

**RONIZE ANDRÉIA FERREIRA**

mon  
616.993.1  
F 383 t  
TGS/men

**TOXOPLASMOSE SILVESTRE: DETECÇÃO DE ANTICORPOS  
ANTI-TOXOPLASMA GONDII EM VEADOS-CAMPEIROS  
(OZOTOCERUS BEZOARTICUS) E CERVOS DO PANTANAL  
(BLASTOCERUS DICHOTOMUS) NATURALMENTE INFECTADOS.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia, como parte das  
exigências do Curso de Pós-  
Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas para  
obtenção do título de Mestre.

**DIRBI/UFU**



1000179195

**Uberlândia  
Minas Gerais - Brasil**

**1997**

**TOXOPLASMOSE SILVESTRE: DETECÇÃO DE ANTICORPOS  
ANTI-TOXOPLASMA GONDII EM VEADOS-CAMPEIROS  
(OZOTOCERUS BEZOARTICUS) E CERVOS DO PANTANAL  
(BLASTOCERUS DICHOTOMUS) NATURALMENTE INFECTADOS.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia, como parte das  
exigências do Curso de Pós-  
Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. José Roberto Mineo

Orientanda: Ronize Andréia Ferreira

**Uberlândia**

**Minas Gerais - Brasil**

**1997**

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do Prof. Dr. José Roberto Mineo e com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Aos meus pais, Moacir e Lindaura,*

*a quem devo todo o apoio*

*na concretização de meus ideais.*

*"Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando mas a maneira com que respondemos ao desafio.*

*Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes, porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas: só nos obriga a sermos conscientes.*

*Problemas para vencer, liberdade para provar.*

*E enquanto acreditarmos no nosso sonho, nada é por acaso."*

*(Henfil)*

## Agradecimentos

Ao *Dr. José Roberto Mineo*, orientador deste trabalho, pelos ensinamentos, seriedade científica e, acima de tudo, por ter acreditado na realização deste trabalho.

Ao *Dr. Joaquin H. Patarroyo*, do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários da Universidade Federal de Viçosa, pela minha iniciação na pesquisa, por ter cedido as amostras de soro de cervos do pantanal, pela amizade e incentivo constantes.

Ao *Dr. José Maurício Barbanti Duarte*, Presidente da Associação Brasileira de Animais Selvagens, pelas amostras de soro de veados-campeiros e inúmeras sugestões a esta tese.

À *Dr<sup>a</sup> Júlia Maria Costa Cruz*, por seu auxílio, enquanto coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelos ensinamentos e sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao *Dr. Uriel Franco Rocha* por todo apoio, sugestões, incentivo e pelos valiosos ensinamentos científicos.

À *Deise Aparecida Oliveira Silva*, presença imprescindível para o Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, que partilhou comigo todos os sucessos e insucessos dos experimentos e que me deu sempre o maior apoio.

Aos amigos e Professores do Curso de Pós-Graduação, pelo convívio e amizade; especialmente ao *Prof. Sílvio Favoretto*, ao *Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi*, à *Prof<sup>a</sup> Eloísa Amália Vieira Ferro*, ao *Aldo matos*, ao *Antônio Tomaz Júnior* (Junião) e ao *Hélio Elias Júnior* (Juninho).

Às amigas *Elisângela de Paula Silveira, Neide Maria da Silva, Elizabeth Oliveira Miranda e Simone Cardoso Leon*, pela amizade e colaboração prestada no transcorrer deste trabalho.

Ao amigo *Guilherme Rosemberg Guimarães Queiroz* pela amizade e pela dedicação no fornecimento de camundongos.

Às amigas *Teresa C. Lara Lanza de Sá e Melo Marques, Cláudia D'Ávila de Almeida, Ana Cláudia H. Ota e Ana Cristina Lanna*, que, apesar da distância, sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos amigos *Márcio Mendes, Maria Aparecida S. Moreira e Aline Alencar Prates*, do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários da Universidade Federal de Viçosa, pela cooperação e companheirismo.

