hospitalização como responsável pela reativação da infecção.

Harmelin *et al.* (1992), relataram um caso de toxoplasmose em cão associado a *Hepatozoon canis* e Lindsay *et al.* (1990), observaram a ocorrência de infecções concorrentes de *T. gondii* e *Neospora caninum*.

A incidência de infecção pelo *Toxoplasma* foi estudada em outros animais domésticos. Foi descrito índices de 38,95% de soropositividade para toxoplasmose em bovinos da cidade de Machagai, província do Chaco. Isto demonstra a importância destes animais na epidemiologia da infecção. Estes animais constituem importante risco de contaminação para o homem seja por eventuais acidentes durante os estágios de preparo da carne em matadouros ou pelo consumo de carne mal cozida e leite cru (Marder *et al.*, 1990). Há evidências de que animais infectados eliminam parasitas no leite, sendo este um veículo de infecção para humanos (Skinner *et al.*, 1990 apud Hall, 1992).

Estudos de soroprevalência de anticorpos anti-Toxoplasma foi realizado em animais domésticos e humanos da cidade Ahwaz na província Khoozestan, Iran (Hoghooghi-Rad & Afraa, 1993). As taxas de soropositividade encontradas parecem não sofrer muita influência de oocistos porque gatos não são criados

como animais de estimação e as condições climáticas são desfavoráveis à sobrevivência de oocistos. Então, a ingestão de carne mal cozida de animais infectados parece ser a razão da presença de soropositividade nas pessoas.

Evidências que relacionam a toxoplasmose humana com o hábito de criação de animais de estimação, principalmente cães (Jackson *et al.*, 1987; Frenkel *et al.*, 1995) despertaram para a necessidade de investigações sobre o papel destes na distribuição da toxoplasmose (Svoboda, 1987).

A possibilidade de aquisição de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em crianças da cidade do Panamá, foi estudada no período de agosto 1987 a julho 1992. Observou-se que 12,6% das crianças acompanhadas se tornaram positivas e foi registrado uma alta correlação entre soroconversão de crianças e contato com cães e gatos (Frenkel *et al.*, 1995).

Em comparação com a Europa e América, a China apresentou menor índice de infecção com *Toxoplasma gondii* provavelmente devido ao hábito dos chineses de consumirem carne bem cozida e a raridade de gatos nas casas (Shen *et al.*, 1990).

Em soroprevalência para anticorpos de *Toxoplasma gondii* realizada em Shiraz, Iran, constatou-se que 31% dos cães foram positivos e destes, 41,8% eram cães sem dono e 9,1% cães domésticos. Estes dados indicam um potencial risco para a saúde pública (Shad-Del, 1993).

A diferença de soropositivos entre cães sem dono e cães domésticos pode estar relacionada aos hábitos alimentares destes animais. Riemann *et al.* (1978), citou que cães e gatos da zona rural estão mais sujeitos a maior risco de contaminação do que os urbanos, porque têm mais oportunidades para consumir pássaros e mamíferos selvagens eventualmente infectados.

Frenkel (1971) apud Ishizuka (1981), admite o carnivorismo como sendo o principal mecanismo de transmissão da toxoplasmose. Um estudo com cães do exército na república Czech e Slovak, alimentados somente com ração animal e

mantidos em boas condições de higiene, mostrou que a prevalência de animais soropositivos tendeu a diminuir (Hejlecek, 1995).

Outro estudo evidenciando o papel do carnivorismo na infecção foi feito por Hilali (1995). Alimentando gatos com amostras de carne coletadas de camelos abatidos na cidade do Al-Ahsa na Arábia Saudita, observou que 3 dos 4 gatos criados presos individualmente em gaiolas de aço apresentaram oocistos de *Toxoplasma gondii* e outros parasitas em suas fezes.

A contaminação dos cães pode ser, além da ingestão de alimentos com cistos, através do contato com solo contaminado com oocistos (Germano *et al.*, 1985). Embora muitos cães apresentem sorologia positiva para *Toxoplasma gondii*, os sinais clínicos da doença são raros variando com a espécie animal afetada e com a cepa do protozoário (Riemann *et al.* (1978).

A doença mais frequentemente se manifesta no feto (forma congênita) e no jovem, onde o sistema imune está imaturo. Entretanto, Riemann *et al.* (1978), observaram que entre gatos existiu uma tendência em aumentar a prevalência de anticorpos com a idade mas, o mesmo não foi observado quanto ao sexo. Em parte estes resultados estão de acordo com o achados de Svoboda & Svobodová (1987). Eles não encontraram diferença significativa na prevalência de anticorpos em relação ao sexo. Notaram, entretanto, maior frequência de sorologia positiva em animais com até um ano de idade do que nos animais com idade superior (Svoboda & Svobodová, 1987).

Em cães, Jackson *et al.* (1987), não notaram diferença significativa na extensão da infecção quanto ao sexo, mas a diferença entre a taxa de infecção em idades abaixo de 6 meses (2%) e acima de 6 meses (27,9%) foi evidente. O oposto foi descrito por Aganga & Ortese (1984). Embora não tenham encontrado diferenças estatísticas entre raça, sexo e idade de cães do Zaria, na Nigéria, ele observou maior número de soropositivos entre animais com idade abaixo de 1 ano. Esta porcentagem diminuía com o aumento da idade. Svoboda & Svobodová

(1987), não encontraram diferença significativa na prevalência de anticorpos em relação ao sexo, idade e raça de cães .

Embora existam numerosos relatos de infecção por *Toxoplasma gondii* em cães, pouco é conhecido a respeito de diagnóstico e tratamento (Dubey, 1985). Tradicionalmente, o diagnóstico de toxoplasmose tem sido baseado em técnicas sorológicas e microscópicas. Devido a problemas com sensibilidade e especificidade, estes métodos podem não apresentar o valor desejado como ferramentas diagnósticas, quando usados em medicina veterinária. Por exemplo, embora o teste Sabin-Feldman seja útil para diagnosticar toxoplasmose humana, ele é inviável quando aplicado a bovino (MacPherson e Gajadhar, 1993).

De acordo com Faust et al.(1961) apud Ganley e Comstock (1980), títulos de anticorpos imunofluorescentes não necessariamente refletem exposição ao *T. gondii*, desde que outros isosporídeos são conhecidos por ocorrer em humanos. Talvez baixos títulos possam estar refletindo reatividade cruzada a estes organismos. Então títulos sorológicos mais baixos que 1:16 podem incluir exposição a uma variedade de organismos Isospora que poderiam mascarar os títulos verdadeiros (Ganley e Comstock, 1980).

Diante do que se sabe até o presente a respeito das técnicas para diagnóstico sorológico e complicações provocadas pelo *T. gondii* em associação com outras doenças, torna-se importante um estudo de associação de sorologia positiva e valores dos títulos com testes sorológicos diferentes.

2 - OBJETIVOS

- Comparar os resultados dos testes sorológicos, imunofluorescência indireta e ELISA, utilizados no estabelecimento do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose canina, com a técnica “Western blotting”.
- Analisar o perfil imunoquímico, a reatividade e os títulos de anticorpos anti - *T. gondii* em amostras de soros de cães doentes e aparentemente saudáveis.
- Verificar a prevalência de anticorpos IgG anti - *T. gondii* em relação ao sexo, raça e idade da população canina aparentemente sadia e com infecção concorrente.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Procedência das amostras de soros

Amostras de sangue de cães foram obtidas de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia - MG (UFU) e de animais do Centro de Controle de Zoonoses da mesma cidade. Do total de 307 amostras de soros colhidas, 173 foram de animais doentes do Hospital Veterinário ou do Centro de Controle de Zoonoses e 134 foram de animais aparentemente sadios do Centro de Controle de Zoonoses.

Volumes de sangue, variando de 2 a 10ml, foram colhidos por punção da veia cefálica antebraquial ou da veia safena e punção cardíaca. Foram mantidos à temperatura ambiente para retração do coágulo e então, centrifugados a 300 g por 10 minutos. As amostras de soros foram armazenadas em frascos etiquetados, a -20°C, até a realização dos exames laboratoriais.

3.2- Avaliação Sorológica

3.2.1- Reação de Imunofluorescência Indireta

3.2.1.1- Preparo do antígeno e das lâminas de Imunofluorescência

A suspensão de *Toxoplasma gondii* para preparação do antígeno foi obtida do exsudato peritoneal de camundongos inoculados com 0,4 ml da cepa RH de *T. gondii*, 48 horas antes. Após centrifugação da suspensão a 500 g durante 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS) pH 7,2 e novamente centrifugado por duas vezes durante 10 minutos. O sedimento foi tratado com formol a 1% (10,5ml de salina + 300µl de formol 35%). Após 30 minutos de formolização à temperatura ambiente sob agitação lenta e constante, procedeu-se a uma centrifugação rápida a 500 g durante 30 segundos. Descartou-se o sedimento e centrifugou-se novamente o sobrenadante a 500 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido com PBS, submetido a nova centrifugação a 1000 g, por duas vezes, durante 10 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi ressuspendido em água destilada estéril num volume de 2 ml e a concentração foi acertada para 20 a 30 parasitas por campo microscópico com aumento 400x. Foram adicionados 10 µl da suspensão parasitária em áreas demarcadas das lâminas de imunofluorescência (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro Ltda., São Paulo, SP, Brasil) previamente lavadas e desengorduradas em álcool-éter.

As lâminas com taquizoítas formolizados de *Toxoplasma gondii* foram fixadas por dessecação à temperatura ambiente por 2 a 3 horas, acondicionadas em lenços de papel e em papel alumínio, sendo posteriormente armazenadas em sacos plásticos a -20°C.

3.2.1.2- Titulação do conjugado anti-IgG de cão-FITC

O conjugado IgG de coelho anti-IgG de cão marcado com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), obtido do Centro de Zoonoses - São Paulo - SP, foi titulado com amostras de soros de cães de referência, positivos e negativos, para determinação da diluição ótima de uso.

3.2.1.3- Triagem e titulação das amostras de soros de cães pela reação de imunofluorescência

As reações de imunofluorescência indireta (IFI) para pesquisa de anticorpos IgG anti - *Toxoplasma gondii* nas amostras de soros foram realizadas conforme descrito por Camargo (1964), com modificações. As amostras dos soros utilizadas para triagem foram diluídas a 1:16 e 1:32 em PBS, pH 7,2. Um volume de 10 µl de cada diluição dos soros e das amostras de soros padrões positivo e negativo, foi colocado sobre as lâminas contendo taquizoítas de *Toxoplasma gondii* formolizados, preparados segundo as informações anteriores. Após um período de 30 minutos de incubação a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes durante cinco minutos, e colocadas para secar à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 µl do conjugado anti-IgG de cão-FITC diluído 1:300 em solução de azul de Evans a 1% e as lâminas foram novamente incubadas a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida. Procedeu-se a uma nova série de lavagens como anteriormente descrito. As lâminas foram montadas com lamínulas em glicerina tamponada pH 9,5 e examinadas em microscópio fluorescente com epi-iluminação (Olympus Mod. BH₂, Tokyo, Japão), por mais de um observador. Os soros reagentes foram, a seguir, titulados a partir da diluição de 1:16. Reações foram consideradas

positivas quando os taquizoítas demonstravam completa marcação fluorescente em toda a sua superfície e negativas quando taquizoítas não demonstravam marcação ou com fraca marcação polar.