Ao secretário do curso, *João Martins Neto*, pelos auxílios prestados, pelo apoio e amizade.

Aos meus familiares, especialmente à minha irmã *Rosângela A. Ferreira* e à *Lindalva das Mercês Figueiredo*, pelo apoio e incentivo constantes, e ao meu sobrinho *Caio César Ferreira*, por ter entendido a minha ausência.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)* pelo auxílio Financeiro.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>1- Introdução</b>	1
<b>2- Proposição</b>	16
<b>3- Material e Métodos</b>	18
3.1 Animais estudados	19
3.1.1 Captura dos animais	19
3.1.2 Obtenção das amostras de soros	21
3.1.3 Amostras de soros estudadas	21
3.2 Obtenção das suspensões parasitárias	21
3.3 Reações sorológicas	22
3.3.1 Reação de hemaglutinação indireta (HAI)	22
3.3.1.a. Preparo do extrato antigênico solúvel	22
3.3.1.b. Dosagem de proteínas no extrato antigênico	23
3.3.1.c. Caracterização do perfil eletroforético do antígeno-criólise <i>T. gondii</i> .	23
3.3.1.d. Técnica de sensibilização de hemácias com antígeno-criólise <i>T. gondii</i> .	26
3.3.1.e. Triagem e titulação das amostras de soros de cervídeos utilizando a reação de HAI	27
3.3.2 Reação de imunofluorescência indireta (IFI)	28
3.3.2.a. Preparo do antígeno.	28



3.3.2.b. Preparo do conjugado fluorescente.	29
3.3.2.c. Titulação do conjugado anti-IgG de cervo-FITC.	30
3.3.2. d Triagem e titulação das amostras de soros de cervídeos utilizando a reação de IFI.	30
3.3.3 Teste imunoenzimático dot-ELISA (dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	31
3.3.3.a Preparo do antígeno	31
3.3.3.b Estudo da estabilidade do antígeno de dot-ELISA.	32
3.3.3.c Triagem e titulação das amostras de soro de cervídeos utilizando a reação de dot-ELISA	32
3.3.4 Teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma</i>	33
3.3.4.a Preparo do antígeno	33
3.3.4.b Titulação do conjugado proteína A-peroxidase	34
3.3.4. c Titulação das amostras de soros de cervídeos utilizando a reação de ELISA.	34
3.4 Análise estatística	36
<b>4- Resultados</b>	37
4.1 Padronização da reação de hemaglutinação indireta	38
4.1.1 Caracterização do antígeno-criólise <i>T. gondii</i>	38
4.1.2 Título do antígeno-criólise utilizado na reação de hemaglutinação indireta	38
4.1.3 Escolha do diluente de soro na reação de hemaglutinação indireta.	39

4.1.4 Resultado da triagem das amostras de soros de veados-campeiros ( <i>Ozotocerus bezoarticus</i> ) e cervos do Pantanal ( <i>Blastocerus dichotomus</i> ) pela reação de hemaglutinação indireta.	39
4.1.5 Titulação das amostras de soros de veados-campeiros ( <i>Ozotocerus bezoarticus</i> ) e cervos do Pantanal ( <i>Blastocerus dichotomus</i> ) pela reação de hemaglutinação indireta.	40
4.2 Reação de imunofluorescência indireta	41
4.2.1 Titulação do conjugado anti-IgG de cervo-FITC	41
4.2.2 Resultado da triagem das amostras de soros de veados-campeiros ( <i>Ozotocerus bezoarticus</i> ) e cervos do Pantanal ( <i>Blastocerus dichotomus</i> ) utilizando a reação de imunofluorescência indireta	41
4.2.3 Titulação das amostras de soros de veados-campeiros ( <i>Ozotocerus bezoarticus</i> ) e cervos do Pantanal ( <i>Blastocerus dichotomus</i> ) pela IFI.	42
4.3 Padronização do dot-ELISA.	42
4.3.1 Escolha da concentração ideal do antígeno-criólise utilizado no dot-ELISA.	42
4.3.2 Titulação do conjugado proteína A-peroxidase	43
4.3.3 Triagem e titulação das amostras de soros de veados-campeiros ( <i>Ozotocerus bezoarticus</i> ) e cervos do Pantanal ( <i>Blastocerus dichotomus</i> ) através da reação de dot-ELISA.	44
4.3.4 Resultado do teste de estabilidade do antígeno de dot-ELISA	44
4.4 Padronização da reação de ELISA	45
4.4.1 Titulação do conjugado proteína A-peroxidase	45

4.4.2 Triagem e titulação das amostras de soros de veados- campeiros ( <i>Ozotocerus bezoarticus</i> ) e cervos do Pantanal ( <i>Blastocerus dichotomus</i> ) utilizando a reação de ELISA	45
4.5 Índices de co-positividade e co-negatividade	46
4.6 Resultados comparativos entre os testes HAI, IFI, dot-ELISA e ELISA	47
<b>5- Discussão</b>	49
<b>6- Conclusões</b>	67
<b>7- Resumo</b>	71
<b>8- Abstract</b>	74
<b>9- Anexo</b>	76
<b>10- Referências Bibliográficas</b>	110

# Introdução



## 1- INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, uma infecção sistêmica causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, acomete uma variedade de mamíferos e aves domésticos e silvestres e algumas espécies de animais de sangue frio (DE ALENCAR, 1957; LEVINE, 1977). Enquanto a infecção é muito comum, a doença clínica é rara, sendo normalmente restrita a certas espécies particularmente susceptíveis, incluindo macacos do Novo Mundo e marsupiais (PATTON *et al.*, 1986; DUBEY & BEATTIE, 1988; JOHNSON *et al.*, 1988; DRESSEN, 1990), assim como grupos de risco dentro das espécies.

No homem, esta zoonose é freqüente e constitui um problema clínico maior em dois contextos: se uma mulher tem uma infecção primária durante a gravidez, o feto que está desenvolvendo-se pode se tornar infectado e sofrer severos defeitos congênitos. A toxoplasmose primária ou crônica reativada em pacientes com problemas na imunidade celular, como no caso da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), pode resultar em encefalite fatal.

Em animais domésticos, o interesse na avaliação da prevalência da toxoplasmose silvestre tem sido revisto. A relevância desses estudos está diretamente relacionada com o ciclo de transmissão desta parasitose, em que o contato de tais animais com o homem, seja diretamente ou através da utilização destes como fonte de alimentos, representa um papel importante como reservatórios da infecção (SOGORB *et al.*, 1972). Embora pesquisas indiquem que animais silvestres freqüentemente sejam sorologicamente positivos para *Toxoplasma gondii* (DUBEY & BEATTIE, 1988; DRESSEN, 1990), o papel da

vida silvestre na transmissão da infecção não é bem entendido (LINDSAY *et al.*, 1991; HUMPHREYS *et al.*, 1995).

Os mecanismos de transmissão de *T. gondii* são variados, destacando-se os oocistos em fezes de felídeos jovens infectados e ingestão de cistos presentes em carnes. Quanto ao primeiro mecanismo, há citações na literatura (DUBEY, 1976, 1978 e 1995b; DUBEY *et al.*, 1990) relacionadas à duração de imunidade para liberação de oocistos de *T. gondii* por gatos e o número de oocistos liberados por estes. DUBEY (1995a) inoculou oralmente 6 gatos com cistos da cepa ME-49 e 6 gatos com a cepa Ts-2. Todos eles liberaram 20-150 milhões de oocistos após infecção primária. A eliminação de oocistos dura de 3 a 4 semanas, porém os gatos podem reinfetar-se e voltar a eliminar oocistos. A imunidade à infecção pelo *T. gondii* em gatos pode ser afetada por vários fatores, tal como idade do gato no tempo da infecção primária, a cepa, o estágio e a rota usada para infecção primária, infecções secundárias, estado nutricional e infecções concorrentes. Em relação à segunda forma de transmissão, SACKS *et al.* (1983) documentaram a presença da toxoplasmose-infecção em 3 caçadores de cervos. Em todos os 3 casos, os pacientes estavam agudamente doentes e requereram hospitalização. Todos os 3 tinham consumido carne crua ou mal cozida de cervo e não havia outros fatores de risco para toxoplasmose, tais como contato com gatos ou comer carne crua ou mal cozida de outros animais. Recentemente, BONAMETTI *et al.* (1997) apresentaram 17 casos de toxoplasmose aguda sintomática adquirida pela ingestão de carne crua de carneiro, servida em uma festa à qual todos os pacientes compareceram. Em relação ao quadro clínico, o período de incubação da doença variou de 6 a 13 dias ( $10,9 \pm 7,0$ ), e 16 (94,5%) pacientes apresentaram febre, cefaléia, mialgia, artralgia e adenomegalia. Todos os pacientes apresentaram títulos séricos de anticorpos específicos (IgG e IgM) que evidenciavam fase aguda de toxoplasmose, pela