3.2.2- Teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos IgG anti - *Toxoplasma* nas amostras de soros.

3.2.2.1 - Preparo do antígeno

Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* da cepa RH foram obtidos do exsudato peritoneal de camundongos Swiss, inoculados 48 horas antes com 0,4 ml de exsudatos de camundongos previamente infectados. Cada exsudato foi examinado em microscopia óptica para selecionar aqueles com maior concentração de parasitas. Após a centrifugação do exsudato a 500 g por 10 minutos, o sedimento foi ressuspenso em PBS pH 7,2, estéril e submetido a novamente a duas centrifugação. Procedeu-se, então, à contagem dos parasitas em câmara hemocitométrica, sendo a concentração final dos parasitas (1×10^5 taquizoítas/ 50 μ l), realizada em PBS adicionado de gelatina a 1%. Taquizoítas assim suspensos foram adicionados, em volumes de 50 μ l, em orifícios de placas de poliestireno para ELISA (Interlab, São Paulo - SP) incubando-se por 18 horas a 37°C. As placas sensibilizadas foram acondicionadas em sacos plásticos e estocadas a -20°C até o momento do uso.

3.2.2.2 - Titulação do conjugado Proteína A-peroxidase

O conjugado utilizado nesta reação foi a Proteína A-peroxidase (Sigma Co., St Louis, USA). Este reagente foi titulado com amostras de soros positivos e negativos, previamente determinados pela reação de imunofluorescência indireta. Uma vez escolhida a diluição ótima, foi feita uma triagem das amostras de soros nas diluições de 1:32 e 1:64 pela técnica imunoenzimática ELISA indireta.

3.2.2.3 - Titulação das amostras de soros pelo teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos IgG anti - *T. gondii*.

As reações de ELISA utilizando as placas de poliestireno previamente sensibilizadas com taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii* foram realizadas segundo as descrições de Voller *et al.*, (1976), com pequenas modificações. As placas foram lavadas com PBS adicionado de Tween 20 a 0,1% (PBS-T) (Sigma Chem. Co, St. Louis - MO, USA) por três vezes com ciclos de 5 minutos cada. Com a finalidade de bloquear os sítios ativos das microplacas, adicionou-se 200µl de PBS acrescido de 1% de soroalbumina bovina (BSA) (Sigma Chem. Co, St. Louis - MO, USA), em cada orifício da placa, mantendo-as a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida.

As amostras de soros que apresentaram reatividade positiva na triagem descrita anteriormente foram submetidas a diluições seriadas a partir do título de 1:64. O diluente dos soros consistiu de PBS-T a 0,1% acrescido de BSA a 0,1%. O volume de 50 µl destas diluições foi adicionado nos poços das placas previamente lavadas por 3 vezes com PBS-T 0,1% após o período de bloqueio. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em câmara úmida por 45 minutos. Em todas as placas foram realizados controles da reação consistindo de

um soro positivo no teste de imunofluorescência indireta e três soros negativos para o mesmo teste. As placas foram submetidas a novo ciclo de lavagens por 3 vezes de 5 minutos e adicionado a cada poço 50 µl do conjugado enzimático (proteína A-peroxidase) na diluição de 1:50.000, sendo o diluente o mesmo utilizado para os soros (PBS-T a 0,1% e BSA a 0,1%). As placas foram mantidas em câmara úmida durante 30 minutos à temperatura ambiente e foram lavadas, como descrito anteriormente, após cada etapa de incubação. O substrato enzimático consistiu de solução contendo 5 mg de OPD (orto-fenilenediamina-Merck) e 5 µl de solução a 30% de água oxigenada (Casa Americana de Artigos para laboratórios Ltda, São Paulo, SP) em tampão citrato- Na_2HPO_4 0,1M (pH 5,5). Após a adição da solução reveladora, procedeu-se à incubação por 15 a 20 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A reação enzimática foi interrompida adicionando-se 25µl de solução de ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow, USA), a 492nm, e o “cut-off “ para cada placa foi estabelecido pelo cálculo da média dos três soros padrões negativos mais dois desvios padrões.

3.2.3- Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e “Western blotting”

3.2.3.1- Obtenção de Antígenos

Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* da cepa RH foram obtidos do exsudato peritoneal de camundongos Swiss infectados, como descrito previamente. Cada exsudato foi examinado em lâminas de microscopia óptica para selecionar os melhores quanto à maior concentração de parasitas, menos células peritoneais dos camundongos e menos contaminação por bactérias. Os

exsudatos foram misturados em tubo e centrifugados durante 10 minutos a 500 g. O sedimento foi ressuspensionado em 10 ml de SF estéril, novamente centrifugado e o sobrenadante estocado a -70.

3.2.3.2 - Preparo do Antígeno Criólise

Sedimentos de taquizoítas estocados nas condições descritas acima foram ressuspensos em um único tubo de centrífuga e para cada 2 ml da suspensão foi adicionado 32 µl de PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) - (Sigma). Esta suspensão foi submetida a 6 ciclos de congelamento e descongelamento rápido em N₂ líquido e banho - maria a 37°C, centrifugada durante 10 minutos a 1000 g e o sobrenadante armazenado a -20°C em alíquotas de 1 ml.

3.2.3.3 - Dosagem Protéica

Amostras dos antígenos obtidos pela criólise foram dosadas quanto à concentração protéica pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma Chem. Co, St. Louis - MO, USA).

3.2.3.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

O perfil de proteínas do *Toxoplasma gondii* reconhecidas pelos anticorpos presentes nas amostras de soros de cães foi analisado pela técnica de “Western blotting”. Para isto, amostras do antígeno criólise foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% segundo Laemmli (1970).

O gel de separação foi preparado utilizando-se Tris-HCl 0,375M pH 8,8, SDS (sulfato dodecil de sódio) a 0,1%, ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) 2mM, N,N,N,N- tetrametil etileno diamino (TEMED) a 0,125%, persulfato de amônio (APS) a 0,125% e Acrilamida:Bisacrilamida na proporção de 30:0,8, respectivamente, no volume indicado para a obtenção do gel na concentração de 15%.

Para o gel de empilhamento utilizou-se Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS a 0,1%, EDTA 2mM, TEMED a 0,125%, APS a 0,125% e Acrilamida:Bisacrilamida a 5%.

Os reagentes dos géis foram obtidos dos seguintes fornecedores: Tris (Hydroxymethyl aminomethane) e SDS (Sigma Chem. Co, St. Louis - MO, USA), EDTA (Quimibrás Ind. químicas AS. Rio de Janeiro - RJ), Bisacrilamida, TEMED e APS (Pharmacia - LKB, Produtos AB, Bromma, Suécia).

A solução do gel de separação foi vertida cuidadosamente para a cavidade da placa previamente montada de maneira a evitar a formação de bolhas no gel, sendo acrescentado, em seguida, uma camada de butanol (aproximadamente 250 μ l) para evitar a sua polimerização em presença de oxigênio. Após a polimerização do gel de separação, o butanol foi descartado e adicionado o gel de empilhamento e o pente para formação dos poços de aplicação das amostras

As placas foram montadas em cubas para eletroforese contendo o tampão Tris-glicina 0,025M pH 8,3.

Amostras do antígeno criólise (250 μ l) foram diluídas volume a volume (v/v) em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol A 20%) (Sigma Chem Co, St. Louis - MO, USA), sem β -mercaptoetanol (agente redutor), e submetidas a um aquecimento de 100°C em banho-maria durante 3 minutos. Estas amostras foram aplicadas no poço do gel paralelamente a padrões padrões de alto e baixo peso molecular do Kit "Electrophoresis calibration for molecular weight proteins" (Pharmacia LKB,

Produtos AB, Bromma, Suécia). A corrente inicial da eletroforese foi de 20 mA sendo aumentado para 30 mA quando as proteínas atingiram a linha correspondente ao início do gel de separação.

3.2.3.5 - Reação de “Western-Blot”

No final da migração eletroforética das proteínas, realizou-se a transferência destas para membranas de nitrocelulose 0,45 μm (Sigma Chem. Co, St. Louis - MO, USA), segundo as técnicas descritas por Towbin et al. (1979) com modificações. Foi preparado um “sandwich” utilizando-se doze folhas de papel de filtro (Munktell, Grau 1F, Pharmacia - LKB, Suécia) recortadas na mesma medida do gel, membrana de nitrocelulose e o gel de poliacrilamida contendo as frações antigênicas, sendo a transferência efetuada em sistema semi-úmido, utilizando-se o equipamento Multiphor II Electrophoresis Unit (Pharmacia - LKB, Suécia).

As folhas de papel de filtro e a membrana de nitrocelulose (10x15cm²) foram umedecidas em tampão de transferência. Primeiramente, seis folhas de papel de filtro foram colocadas uma sobre a outra na cuba de transferência previamente umedecida com água destilada. Em seguida, colocou-se a membrana de nitrocelulose, o gel e as outras seis folhas de papel de filtro cuidando sempre para que não se formasse bolhas em nenhuma das etapas. A este material foi aplicado uma corrente de 0,8 mA por cm² do “sandwich” durante duas horas. Após a transferência, a nitrocelulose foi corada com solução a 0,5% de Ponceau a 0,5% em ácido acético a 1% a fim de verificar a eficiência da transferência.

A membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras e seus sítios ativos foram bloqueados com uma solução de PBS a 0,05% de Tween 20 (PBS-T a 0,05%) adicionada de 5% de leite desnatado durante duas horas. Um volume de 500 μl

das amostras de soros, diluídas a 1:100 em solução de PBS-T a 0,05% acrescido de leite desnatado a 1%, foi adicionado às tiras de nitrocelulose, paralelamente a amostras padrões positivas e negativas. Estas foram constituídas, respectivamente, por sobrenadante de cultura contendo anticorpos monoclonais contra SAG-1 (P₃₀) e soro não imune de camundongo diluído a 1:100 em solução de PBS- T acrescido de 1% de leite desnatado. As tiras foram incubada por uma noite a 4°C, sob agitação lenta e contínua em câmara úmida e posteriormente submetidas a 6 ciclos de lavagens durante cinco minutos, com PBS- T acrescido de 1% de leite desnatado. Às tiras que receberam amostras de soros de cães, adicionou-se 500 µl do conjugado proteína A-peroxidase diluído a 1:5000 em PBS- T acrescido de 1% de leite desnatado. Aos controles positivos e negativos, adicionou-se o conjugado IgG de coelho anti-imunoglobulina de camundongo marcados com peroxidase diluído a 1:100 em PBS- T acrescido de 1% de leite desnatado. A reação foi incubada por duas horas à temperatura ambiente sob agitação lenta e contínua. As tiras foram submetidas a novas lavagens com PBS pH 7,2 e a reação foi revelada com solução contendo 2,5 mg de 3,3-diaminobenzidina (DAB) - (Sigma Chem. Co, St. Louis - Mo, USA) diluídos em 15 ml de PBS e acrescido de 225 µl de solução a 30% de H₂O₂.

Após o aparecimento de bandas de coloração marrom, a reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.3 - Cálculo da sensibilidade e especificidade e análises estatísticas

Os testes utilizados incluíram os cálculos das significâncias entre as diferenças de duas proporções ao nível de erro α máximo de 5% ($p \leq 0,05$)

Os resultados dos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA foram analisados calculando-se a sensibilidade e especificidade das reações, tendo como referência as reações de “western-blot” (Guimarães, 1985).

As significâncias das associações entre “western-blot” e IFI, “western-blot” e ELISA, foram determinadas pelo teste qui-quadrado corrigido (teste de Yates) e teste de McNemar, utilizando o “software” “Statistica for windows”, versão 4.5A (StatSoft. Inc, 1993).

4- RESULTADOS

4.1 - Títulos de anticorpos IgG anti - *T. gondii* em amostras de soros de cães doentes e aparentemente saudáveis.

As amostras de soros de cães (307) tituladas por imunofluorescência indireta (IFI) a partir da diluição 1:16 e por ELISA a partir da diluição 1:32 foram agrupadas segundo o estado clínico (cães doentes) ou aparentemente saudáveis. Na figura 1, estão representados os resultados das amostras de soros testadas. Não foram incluídas as amostras que não apresentaram reatividade nas diluições estudadas.

Pelo teste IFI, 180 amostras de soros testadas (58,6%) apresentaram títulos de anticorpos IgG anti - *T. gondii* que variaram de 16 a 4.096. Amostras com títulos de 4.096 foram de cães aparentemente saudáveis. Em amostras de cães doentes, o maior título encontrado foi 2.048. Um maior número de amostras de cães aparentemente saudáveis (23,5%) apresentou título 128 e, em cães doentes, uma maior concentração das amostras foi observada nos títulos 16 e 128, ambos com

19,2%. Estes resultados estão representados na figura 1. Não houve diferenças estatísticas entre as frequências encontradas nas duas populações estudadas ($p > 0,05$).

Por ELISA, duzentos e trinta e quatro amostras testadas (76,2%) apresentaram títulos de anticorpos IgG que variaram de 32 a 32.768. Amostras com títulos de 32.768 foram de cães aparentemente saudáveis. Em cães doentes, o maior título encontrado foi 16.384, sendo observado uma maior concentração de amostras destes animais e cães aparentemente saudáveis com título 32 (18,5% e 20,0%). Estes resultados estão apresentados na Figura 2. As diferenças encontradas em cada título entre as porcentagens de amostras de soros de cães doentes em relação a cães aparentemente saudáveis não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$)

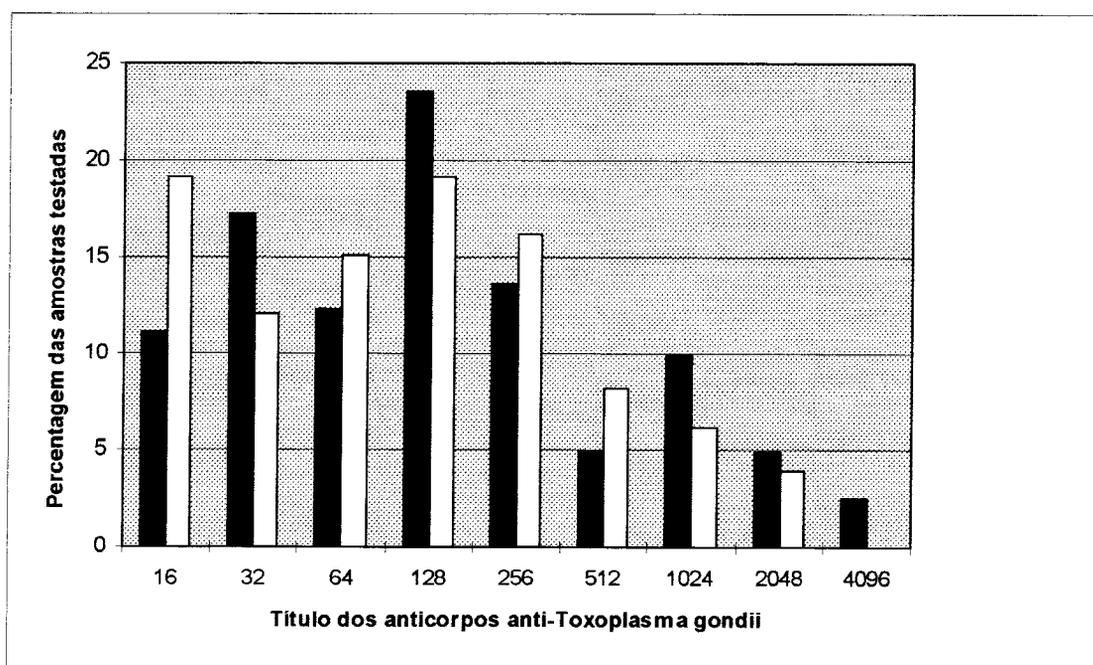


Figura 1 : Distribuição dos títulos de anticorpos anti - *T. gondii* em amostras de soros de cães doentes e aparentemente saudáveis, por meio do teste de imunofluorescência indireta (IFI). Colunas pretas, animais aparentemente saudáveis; colunas brancas, animais doentes.

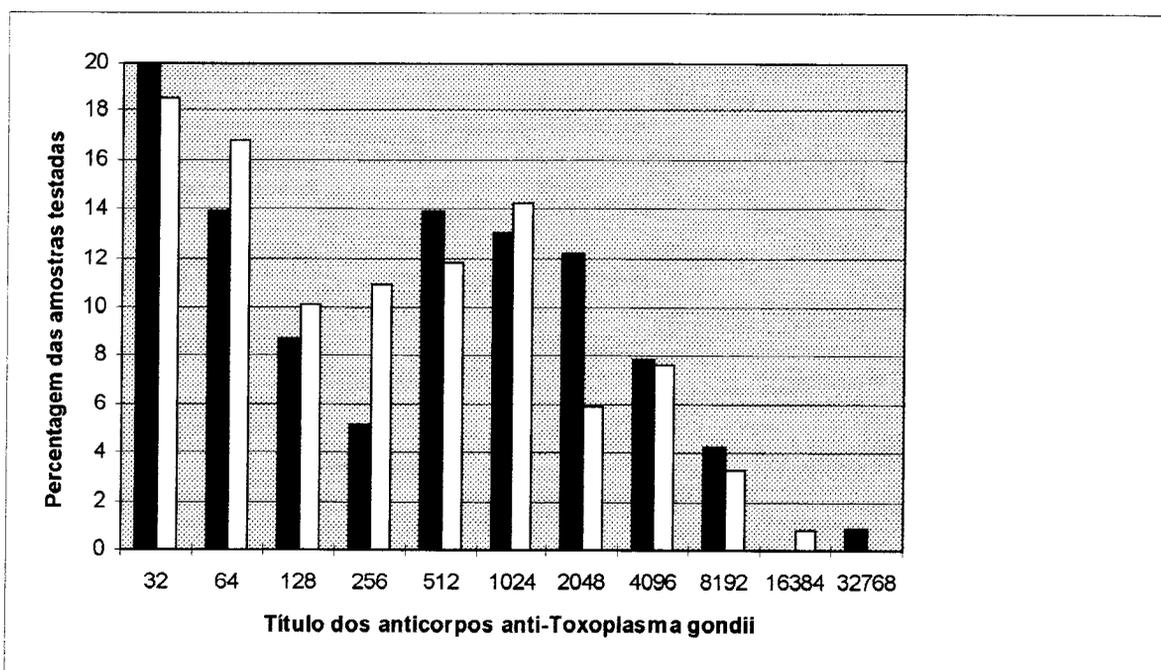


Figura 2 : Distribuição dos títulos de anticorpos anti - *T. gondii* em amostras de soros de cães doentes e aparentemente saudios, por meio do teste ELISA. Colunas pretas, animais aparentemente saudios; colunas brancas, animais doentes.

4.2 - Comparação dos resultados da sorologia por imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA com o “western-blot”

Um percentual de 69% das 307 amostras de soros de cães foi testado por “western-blot” (WB) para avaliar os resultados obtidos por IFI e ELISA.

O critério para a escolha de amostras de soros a serem testadas por WB baseou-se no valor dos títulos de anticorpos IgG anti- *T. gondii* que variaram entre o mínimo de 16 e o máximo de 4096 para IFI e 32 a 32.768 para ELISA. Foram incluídas também amostras que não apresentaram reatividade.

No “western-blot”, foram consideradas positivas somente as amostras que apresentaram marcação positiva para o antígeno SAG-1 (P30), mas foi analisado também a presença de outros antígenos como SAG-2 (P22) e SAG-3 (P43).

Pelas Tabelas 1 e 2, observou-se que amostras de soros totalmente negativas para a P30 apresentou baixos títulos nos outros dois testes ou mesmo não foram reativas. Fraca marcação positiva para P30 ocorreu também com amostras apresentando no máximo título igual a 128 por IFI e 256 por ELISA, porém quando se observa marcação positiva bem evidente para esse antígeno, os títulos variam desde o mínimo até o último encontrado nesses dois testes. Marcação positiva bem evidente para P30 foi encontrada também em amostras não reativas pelo teste de IFI e ELISA.

Tabela 1 - Distribuição dos títulos de anticorpos IgG anti - *T. gondii* por imunofluorescência indireta nas amostras de soros de cães doentes e aparentemente sadios em relação à reação de “western- blot” (WB).

TÍTULOS DE ANTICORPOS - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA											
W.B.	neg.	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	TOTAL
P30-/OP-	31	1	-	-	-	-	-	-	-	-	32
%	(96,9)	(3,1)	-	-	-	-	-	-	-	-	
P30-/OP+	32	7	2	1	-	-	-	-	-	-	42
%	(76,2)	(16,7)	(4,7)	(2,4)	-	-	-	-	-	-	
Sub-total	63	8	2	1							74
%	(85,1)	(10,8)	(2,7)	(1,4)							
P30+f/OP-	7	1	3	-	1	-	-	-	-	-	12
%	(58,4)	(8,3)	(25,0)	-	(8,3)	-	-	-	-	-	
P30+f/OP+	9	4	1	-	-	-	-	-	-	-	14
%	(64,3)	(28,6)	(7,1)	-	-	-	-	-	-	-	
Sub-total	16	5	4	-	1						26
%	(61,6)	(19,2)	(15,4)	-	(3,8)						
P30+/OP-	2	2	4	2	1	-	-	-	-	-	11
%	(18,2)	(18,2)	(36,4)	(18,2)	(9,1)	-	-	-	-	-	
P30+/OP+	4	10	7	13	24	18	9	12	3	1	101
%	(4%)	(9,9)	(6,9)	(12,9)	(23,7)	(17,8)	(8,9)	(11,9)	(3,0)	(1,0)	
Sub-total	6	12	11	15	25	18	9	12	3	1	112
%	(5,4)	(10,7)	(9,8)	(13,4)	(22,3)	(16,1)	(8,0)	10,7	(2,7)	(0,9)	

P30- = ausência de reatividade para SAG-1(p30)

P30+f = reatividade fraca para SAG-1(p30)

P30+ = presença de SAG-1(p30)

OP- = ausência de reatividade para outras proteínas

OP+ = presença de reatividade para outras proteínas

Tabela 2 - Distribuição dos títulos de anticorpos IgG anti - *T. gondii* por ELISA nas amostras de soros de cães doentes e aparentemente saudáveis em relação à reação de “western- blot” (WB).