reação de imunofluorescência indireta. É de importância, ainda, a ingestão de taquizoítas encontrados nos líquidos orgânicos, excreções e secreções. VÍTOR *et al.* (1991) utilizaram como modelo experimental 17 cabras, para demonstrar a eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite. Esses animais foram infectados pela via subcutânea com  $10 \times 10^6$  taquizoítas da cepa C4 de *T. gondii* e, posteriormente, procedeu-se à inoculação dos materiais (urina, saliva e leite) em camundongos. Foram considerados infectados os camundongos que apresentaram taquizoítas no exsudato peritoneal, cistos no cérebro e/ou anticorpos circulantes anti-*T. gondii*. Foi possível demonstrar a eliminação de *T. gondii* através da urina, saliva e leite dos caprinos experimentalmente infectados. Outras vias de transmissão, como, por exemplo, transfusão de sangue e seus derivados, e acidentes de laboratório, já foram evidenciadas (AMATO NETO *et al.*, 1963). A toxoplasmose congênita em animais é de extrema importância em medicina veterinária, causando abortos e perdas neonatais em ovelhas, cabras e porcos, com todas as raças sendo igualmente susceptíveis (BUXTON, 1993).

A escassa literatura sobre a incidência e a prevalência de toxoplasmose em animais silvestres da fauna brasileira restringe-se a poucas espécies, quando comparada com a diversidade de exemplares aqui existentes.

Em anfíbios e répteis, DE ALENCAR (1957) relatou, em especial, o encontro de *Toxoplasma gondii* no cérebro de um sapo (*Bufo marinus*) no Brasil, e LEVINE (1977) descreveu a presença do organismo em sapos, rãs, cobras e iguanas.

Não se tem dados suficientes sobre a prevalência da toxoplasmose em aves, devido ao fato de muitos dos testes sorológicos empregados não serem reais indicadores da infecção (FRENKEL, 1981; DUBEY *et al.*, 1993). Entretanto, aves exemplificadas por perus, patos, pelicanos, pombos, gralhas e canários, dentre outras, são outrossim

acometidas pela toxoplasmose (SOGORB *et al.*, 1972; SOGORB *et al.*, 1977; IPPEN *et al.*, 1981; LINDSAY *et al.*, 1994; QUIST *et al.*, 1995), o que vem afirmar o caráter eurixeno do *T. gondii*, capaz de infectar representantes de grupos zoológicos bem distanciados.

Numerosas espécies de mamíferos têm sido encontradas naturalmente infectadas pelo *Toxoplasma gondii*. A frequência dessas infecções contudo, pode variar de uma área para outra, sendo que a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em animais silvestres é mais elevada entre os carnívoros. Os resultados de um estudo sorológico, conduzido por FERRARONI & MARZOCHI (1980), mostraram a ocorrência de 75% dos felídeos silvestres (*Felis* sp.) com sorologia positiva. Em São Paulo, SOGORB *et al.* (1977) relataram 66,6% de positividade no exame sorológico de gatos do mato (*Felis pardinoides*) e em 83,3% das jaguatiricas (*Felis pardalis*). Ainda em carnívoros BRISCOE *et al.* (1993) e DUBEY & BEATTIE (1988) afirmaram que a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* no urso preto (*Ursus americanus*) é a mais alta (80%) entre todas as espécies de hospedeiros de sangue quente, incluindo humanos, examinados nos Estados Unidos.

O onivorismo resulta em uma taxa de prevalência intermediária entre herbívoros e carnívoros, devido a uma grande porção de sua dieta consistir de vegetais não contaminados com cistos teciduais implicados no ciclo carnívoro de *Toxoplasma gondii*. Desta forma, SMITH & FRENKEL (1995) afirmam a hipótese da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em carnívoros ser maior que em onívoros, e esta ser maior que em herbívoros. Gambás e guaxinins são muito utilizados como animais de estimação nos Estados Unidos. Os animais capturados, muitas vezes, também são comidos, especialmente por habitantes do meio rural. Deste modo, BURRIDGE *et al.* (1979) sugerem, em um estudo detalhado, o risco que esses animais onívoros representam para a saúde pública.



Sabe-se que um carnívoro silvestre pode tornar-se infectado facilmente pela ingestão de tecidos contendo cistos de *Toxoplasma*, mas a forma como um herbívoro, tal como cervídeo, é infectado não é completamente entendido.

Existem 17 gêneros e 53 espécies de cervídeos encontrados na América do Norte, América do Sul, África Ocidental, Eurásia, Japão, Filipinas e partes da Indonésia (WALLACH & BOEVER, 1983). Esses animais têm sido introduzidos em quase todos os outros países ocupados pelo homem. O grupo dos cervídeos é um dos mais importantes grupos de Artiodactylideos no mundo (FOWLER & BOEVER, 1986). Existem no Brasil 6 espécies da família Cervidae, sendo elas: *Blastocerus dichotomus* (cervo do Pantanal), *Odocoileus virginianus* (veado-galheiro), *Ozotocerus bezoarticus* (veado-campeiro), *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro), *Mazama americana* (veado-mateiro) e *Mazama nana* (veado-bororó). Destas, duas (veados-campeiros e cervos do Pantanal) estão na lista dos ameaçados de extinção (BERNARDES *et al.*, 1990) e outras duas se apresentam com redução populacional significativa.

Cervídeos são herbívoros, alimentam-se de capins, galhos, folhas, cascas de árvores, brotos de árvores e outras plantas. Em cativeiro, os cervos freqüentemente alimentam-se do capim disponível, ramos e galhos. Entretanto, a vegetação existente deve ser complementada com fornecimento de ração peletizada, sal mineral à vontade, fornecimento de alimentos verdes de boa qualidade, leguminosas e gramíneas tenras. Para os neonatos, considera-se como ideal o leite caprino, e, como segunda opção, o leite bovino. Uma alimentação adequada é essencial para boa reprodução e desenvolvimento do animal. A infecção desses animais pelo *Toxoplasma gondii* pode resultar de oocistos expostos no solo, forragem contaminada ou, possivelmente, água contaminada.