TÍTULOS DE ANTICORPOS - ELISA													
W.B.	neg.	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	TOTAL
P30-/OP-	29	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	32
%	(90,6)	-	(6,3)	(3,1)	-	-	-	-	-	-	-	-	
P30-/OP+	21	2	17	2	-	-	-	-	-	-	-	-	42
%	(50,0)	(4,8)	(40,4)	(4,8)	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sub-total	50	2	19	3	-	-	-	-	-	-	-	-	74
%	(67,6)	(2,7)	(25,7)	(4,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	
P30+f/OP-	4	2	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	12
%	(33,3)	(16,7)	(41,7)	(8,3)	-	-	-	-	-	-	-	-	
P30+f/OP+	8	-	2	3	1	-	-	-	-	-	-	-	14
%	(57,1)	-	(14,3)	(21,5)	(7,1)	-	-	-	-	-	-	-	
Sub-total	12	2	7	4	1	-	-	-	-	-	-	-	26
%	(46,2)	(7,7)	(26,9)	(15,4)	(3,8)	-	-	-	-	-	-	-	
P30+/OP-	1	1	3	2	-	2	-	2	-	-	-	-	11
%	(9,1)	(9,1)	(27,2)	(18,2)	-	(18,2)	-	(18,2)	-	-	-	-	
P30+/OP+	-	3	8	9	13	17	20	9	14	6	1	1	101
%		(3,0)	(7,9)	(8,9)	(12,9)	(16,8)	(19,8)	(8,9)	(13,9)	(6,9)	(1,0)	(1,0)	
Sub-total	1	4	11	11	13	19	20	11	14	6	1	1	112
%	(0,9)	(3,6)	(9,8)	(9,8)	(11,6)	(17,0)	(17,8)	(9,8)	(12,5)	(5,4)	(0,9)	(0,9)	

P30- = ausência de reatividade para SAG-1(p30)

P30+f = reatividade fraca para SAG-1(p30)

P30+ = presença de SAG-1(p30)

OP- = ausência de reatividade para outras proteínas

OP+ = presença de reatividade para outras proteínas

4.3- Cálculo da sensibilidade e especificidade

Os resultados das reações de “western-blot” foram importantes para o cálculo das sensibilidades e especificidades em relação aos testes de IFI e ELISA. Nas Tabelas 3 e 4, estão representados os valores extraídos das tabelas 1 e 2 que foram utilizados para fazer estes cálculos.

A sensibilidade (S) e a especificidade (E) relativas, foram calculadas com diferentes “cut-offs”. Assim, foram feitos cálculos fixando-se o cut-off nas diluições 1:16, 1:32 e 1:64 para IFI e 1:32, 1:64 e 1:128 para ELISA. Quando se fixou o cut-off para IFI nas diluições 1:16 e 1:32, obteve-se, respectivamente, S = 84,0%, E = 85,1% e S = 71,7% e E 95,9%. Os valores de S = 60,9% e E = 98,6% foram obtidos com o “cut-off” 64.

No teste ELISA, obteve-se S = 90,6%, E = 67,6%; S = 86,2% , E = 70,3%; S = 73,2% , E = 95,9% nas diluições de 1:32, 1:64 e 1:128.

Após a análise dos cálculos, o limite de positividade (“cut-off”) das reações foi determinado pela presença de anticorpos IgG anti - *T.gondii* com títulos iguais ou superiores a 32 para IFI e 64 para ELISA.

Tabela 3 - Associação entre os resultados do teste de imunofluorescência indireta, com “cut-offs” de 16, 32 e 64 com o teste de “western-blot” que foi considerado o teste de referência.

I.F.I (“cut-off” = 16)			
W.B.	+	-	Total
+	116	22	138
-	11	63	74
Total	127	85	212

I.F.I (“cut-off” = 32)			
W.B.	+	-	Total
+	99	39	138
-	3	71	74
Total	102	110	212

I.F.I (“cut-off” = 64)			
W.B.	+	-	Total
+	84	54	138
-	1	73	74
Total	85	127	212

Tabela 4 - Associação entre os resultados do teste ELISA, com “cut-offs” de 32, 64 e 128 com o teste de “western-blot” que foi considerado o teste de referência.

ELISA (“cut-off” = 32)			
W.B.	+	-	Total
+	125	13	138
-	24	50	74
Total	149	63	212

ELISA (“cut-off” = 64)			
W.B.	+	-	Total
+	119	19	138
-	22	52	74
Total	141	71	212

ELISA (“cut-off” = 128)			
W.B.	+	-	Total
+	101	37	138
-	3	71	74
Total	104	108	212

4.4 - Resultados discordantes e concordantes por imunofluorescência indireta e ELISA

Tendo fixado o “cut-off” para imunofluorescência (≥ 32) e ELISA (≥ 64), foram observados resultados com amostras de soros positivas para um teste e negativas para outro. O total de amostras com resultados discordantes, amostras positivas em imunofluorescência e negativas em ELISA (IFI + / - ELISA) ou vice-versa (IFI- / +ELISA) estão apresentadas nas Tabelas 5, 6 e 7 segundo o sexo, raça e idade dos animais doentes e aparentemente sadios paralelamente às amostras concordantes positivas (+ / +) e negativas (- / -).

Como demonstrado nestas Tabelas, a maior porcentagem de resultados discordantes deveu-se à observação de resultados IFI - / ELISA + do que resultados IFI + / ELISA -.

Tabela 5 - Resultados concordantes (IFI + / ELISA +, IFI - / ELISA -) e discordantes (IFI + / ELISA -, IFI - / ELISA +) dos testes de imunofluorescência indireta e ELISA em amostras de soros de cães doentes e aparentemente* sadios, em relação ao sexo.

CÃES	SEXO	n	RESULTADOS IFI / ELISA			
			+ / + f (%)	- / - f (%)	+ / - f (%)	- / + f (%)
DOENTES	MACHOS	101	42 (41,6)	42 (41,6)	5 (4,9)	12 (11,9)
	FÊMEAS	72	31 (43,0)	27 (37,5)	2 (2,8)	12 (16,7)
SADIOS*	MACHOS	65	35 (53,8)	18 (27,7)	0 (0,0)	12 (18,5)
	FÊMEAS	69	35 (50,7)	22 (31,9)	2 (2,9)	10 (14,5)
TOTAL		307	143 (46,6)	109 (35,5)	9 (2,9)	46 (15,0)

n = número de amostras de soros testadas

f = frequência de resultados concordantes ou discordantes

Tabela 6 - Resultados concordantes (IFI + / ELISA +, IFI - / ELISA -) e discordantes (IFI + / ELISA -, IFI - / ELISA +) dos testes de imunofluorescência indireta e ELISA em amostras de soros de cães doentes e aparentemente* sadios, em relação à raça.

CÃES	RAÇA	n	RESULTADOS IFI / ELISA			
			+ / + f (%)	- / - f (%)	+ / - f (%)	- / + f (%)
DOENTES	SRD ^a	101	42 (41,6)	39 (38,6)	2 (2,0)	18 (17,8)
	CRD ^b	72	31 (43,1)	30 (41,7)	5 (6,9)	6 (8,3)
SADIOS*	SRD	134	70 (52,2)	40 (29,9)	2 (1,5)	22 (16,4)
	CRD	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
TOTAL		307	143 (46,6)	109 (35,5)	9 (2,9)	46 (15,0)

SRD^a = cães sem raça definida

CRD^b = cães com raça definida

n = número de amostras de soros testadas

f = frequência de resultados concordantes ou discordantes

Tabela 7 - Resultados concordantes (IFI + / ELISA +, IFI - / ELISA -) e discordantes (IFI + / ELISA -, IFI - / ELISA +) dos testes de imunofluorescência indireta e ELISA em amostras de soros de cães doentes e aparentemente* sadios, em relação à idade.

CÃES	IDADE (anos)	n	RESULTADOS IFI / ELISA			
			+ / + f(%)	- / - f(%)	+ / - f(%)	- / + f(%)
DOENTES	0 - 2	96	32 (33,3)	52 (54,2)	1 (1,0)	11 (11,5)
	2 - 4	29	17 (58,6)	2 (6,9)	4 (13,8)	6 (20,7)
	4 - 6	22	9 (40,9)	8 (36,4)	3 (13,6)	2 (9,1)
	6 - 8	12	8 (66,7)	3 (25,0)	0 (0,0)	1 (8,3)
	8 - 10	11	6 (54,5)	3 (27,3)	1 (9,1)	1 (9,1)
	> 10	3	1 (33,3)	1 (33,3)	0 (0,0)	1 (33,3)
SADIOS*	0 - 2	126	67 (53,2)	38 (30,1)	2 (1,6)	19 (15,1)
	2 - 4	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100)
	4 - 6	5	2 (40,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	2 (40,0)
	6 - 8	1	1 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	8 - 10	1	0 (0,0)	1 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)
	> 10	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
TOTAL		307	143 (46,6)	109 (35,5)	11 (3,6)	44 (14,3)

n = número de amostras de soros testadas

f = frequência de resultados concordantes ou discordantes

4.5- “Western-blot” de amostras com resultados concordantes positivos por imunofluorescência indireta e ELISA

A Figura 1 representa “western-blot” de amostras concordantes positivas com títulos baixos, médios e altos por IFI e ELISA. Todas apresentam marcação desde fraca a forte para o antígeno P30. Nas linhas 1 a 3 e linha 4, estão amostras de títulos baixos por IFI e ELISA apresentando, respectivamente, somente P30 no WB e P30 com outras proteínas.

Nas linhas 5 a 13 estão representadas amostras com títulos de IFI e ELISA crescentes demonstrando que a incidência de outras proteínas no “western-blot” aumentou com o título dos anticorpos.

Nas linhas 14 e 15 estão representados, respectivamente, sobrenadantes de cultura contendo anticorpo monoclonal anti- P30 e soro de camundongo não imune.