O cervo do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) é uma espécie ameaçada de extinção. Esse declínio populacional vem ocorrendo de forma acelerada devido a diversos fatores, como destruição de seu habitat e contato com várias enfermidades. No Brasil, *Blastocerus dichotomus* é conhecido por muitos nomes comuns, sendo os mais freqüentes, cervo do Pantanal e veado do brejo. Essa espécie já foi encontrada na Bolívia, norte da Argentina, Uruguai, Paraguai, Peru e Brasil, ocupando áreas de banhado preferencialmente, onde pode obter o seu alimento com facilidade e proteger-se dos predadores. É o maior cervídeo brasileiro, com as fêmeas pesando por volta de 100kg e os machos aproximadamente 130kg, com aproximadamente 1,3 metros de altura. Sua coloração geral é avermelhada e seu pêlo tem aspecto lanoso. Os membros são enegrecidos, bem como a cauda, a região orbital e o focinho. A face interna da orelha, a região submandibular e o ventre baixo são brancos. Na região anterior dos olhos, posiciona-se um sulco lacrimal avantajado, que é evertido quando o animal se sente ameaçado. As orelhas são grandes e de forma arredondada. Os chifres são ramificados e podem chegar a apresentar até 10 pontas cada, conforme sua idade e o nível de sua alimentação. Os chifres têm a característica de produzir uma dicotomização à sua base, saindo dois ramos principais. As trocas dos chifres parecem não ser anuais, mas, dependendo da fase de desenvolvimento, isso pode acontecer (DUARTE, 1996). Devido às dificuldades durante a captura e no manuseio dos cervos do Pantanal, nenhum estudo mais amplo, no que se refere a doenças infecciosas nessa espécie, tem sido conduzido (PINDER, 1994). Várias estratégias têm sido utilizadas para a captura de veados em seus habitats e, em geral, baseiam-se no uso de alimentos para a atração de animais a vários tipos de armadilhas, imobilização física usando rede portátil, rede gol e “net-gun”, complementadas com o uso de anestésicos ou drogas hipnóticas; imobilização química dos animais via rifle

de dardos combinada a um sistema de rádio localização e ainda contenção manual, quando se trata principalmente da captura de filhotes. A adequação de cada uma das estratégias depende de vários fatores, como o tamanho e densidade da população, abundância de alimento, características fitogeográficas da região e nível de interação entre homem e a população de interesse. O custo é um parâmetro adicional comumente usado como fator decisivo na adoção de uma estratégia para a captura (DUARTE & PIOVEZAN, 1996). Quando a captura envolve grandes cervídeos, cuidados extras devem ser tomados. Os cervídeos são particularmente susceptíveis ao “stress” e à miopatia de captura (CONNER *et al.*, 1987). Atualmente, não existem informações completas sobre como se distribui o cervo do Pantanal nos distintos países. No Pantanal, em um levantamento realizado em 1993, verificou-se que a densidade de indivíduos varia de 0 a 1+ cervo do pantanal/km<sup>2</sup>, com um total estimado de  $36.314 \pm 4.923$  indivíduos (MAURO, 1993). Em termos históricos, o plantel de cervo do Pantanal em cativeiro iniciou-se a partir de 60 animais fundadores capturados na natureza. Compondo esse plantel, existem hoje poucos animais, portanto, considera-se que a abundância e a viabilidade populacional deve ser implementada.

O veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) foi descrito por RIBEIRO (1919 apud DUARTE, 1996) no aspecto morfológico no trecho que se segue:

“É pela forma, o mais gracioso dos veados brasileiros, sendo de estatura medíocre e de coloração ruivo-baia, com partes inferiores brancas. Esta segunda cor ocupa a parte interna e um pouco do lado ínfero-externo das orelhas, uma nódoa entre os olhos e as orelhas nas fêmeas, um anel perioftálmico, uma nódoa ao lado e abaixo das narinas no beijo superior, todo o beijo inferior, queixo e garganta, toda a parte inferior do tronco, e parte interna das patas até pouco acima da articulação do carpo e do tarso, uma

nódoa do lado interno do calcâneo, região perineal e sub-caudal. A cor preta só aparece na parte nua das narinas, nas pálpebras superior e nas pestanas da inferior e nos cascos. O lado súpero-terminal da cauda é sepiáceo escuro. O caráter mais notável do pêlo deste animal é a sua direção antevertida, do meio do dorso ao meio do pescoço, numa faixa dorsal de uns dez centímetros de largura. Todo o pêlo ruivo-baio tem a base alvadia e a ponta denegrada; o pêlo branco é uniforme ... o pêlo das orelhas é muito curto no lado externo; o do corpo é vasto e o das regiões tóraco-abdominal e sub-caudal mais longo. O macho tem chifres subcilíndricos ou prismáticos e tri-ramosos, da mesma feição geral de *Dorcephalus dichotomus*, a sua direção é uniformemente divergente para cima; os seus galhos 1 e 2 são sempre os mais fortes, ante e supravertidos, sendo raro que um terceiro ramo apareça nessa posição, antes da ponta terminal que, geralmente, é inclinada para tras; além dessa direção dominante, as pontas oferecem uma ligeira curva para dentro. Nas partes mais grossas e inferiores, bem como na roseta, são os chifres deste veado mais rugosos e sobretudo mais nodulados que em qualquer das outras espécies brasileiras...”.