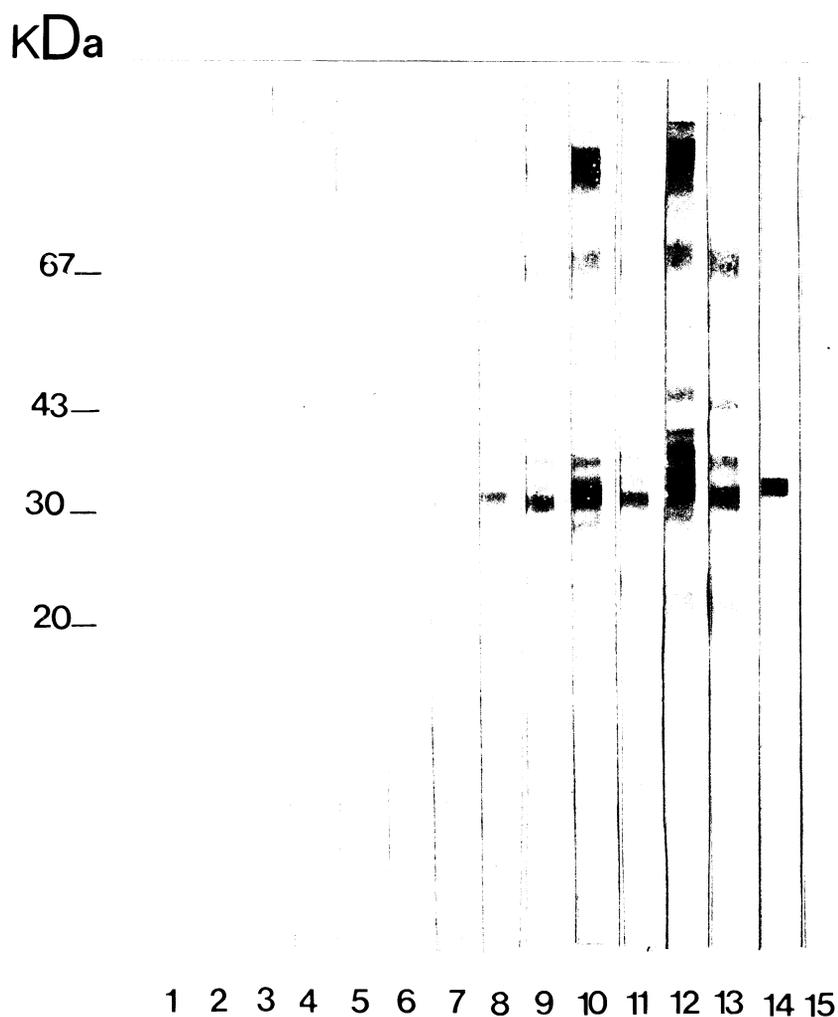


Figura 1 - Análise dos anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soros pela técnica de “western-blot” (WB). Linhas 1 a 3, soros com resultados concordantes positivos por imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA e positivos fracos somente para SAG-1 no WB; linha 4, soro positivo por IFI e ELISA e positivo para (P30) e outras proteínas; Linhas 5 a 13, soros com resultados concordantes positivos por IFI e ELISA e positivos para P30 e/ou outras proteínas; linhas 14 e 15, anticorpo monoclonal anti-P30 e soro de camundongo não imune, respectivamente.

Todas as amostras de soros que apresentaram resultados discordantes foram testadas por “western-blot”. Dentre as amostras testadas, algumas apresentaram fraca marcação para o antígeno SAG-1 (P30) e outras foram negativas, porém positivas para outras proteínas. Nas linhas 1 a 5 da Figura 2 estão representados “western-blot” negativos para P30 mas positivos para outros antígenos. Nas linhas 6 a 10 estão WB positivos para P30.

Vale destacar que o título das amostras com resultados discordantes variaram de não reativos a 32 na IFI e 32 a 128 no ELISA, sendo portanto de valores baixos.

Nas linhas 11 e 12 estão representados, respectivamente, sobrenadantes de cultura contendo anticorpo monoclonal anti - P30 e soro de camundongo não imune.

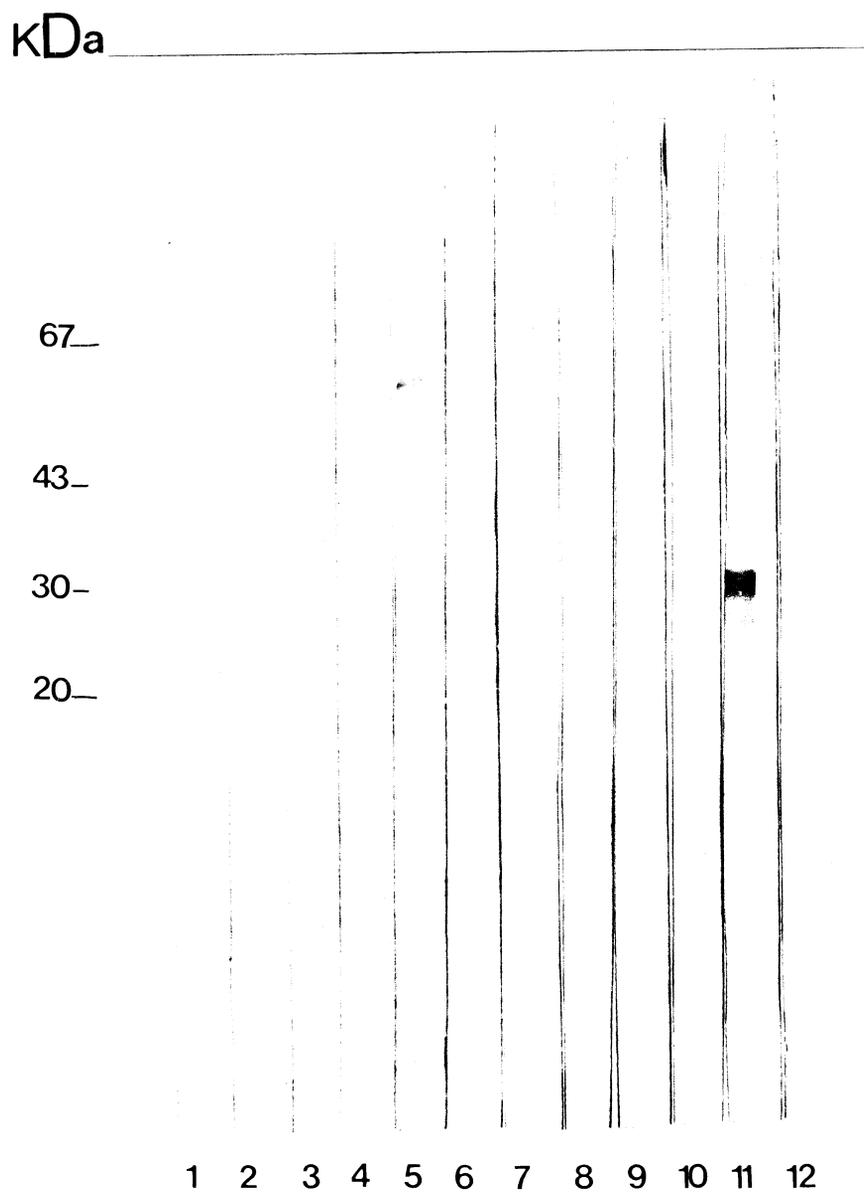


Figura 2 - Análise dos anticorpos anti - *T. gondii* em amostras de soros de cães pela técnica de “western-blot” (WB). Linhas 1 a 5, soros com resultados discordantes por imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA e negativos para SAG-1 (P30) no WB; linhas 6 a 10, soros com resultados discordantes por IFI e ELISA e com fraca marcação para SAG-1 (P30) no WB; linhas 11 e 12, anticorpo monoclonal anti-P30 e soro de camundongo não imune, respectivamente.

4.7 - “Western-blot” de amostras com resultados concordantes negativos por imunofluorescência indireta e ELISA

Amostras de soros que não apresentaram reatividade por IFI e ELISA, simultaneamente, foram testadas por “western-blot”. Nenhuma das amostras foi positiva para a proteína P30, confirmando a ausência de anticorpos para este antígeno, mas algumas apresentaram marcação para outras proteínas.

Nas linhas 1 a 5 da Figura 3 estão representados amostras concordantes negativas sem marcação para P30 e outros antígenos (P30 - / -) e nas linhas 6 a 10 estão amostras negativas para P30 mas positivas para outras proteínas.

Nas linhas 11 e 12 estão representados, respectivamente, sobrenadantes de cultura contendo anticorpo monoclonal anti - P30 e soro de camundongo não imune.

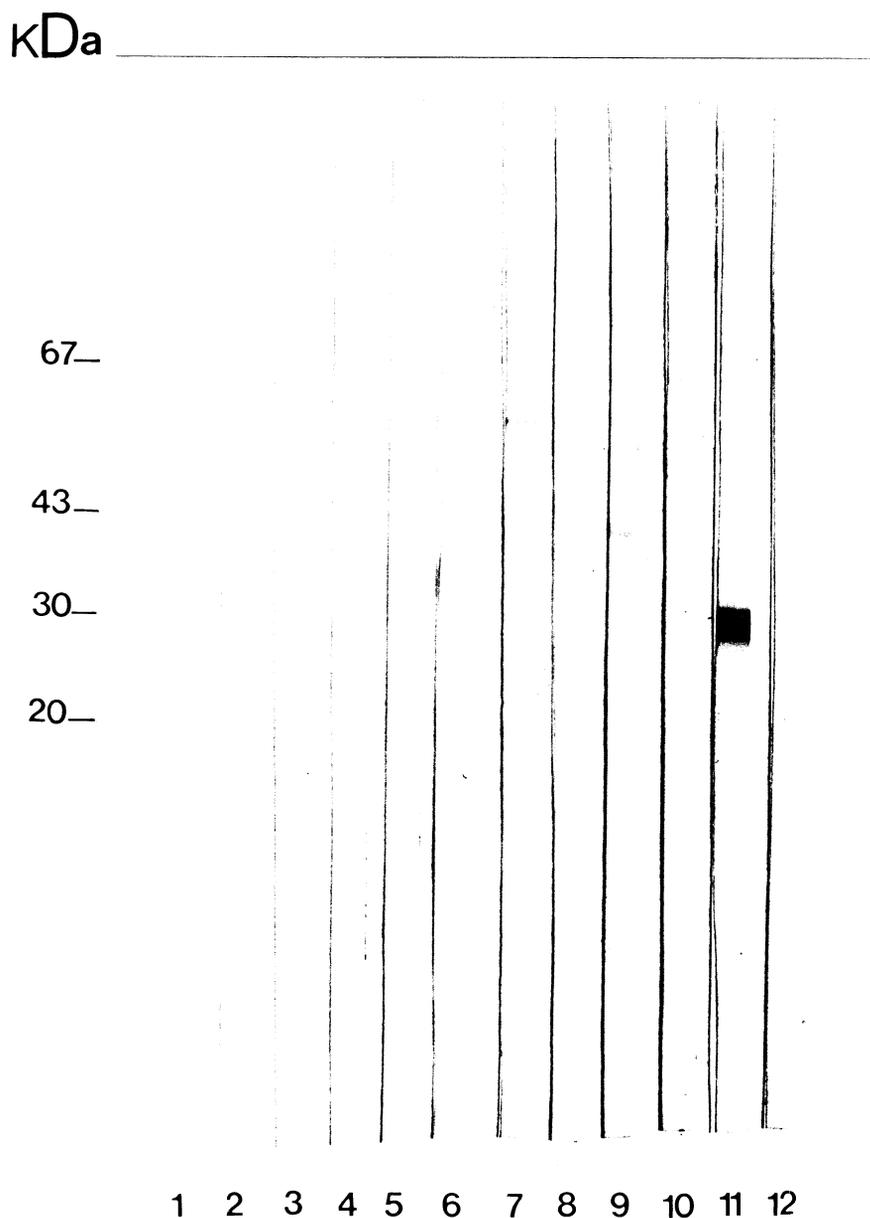


Figura 3 - Análise dos anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soros pela técnica de “western blot” (WB). Linhas 1 a 5, soros com resultados concordantes negativos por imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA e negativos para SAG-1 (P30), e outras proteínas no WB; Linhas 6 a 10, soros com resultados concordantes negativos por IFI e ELISA, negativos para SAG-1 e positivos para outras proteínas no WB; linhas 11 e 12, anticorpo monoclonal anti- P30 e soro de camundongo não imune, respectivamente.

4.8- Agrupamento das amostras de soros

As 307 amostras de soros estudadas foram separadas por grupos segundo o sexo, raça e idade dos cães e os resultados estão apresentados na tabela 8.

Do total de amostras de animais machos, 101 foram de animais doentes e 65 de animais aparentemente saudáveis. Setenta e duas (72) amostras foram de animais fêmeas doentes e 69 de animais fêmeas aparentemente saudáveis.

No agrupamento segundo a raça, obteve-se, respectivamente, 101 e 134 amostras de soros de animais doentes e aparentemente saudáveis sem raça definida (SRD). Amostras de soros de animais doentes com raça definida (CRD) somaram 72. Não houve amostras de soros de animais saudáveis com raça definida (Tabela 8).

A idade dos animais variou de 0 a 10 anos ou mais, sendo que o maior número das amostras de soros concentrou-se na faixa etária de 0 a 2 anos apresentando 96 amostras de animais doentes e 126 de animais aparentemente saudáveis. Nas faixas etárias subsequentes, esses números decresceram, sendo menores nas amostras de animais aparentemente saudáveis que variaram de 0 a 5 amostras por faixa (tabela 1).

4.9- Soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T.gondii* nas amostras de soros pelos testes IFI e ELISA segundo o “western-blot”

A análise das reações de “western-blot” e as determinações dos “cut-offs” para IFI e ELISA, foram utilizadas como referência para se calcular a soroprevalência de anticorpos IgG anti - *T.gondii* nas amostras de soros dos cães.

A soroprevalência foi analisada considerando-se os agrupamentos das amostras quanto ao sexo, raça e idade dos animais. Foram consideradas positivas somente as amostras de soros apresentando anticorpos IgG nos testes IFI e

Na tabela 8, as diferenças nos resultados de positividade entre cães machos e fêmeas doentes ou entre machos e fêmeas aparentemente saudáveis não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$). No entanto, a comparação de animais do mesmo sexo entre grupos doentes e aparentemente saudáveis, revelou diferença significativa. Entre cães machos doentes e cães machos aparentemente saudáveis os testes apresentaram nível de significância 0,0018, e entre fêmeas de cães doentes e fêmeas de cães saudáveis a significância foi de 0,0138.

Quando se comparou os resultados de positividade nas amostras de soros em relação à raça, novamente os testes não revelaram diferenças significativas entre amostras do mesmo grupo, ou seja, cães doentes SRD e cães doentes CRD. Porém, a comparação de amostras de soros de cães doentes SRD com amostras de soros de cães aparentemente saudáveis SRD, apresentou diferença altamente significativa ($p = 0,0006$). Entre amostras de soros de cães aparentemente saudáveis, todas foram de cães SRD (Tabela 8).

As amostras de soros de animais doentes apresentaram valores de positividade maiores nas faixas etárias de 2 a 4 anos (58,6%), não sendo significativa a diferença com os outros índices de positividade encontrados nas faixas superiores. Entretanto, o percentual de positividade em amostras de soros de animais doentes com 0 a 2 anos foi significativamente menor em relação ao encontrado em amostras de cães doentes com idade acima de 2 anos ($p = 0,0159$).

Amostras de soros de cães aparentemente saudáveis com 0 a 2 anos apresentaram 53,2% de positividade. Este resultado foi estatisticamente maior àquele encontrado em amostras de soros de cães doentes na mesma faixa etária ($p = 0,0035$). O número de amostras de soros de cães aparentemente saudáveis com mais de dois anos foi baixo .

Tabela 8- Soroprevalência de anticorpos anti - *Toxoplasma gondii* em amostras de soros de cães doentes e aparentemente (apar.) sadios da cidade de Uberlândia - MG (1994-1996), em relação a sexo, raça e idade, por meio dos testes de Imunofluorescência Indireta e ELISA tendo como referência a reação de “western-blot”.

	CÃES DOENTES			CÃES APAR. SADIOS		
	n	POS ^a (%)	NEG ^b (%)	N ^o	POS (%)	NEG (%)
SEXO						
MACHOS	101	42 (41,6)	59 (58,4)	65	35 (53,8)	30 (46,2)
FÊMEAS	72	31 (43,1)	41 (56,9)	69	35 (50,7)	34 (49,3)
RAÇA						
SRD ^c	101	42 (41,6)	59 (58,4)	134	70 (52,2)	64 (47,8)
CRD ^d	72	31 (43,1)	41 (56,9)	0	0 (0,0)	0 (0,0)
IDADE						
0 - 2	96	32 (33,3)	64 (66,7)	126	67 (53,2)	59 (46,8)
2 - 4	29	17 (58,6)	12 (41,4)	1	0 (0,0)	1 (100)
4 - 6	22	9 (40,9)	13 (59,1)	5	2 (40,0)	3 (60,0)
6 - 8	12	8 (66,7)	4 (33,3)	1	1 (100)	0 (0,0)
8 - 10	11	6 (54,5)	5 (45,5)	1	0 (0,0)	1 (100)
> 10	3	1 (33,3)	2 (66,7)	0	0 (0,0)	0 (0,0)
TOTAL	173	73 (42,2)	100 (57,8)	134	70 (52,2)	64 (47,8)

Pos^a = Amostras positivas em ambos os testes (IFI e ELISA)

Neg^b = Amostras negativas em ambos os testes ou pelo menos em um (IFI e/ou ELISA)

SRD^c = Cães sem raça definida

CRD^d = Cães com raça definida

n = número de amostras de soros testadas

5- DISCUSSÃO

Entre os testes sorológicos mais utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose, estão a imunofluorescência indireta e o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). O teste de imunofluorescência indireta (Camargo, 1964) apresenta boa especificidade. Ele é amplamente utilizado para o diagnóstico da toxoplasmose em diferentes espécies de animais inclusive da toxoplasmose humana (Ahmed et al., 1983; Guimarães et al., 1992). Por este teste, a maioria dos trabalhos citados na literatura consideram positivos os soros apresentando títulos ≥ 16 ou ≥ 64 . Guimarães et al. (1992), em um estudo soroepidemiológico em suínos no município de Igarapé - M.G., consideraram positivos os soros com títulos ≥ 16 e Ahmed et al. (1983), estudando a relação da toxoplasmose com outras doenças, consideraram positivos somente os soros apresentando título ≥ 64 .

O ELISA (Voller et al., 1976), é uma técnica que apresenta alta sensibilidade e boa especificidade. Dubey (1995) apud Ferreira (1997), em estudo para determinar a especificidade e sensibilidade de diferentes testes sorológicos, observou que o teste de ELISA foi o que apresentou maiores índices de resultados falsos positivos. Ferreira (1997), estudando a prevalência de toxoplasmose em veados-campeiros e cervos do Pantanal por hemaglutinação

indireta, IFI e ELISA, considerou negativas as amostras reativas somente por este teste.

No presente estudo, IFI e ELISA foram utilizados para determinar a prevalência de anticorpos anti - *T. gondii* em amostras de soros de cães doentes atendidos no Hospital Veterinário da UFU e cães doentes e aparentemente sadios do Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia - MG.

Para se obter um diagnóstico mais preciso da toxoplasmose neste animais, os resultados obtidos na IFI e ELISA, foram confirmados por “western-blot” pelo fato deste teste ser altamente sensível, além de permitir a visualização de determinados epítopos específicos do *Toxoplasma gondii* os quais funcionam como marcadores moleculares da infecção toxoplásmica.

Um limite de positividade, “cut-off”, para se interpretar os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* não foi estabelecido para nenhuma espécie de hospedeiro (Quist et al., 1995 apud Ferreira, 1997) provavelmente devido à ausência de padronização de cada teste às diferenças na sensibilidade e especificidade (Dubey, 1985). Por isso, no presente trabalho o “cut-off” para as reações de IFI e ELISA foi determinado através dos cálculos de sensibilidade e especificidade (Guimarães, 1985) utilizando-se o “western-blot” como teste de referência.

Pelo “western-blot” foram testadas mais de 50% das amostras, sendo consideradas positivas somente aquelas que apresentaram marcação referente ao antígeno P30. Após os cálculos da especificidade e sensibilidade relativas, o “cut-off” ≥ 32 e ≥ 64 determinado para IFI e ELISA, respectivamente, foi em função de se obter um maior equilíbrio entre estes dois testes. Embora com “cut-off” ≥ 16 na IFI obteve-se valores sensibilidade e especificidade mais próximos (S = 84,0% e E = 85,1%), foi escolhido “cut-off” ≥ 32 (S = 71,7% e E = 95,9%) por apresentar menos falsos positivos e, quando estes valores são avaliados com

aqueles apresentados por ELISA com “cut-off” ≥ 64 , aumenta-se a possibilidade de se obter um diagnóstico mais preciso.

A proteína SAG-1 (P30), foi a proteína determinante de positividade ou negatividade no “western-blot” das amostras de soros do presente estudo por ser uma das principais proteínas de superfície do estágio taquizoíta (Couvreur et al., 1988, Parmley et al., 1992). É uma proteína altamente imunogênica e constitui cerca de 5% do total de proteínas de taquizoítas (McLeod, 1991; Grimwood e Smith, 1995). A maior parte da sua atividade imunogênica está restrita a uma única região (Rodriguez et al., 1985; Velge-Roussel, 1994).

O efeito imunogênico da P30 foi testado experimentalmente com o uso de adjuvante. Camundongos foram imunizados com P30 da cepa RH e lipossomo como adjuvante antes de serem infectados com taquizoítas da cepa C. No 17º dia após a infecção, apenas 7% dos animais haviam morrido ao passo que dos animais controle o índice de mortalidade para o mesmo dia foi de 73% (Bulow, 1991).

Outros antígenos de taquizoíta, como a P63, P43, P39, não foram avaliados pelo “western-blot” porque trabalhos têm demonstrado que eles compartilham epitopos comuns a antígenos de bradizoíta. Darcy et al. (1990), observaram que a P43 apresenta reação positiva para soro de camundongo e rato anti - bradizoíta.

Mamíferos e aves de várias espécies podem ser infectados por *T. gondii* e representam seus hospedeiros intermediários. Os estágios do parasita encontrados nestes hospedeiros são taquizoítas e cistos teciduais intracelular. Exame de tecido de cães e gatos demonstrou maior número do parasita no cérebro, coração e fígado (Svoboda et al., 1988). O *T. gondii* encista em resposta à aquisição de imunidade pelo hospedeiro (Rhyan & Dubey, 1992) permanecendo latente por toda a vida destes ou até por ocasião de uma queda de imunidade.

Os cães são considerados animais altamente susceptíveis a este parasita, provavelmente devido ao hábito de carnivorismo, que facilita a ingestão de

tecidos contaminados com cistos, e ao contato com o solo contaminado com oocistos esporulados (Germano et al., 1985).

Em muitos cães, a infecção permanece subclínica. A toxoplasmose clínica, ocorre mais frequentemente associada ao vírus causador da cinomose, sendo encontrado também casos associados a disfunção renal e hepática (Riemann et al., 1978; Rhyan & Dubey, 1992). Em casos clínicos de infecção provocada pelo vírus da cinomose, relatados na Inglaterra, o *Toxoplasma* foi encontrado em 99% dos relatos (Dubey, 1985).

Ahmed e colaboradores (1983), associaram os altos títulos de anticorpos anti - *T. gondii* encontrados em soros de cães ao “stress”, fraturas, parasitismo por helmintos e infecções bacterianas e virais. Eles observaram 62,7% de casos positivos apresentando uma destas disfunções, 28,8% apresentando tumor e 5,2% doença renal. Durante uma epidemia provocada pelo vírus da cinomose nos anos 1984 - 1985, foram diagnosticados 6 casos de toxoplasmose associada ao vírus (Ehrensperger & Pospischil, 1989).

No presente estudo, observou-se que amostras de soros de cães aparentemente sadios apresentaram maior incidência de animais soropositivos, comparando-se com amostras referentes a cães doentes. Uma diferença significativa na soropositividade foi detectada quando se estratificou as amostras de soros provenientes de animais de diferentes grupos e divididos quanto ao sexo, raça e idade. Por outro lado, não foi estatisticamente significativa a diferença na soropositividade quando os grupos de animais não foram estratificados.

Muitos estudos foram feitos correlacionando a incidência de anticorpos anti - *T. gondii* com o sexo dos animais (Maldonado et al., 1986; Jackson, 1987; Marder et al., 1990). Vários autores não encontraram diferença na prevalência de infecção entre animais machos e fêmeas de diferentes espécies de animais domésticos e silvestres. Em um estudo epidemiológico, soro de 253 cães apresentaram 79,05% de casos positivos e nenhuma diferença estatisticamente

significante dos casos positivos foi observada quanto ao sexo (Maldonado et al., 1986).

Ferreira (1997), em estudo para detecção de anticorpos anti - *T. gondii* em veados campeiros e cervos do pantanal, não observou existência de diferenças significativas na prevalência de anticorpos em relação ao sexo. No presente trabalho, as diferenças na incidência de amostras soropositivas de cães machos e fêmeas do mesmo grupo (machos doente x fêmeas doentes; machos aparentemente saudios x fêmeas aparentemente saudias) não foram estatisticamente significativas. Isto demonstra que animais de ambos os sexos apresentam possibilidades de serem infectados. Entretanto, quando avaliados os resultados de amostras soropositivas de grupos diferentes (machos doentes x machos aparentemente saudios de rua; fêmeas doentes x fêmeas aparentemente saudias de rua) em relação ao sexo, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas. Os testes revelaram que machos e fêmeas aparentemente saudios de rua foram mais susceptíveis à infecção.

Svoboda e Svobodová (1987), relataram que anticorpos anti - *T. gondii* são encontrados com menos frequência em cães e gatos mantidos em apartamentos e alimentados com comida submetida ao calor do cozimento. Em vista da grande concordância entre inúmeros autores em atribuírem a machos e fêmeas frequências semelhantes de infecção, as diferenças aqui encontradas podem ser devido à origem dos animais aparentemente saudios. A grande maioria das amostras de soros de cães aparentemente saudios foram obtidas de animais que vivem nas ruas de Uberlândia e que foram capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses. Cães vivendo nestas condições, têm maior acesso a diferentes ambientes e alimentos provavelmente contaminados com formas do parasita, o que pode estar aumentando os riscos de contaminação.

Diferenças significativas na prevalência de toxoplasmose nos animais quanto às diferentes raças foram descritas por Svoboda e Svobodová (1987). No

estudo de soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães e gatos, observaram que gatos da raça Européia de pêlo curto apresentaram maior índice de positividade em relação às outras raças estudadas. Nenhuma diferença, portanto, foi observada entre as raças dos cães. Os mesmos resultados foram encontrados por Riemann et al. (1978), que, pesquisando a prevalência de anticorpos anti - *T. gondii* em soros de cães, gatos, cavalos e bovinos de raças diversas, não encontraram nenhuma diferença estatística significativa. No presente estudo, não foi observado diferenças estatisticamente significantes na prevalência de anticorpos em amostras de cães do mesmo grupo quanto à raça (cães doentes sem raça definida x cães doentes com raça definida), porém cães aparentemente sadios sem raça definida mostraram-se significativamente mais propícios à infecção (cães aparentemente sadios sem raça definida x cães doentes sem raça definida).

Jackson et al. (1987), ao estudarem a prevalência *Toxoplasma gondii* em 153 cães, encontraram maior porcentagem de cães infectados com idade acima de seis meses (27,9%) do que aqueles com idade abaixo de 6 meses ($p < 0,001$). A prevalência de anticorpos anti - *T. gondii*, no presente estudo, apresentou-se mais elevada nas amostras de soros de cães doentes com idade acima de dois anos ao passo que foi maior em animais jovens (0 a 2 anos) aparentemente sadios “de rua”. Estas diferenças foram estatisticamente significativas e podem ser explicadas pelo fato dos cães aparentemente sadios estarem mais expostos aos riscos de infecção desde a tenra idade. O número insuficiente de amostras de soros de cães aparentemente sadios com idade superior a dois anos é explicado em virtude de serem capturados antes de atingirem idades mais elevadas.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a susceptibilidade dos cães à infecção pelo *T. gondii* e o seu papel no ciclo epidemiológico do parasita. Sendo assim, é de suma importância se avaliar a real participação deste grupo de animais domésticos como fator de transmissão da infecção para o homem,

determinando-se os principais fatores que concorrem para sua elevada freqüência. Em adição, as reações sorológicas que detectam imunoglobulinas específicas ao *T. gondii* devem ser utilizadas com o objetivo de se confirmar o grau de reatividade contra os componentes específicos deste parasita, os quais funcionam como marcadores moleculares de alto valor diagnóstico.

6- CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- A determinação dos valores de sensibilidade e especificidade para os testes IFI e ELISA, baseada no perfil de reatividade do WB, foi decisiva para estabelecer o critério de positividade (“cut off”) para os referidos testes.

- Foram observadas 143 (46,6%) amostras concordantes positivas (IFI + / ELISA+) e 109 (35,5%) amostras concordantes negativas (IFI - / ELISA-), em ambos os testes. Os resultados discordantes representaram 14,3% para IFI - / ELISA + e apenas 3,6% para IFI + / ELISA-, demonstrando maior sensibilidade do teste ELISA.

- Os títulos de anticorpos variaram de 32 - 4.096 para IFI, com predominância do título 128 e de 64 - 42.768 para ELISA, com predominância dos títulos de 64 e 512 - 1024, tanto nos grupos de animais doentes como nos aparentemente sadios.

- A soroprevalência no grupo de animais doentes (42,2%) não foi estatisticamente diferente da encontrada no grupo de animais aparentemente saudáveis (52,2%).

- O grupo de animais aparentemente saudáveis apresentou soroprevalência significativamente maior quanto ao sexo, raça e idade em relação ao grupo de animais doentes.

- O perfil imunológico das amostras analisadas pelo WB revelou predominância de anticorpos com reatividade para SAG-1 (P30) e outras proteínas diretamente proporcional aos títulos crescentes de anticorpos detectados pelo IFI e ELISA.

- A associação dos testes WB, IFI e ELISA constituem métodos eficazes para o estabelecimento seguro da soroprevalência para *T. gondii* em cães.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGANGA, A. O., ORTESE, A. A.. A Serological survey of *Toxoplasma gondii* in pet dogs in Nigeria. **British Veterinary Journal**, v. 140, p. 207 - 209, 1984.

AHMED, B. A., GAAFAR, S.M., WEIRICH, W.E. et al. Relationship of *Toxoplasma* infections to other diseases in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 12, p. 199 - 203, 1983.

AMBROISE-THOMAS, P., PELLOUX, H. Toxoplasmosis - Congenital and in immunocompromised patients: A Parallel. **Parasitology Today**, v. 9, n.2, p.61 - 63, 1993.

ÁNGEL, J. E., MARINKELLE, C. J., SÁNCHEZ, N., GUHL, F. Diferenciación antigénica entre tres estadios del ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* mediante anticuerpos fluorescentes. **Revista Latino-american Microbiology**, v. 33, p. 257 - 263, 1991.

- BJERKAS, I., DUBEY, J. P. 1991. Evidence that *Neospora Caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of norwegian dogs. **Acta. Vet. Scand.** v. 32, p. 407 - 410.
- BRAUND, K.G., BLAGBURN, B.L., TOIVIO-KINNUCAN, M., et al. Toxoplasma Polymyositis/Polyneuropathy - A new clinical variant in two mature dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 24, n. 1, p.93 - 97, 1988.
- BÜLOW, R., BOOTHROYD, J.C. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 10, p. 3496 - 3500, nov. 1991.
- CAMARGO, M.C.V., ANTUNES, C.M.F., CHIARI, C.A.. Epidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* no município de Ribeirão das Neves, MG. Importância dos animais domésticos como fonte de infecção do *Toxoplasma gondii* para o homem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n.3, p.211 - 214, 1995.
- CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect Immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 6, p. 117, 1964.
- COUVREUR, G., SADAK, A., FORTIER, B., DUBREMETZ, J.F. Surface antigens of *Toxoplasma gondii* **Parasitology**, v. 97, p. 1 - 10, 1988.

DARCY, F., CHARIF, H., CARON, H. et al. Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* with cross-reactive epitopes. **Parasitology Research**, v. 76, p. 473 - 478, 1990.

DOBOS-KOVACS, M., VARGA, I. Experimental study of generalized canine Toxoplasmosis. **Acta. Vet. Academie Scientiarum Hungaricae**, v. 30, p. 121 - 133, 1982.

DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., TOPPER, M.J. et al. Fatal toxoplasmosis in dogs. **Journal of The American Animal Hospital Association.**, v.25, p. 659 - 664, 1989.

DUBEY, J.P. A review - Toxoplasmosis in dogs. **Canine Practice**, v.12, n.6, p.7-28, 1985.

DUBEY, J. P., COSENZA, S.F., LIPSOMB, T. P. et al. Acute sarcocystosis-like disease in a Dog. **JAVMA**. v. 198, n. 3 p. 439 - 443, 1991.

DUBEY, J. P. Sensitivity and specificity of various seologic test for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 8, p. 1030 - 1036, 1995.

EHRENSPERGER, F. , POSPISCHIL, A. Spontane mischinfektionen mit staupevirus und Toxoplasmen beim hund. **Deutsche Tierarjtliche Wochencchrift**. v. 96, n. 4, p. 184 - 186, 1989.

FAUST, E. C., GIRALDO, L. E., CAICEDO, G., et al. Human isosporosis in the Western hemisphere. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, p. 343 - 349, 1961.

FELDMAN, H. A. Epidemiology of Toxoplasma Infections. **Epidemiology Reviews**, v. 4, p. 204 - 213, 1982.

FERREIRA, Ronize Andréia. **Toxoplasmose silvestre: detecção de anticorpos anti - *Toxoplasma gondii* em veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) naturalmente infectados.** Uberlândia, 1997. 130p. (Dissertação, Mestrado).

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

GANLEY, J.P., COMSTOCK, G.W. Association of cats and toxoplasmosis. **American Journal of Epidemiology**, v. 111, n. 2, p. 238 - 246, 1980.

GAZZINELLI, R. T., HAKIM, F. T., HIENY, S. et al. Synergistic role of CD4⁺ e CD8⁺ T lymphocytes in INF- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 146, p. 286 - 292, 1991.

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

GONÇALVES, A. C. P & YAMAMOTO, J. H. Toxoplasmose ocular. Aspectos Imunológicos. **Revista de Medicina**, v. 76, n. 2, p. 130 - 141, 1997.

GRIMWOOD, J. & SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: The role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. **Experimental Parasitology**, v. 74, p. 106 - 111, 1992.

GRIMWOOD, J. & SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: redistribution of tachyzoite surface protein during host cell invasion and intracellular development. **Parasitology Research**, v.81, p. 657 - 661, 1995.

GRIMWOOD, J., SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. **International Journal of Parasitology**, v. 26, p. 169 - 173, 1995.

GRIMWOOD, J., MINEO, J. R., KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4099 - 4104, 1996.

GOYAL, M., GANCULY, N. K., MAHAJAN, R. C. Immunological response in experimentally reactivated toxoplasmosis in mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 178, p. 269 - 278, 1989.

GUIMARÃES, M. C. S. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n.2, p.117 - 120, 1985.

GUIMARÃES, A. M., RIBEIRO, M. F. B., LIMA, J. D. et al. Frequência de anticorpos anti - *Toxoplasma gondii* em suínos da raça Piau. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 44, n. 1, p. 69 - 71, 1992.

HALL, S. M. Congenital toxoplasmosis. **BMJ.**, v. 305, p. 291 - 306, 1992.

HANDMAN, E., GODING, J.W., REMINGTON, J.S. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 124, n. 6, p. 2578 - 2583, Jun. 1980.

HARMELIN, A., DUBEY, J.P., YAKOBSON, B., et al. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 43, p.131 - 136, 1992.

HEJLICEK, K., LITERAK, I., LHOTAK, M. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in army dogs in the Czech Republic and Slovak Republic. **Veterinary Medicine**, v. 40, n. 5, p. 137 - 140, 1995.

HILALI, M., FATANI, A., AL-ATIYA, S. Isolation of tissue cystis of *Toxoplasma*, *Isospora*, *Hammondia* and *Sarcocystis* from camel (*Camelus dromedarius*) meat in Saudi Arabia. **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 4, p. 353 - 356, 1995.

HOGHOOGHI-RAD, N., AFRAA, M. Prevalence of toxoplasmosis in humans and domestic animals in Ahwaz, capital of Khoozestan province, south-west Iran. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 163 - 168, 1993.

HUNTER, C. A., REMINGTON, J. S. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, 1057 - 1067, 1994.

ISHIZUKA, M.M., YASUDA, P.H. Incidência de infecção por *Toxoplasma gondii* em cães do município de São Paulo. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 18, n. 2, p. 161 - 165, 1981.

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 - 165, 1987.

JOINER, K. A., DUBREMETZ, J.F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. **Infection and Immunity**, v. 61, n.4, p. 1169 - 1172, 1993.

KASPER, L. H., BOOTHROYD, J. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In WARREN, K. S. **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**, 3. ed., Boston: Blackwell Scientific Publications, p. 269 - 301, 1993.

KASPER, L. H., MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 10, n. 5, p. 184 - 188, 1994.

- KHAN, I. A., MATSUURA, T., FONSEKA, S. et al. Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1^{-/-} mice. **The Journal of Immunology**, v. 156, p. 636 - 643, 1996.
- KIMATA, I., TANABE, K. Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. **Journal of Cell Science**, v. 88, p. 231 - 239, 1987.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. **Nature**, v.277, p. 680 - 685, 1970.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., UPTON, S.J. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Kansas. **Journal of the Helminthological Society**, v. 57, n.1, p. 86 - 88, Jan. 1990.
- LUNDE, M. N., JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal Parasitology**, v. 69, n. 5, p. 806 - 808, 1983.
- MAYA, M., JUAN, JUAN, J. Sondeo serológico para la detección de anticuerpos contra toxoplasmosis en perro de la Ciudad de México y su importancia en salud pública. **Veterinaria . Mexico** . v.17, n.4, p.332-3, 1986.

- MALDONADO, L. J., CAMPOS-BUENO, M., MANÃS-ALMEDROS, I. et al. Estudio seroepidemiológico de la toxoplasmosis canina en la provincia de Granada. **Rev. Ibér. Parasitol.**, v. 46, n. 2, p.185 - 188, 1986.
- MARDER, G., SERAFIN, W. D., ULON, S.N. Prevalencia de anticuerpos Toxoplasmicos en personas y animales domesticos y salvajes. **Veterinaria Argentina**, v. 7, n.61, p.43 - 48, 1990.
- MACPHERSON, J.M., GAJADHAR, A.A. Sensitive and specific polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* for veterinary and medical diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 45 - 48, 1993.
- MCLEOD, R., MACK, D., BROWN, C. *Toxoplasma gondii* - New advances in cellular and molecular biology. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 109 - 121, 1991.
- MINEO, J.R., CAMARGO, M.E., FERREIRA, A.W. Enzyme linked immunosorbent assay for antibodies to toxoplasmosis gondii polissaccharides in human toxoplasmosis. **Infect. & Immun.**, v. 27, p. 283 - 287, 1980.
- MINEO, J. R.,MCLEOD, R., MACK, D.et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 9, p. 3951- 3964, may 1993.

- MINEO, J.R., KASPER, L.H.. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P₃₀). **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 11 - 20, 1994.
- MORALES, J. A., DUBEY, J. P., RODRIGUEZ, F. et al. Neosporosis and Toxoplasmosis-associated paralysis in dogs in Costa Rica. **Applied Parasitology**, v. 36, p. 179 - 184,1995.
- NAKANE, P.K., KAWAOI, A. Peroxidase - labelled antibody: a new method of conjugation. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 22, p. 1084 - 1091, 1974.
- NETO, V. A., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4. Ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 154p.
- NEVES, D.P. *Toxoplasma gondii*. **Parasitologia Humana**. 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1991. p.164 - 176.
- PARMLEY, S. F., SGARLATO, G. D., MARK, J., et al. Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1127 - 1133, 1992.
- PELEMAN. J. WU., FARGEAS, C., DELESSESSE, G. Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon- γ by human mononuclear cells. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 1751 - 1756, 1989.
- PESSÔA, S.B, MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 872p. p 252 - 274.

- PIMENTA, A.L., PIZA, E.T., CARDOSO, R.B., et al. Visceral toxoplasmosis in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 45, p. 323 - 326, 1993.
- PFEFFERKORN, E. R. Cell biology of *Toxoplasma gondii*. IN WYLER, D.J, (Ed.), **Modern Parasite Biology: Cellular Immunological and Molecular Aspects**, Freeman, New York, 26 - 50, 1990.
- QUIST, C. F., DUBEY, J. P., LUTTRELL, M. P. et al. Toxoplasmosis in wild Turkeys: a case report and serologic survey. **Journal of wildlife Diseases**, v. 31, n. 2, p. 255 - 258, 1995.
- REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731p. p.274 - 285.
- RHYAN, J., DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in an adult dog with hepatic necrosis and associated tissue cysts and tachyzoites. **Canine Practice**, v. 17, n. 1, p. 6 - 10, jan./feb. 1992.
- RIEMANN, H.P., KANEKO, J.J., Haghghi, S., et al. The prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among hospitalized animals and stray dogs. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.42, n.4, p. 407 - 413, 1978.
- ROBERT, R., JARRIGE, P. L., MAHAZA, C., COTTIN, J., MAROT-LEBLOND, A., SENET, J. M. Specific binding of neoglycoproteins to *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4670 - 4673, 1991.

RODRIGUEZ, C., AFCHAIN, D., CAPRON, A. et al. Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. **Eur. J. Immunol.**, v. 15, p. 747 - 749, 1985.

ROTHOVA, A. Ocular involvement in toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v.77, p. 371 - 377, 1993.

SAFFER, L. D., PETRI, W. A. Role of galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4681 - 4683, 1991.

SHAD-DEL, F., SARVESTANI, R.G., MILANI, M.S. Sero-prevalence of *Toxoplasma* infection in human and dog population in Shiraz, Iran. **Journal of Applied Animal Research**, v. 3, n. 2, p. 83 - 89, 1993.

SHARMA, S. D. Immunology of toxoplasmosis. In: WYLER, D. J. **Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects**. New York: W. H. Freeman, 1990.

SHEN, L., ZHICHUNG, L., BIAUCHENG, Z., HUAYUAN, Y. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in man and animals in Guangdong, Peoples Republic of China. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p. 357 - 360, 1990.

SIBLEY, L. D. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. **Trends in Cell Biology**, v. 5, p. 129 - 132, 1995.

SILVA, J. S., MORRISSEY, P. J., GRABSTEIN, K. H., MOHLER, K. M., ANDERSON, D., REED, S. G. Interleukin 10 and interferon- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, v. 175, p. 169 - 174, 1992.

SOËTE, M., FORTIER, B., CAMUS, D., DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 76, p. 259 - 264, 1993.

SULLIVAN, P.S., PARDO, A.D. Challenging cases in internal medicine. What's your diagnosis? **Veterinary Medicine**, v.88, n. 4, p. 309 - 320, 1993.

SUZUKI, Y., CONLEY, F. K., REMINGTON, J. S. Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 3050 - 3055, 1990.

SUTER, M. M., HAUSER, B., PALMER, D. G. et al. Polymyositis-polyradiculitis due to toxoplasmosis in the dog: serology and tissue biopsy as diagnostic aids. **Zentralblatt fur Veterinardizin**, v. 31, n.10, p.792 - 798, 1984.

SVOBODA, M. Incidence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from BRNO and its environs. **Acta Veterinaria BRNO**, v. 56, n. 4, p.475 - 486, 1987.

SVOBODA, M., HEJLÍČEK, K., NEUHYBEL, P. et al. Postmortal diagnosis of toxoplasmosis in cats and dogs. **Acta Vet. Brno**, v. 57, p. 31 - 38, 1988.

SVOBODA, M., SVOBODOVÁ, V. Effects of breed, sex, age, management and nutrition on the incidence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs and cats. **Acta Vet. Brno**, v. 56, p. 315 - 330, 1987.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 76, p. 4350 - 4354, 1978.

VELGE-ROUSSEL, F., CHARDÈS, T., MÉVÉLEC, P. et al. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 66, n. 1, p. 31 - 38, jul. 1994.

VOLLER, A., BIDWELL, D. E., BARTLETT, A. et al. A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. **Journal of Clinical Pathology**, v. 29, p. 150 - 153, 1976.

WALKER, W., CRAIG, W. R., FERGUSON, D. J. P., JEBBARI, H., ALEXANDER, J. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, v.65, p.1119 - 1121, 1997.

WARE, P. L. & KASPER, L. H. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 3, p. 778 - 783, 1987.

WEISS, L. M., LAPLACE, D., TANOWITZ, H. B. et al. Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific monoclonal antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 213 - 215, 1992.

WERK, R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells ? **Reviews of Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 449 - 457, 1985.

WERK, R. Biology of *Toxoplasma gondii* host cell entry: the role of recognition and attachment for invasion of host cells. In: MOULDER, J. W. **Intracellular Parasitism**. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1989.

YOUN, J. H., NAM, H. W., KIM, D. J. et al. Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. **Kisaengchunghak Chapchi**, v. 29, p 121-128,1991.