O veado-campeiro pesa em torno de 30 kg e mede por volta de 0,65m na cernelha (DUARTE, 1996). A espécie foi dividida por CABRERA (1960) em 3 subespécies, sendo elas: *O. bezoarticus bezoarticus*, que ocupa o Brasil central e oriental entre a borda sul da Amazônia e o planalto do Mato Grosso, chegando até a bacia do rio São Francisco e estendendo-se no sentido sul, aparentemente até o Rio Grande do Sul e Uruguai; *O. bezoarticus aler* ocupa o distrito pampásico da República Argentina e o *O. bezoarticus leucogaster* ocupa o sudoeste do Brasil e sul do Mato Grosso, extremo sudeste da Bolívia, Paraguai e norte da Argentina, até o chaco Santiaguinho e o norte das províncias de Santa Fé e Corrientes.

O veado-campeiro habita áreas de cerrado aberto ou campo aberto, sendo, segundo REDFORD (1987), a espécie de cervídeo sul-americano menos conhecida. A população da espécie, estimada em cativeiro, é de 21 animais, sendo 13 machos e 8 fêmeas. Este pequeno número de indivíduos provocará a ocorrência de endogamia em curto espaço de tempo, o que levará ao aumento do grau de consangüinidade e conseqüentemente diminuição da variabilidade genética.

O fato da família Cervidae pertencer à ordem Artiodactyla, assim como os bovinos, ovinos e caprinos, facilita a aplicação de técnicas utilizadas em inquéritos sorológicos para essas espécies, com pequenas modificações.

A demonstração da presença de *Toxoplasma* no organismo do paciente ou o isolamento dos parasitas, mediante inoculação do material suspeito em animais de laboratório, constituem as principais técnicas parasitológicas de diagnóstico (REY, 1991). Mas tais técnicas apresentam sérias limitações, como a baixa positividade, diferença de susceptibilidade de animais a diferentes cepas, necessidade de longo tempo para confirmação do diagnóstico, além de dificuldades técnicas impedindo sua ampla aplicação.

SOGORB *et al.* (1977), na tentativa de isolamento do *T. gondii*, realizaram inoculações com material de mamíferos silvestres em camundongos susceptíveis. De um gato do mato retiraram amostras de pulmão, cérebro, gânglios mesentéricos e três porções do intestino delgado e inocularam em camundongos. As inoculações produziram resultados negativos, exceto de um tatu canastra, em que se conseguiu isolar o parasito dos tecidos inoculados (pulmão e cérebro) em camundongos.

Devido às limitações e dificuldades inerentes às técnicas parasitárias, os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose.

O teste do corante de Sabin-Feldman (SABIN & FELDMAN, 1948) foi o primeiro a ser utilizado como padrão de referência. Seu fundamento está em que organismos vivos (*Toxoplasma*), provenientes do exsudato peritoneal de camundongos com menos de três dias de infecção, ao serem incubados durante 1 hora, a 37°C, em presença de soro imune inativado a uma temperatura de 56°C e de soro normal contendo um “fator acessório” em quantidades adequadas, perdem sua afinidade pelo azul de metileno, deixando o citoplasma de corar-se por esse indicador, em pH alcalino. A base do fenômeno está em modificações da estrutura citoplasmática (e não só da permeabilidade da membrana), pela qual o ácido ribonucleico ou sairia da célula ou se modificaria a ponto de não produzir mais suas reações características. A diluição do soro que determina tal alteração em 50% dos parasitas corresponde ao título do anticorpo específico.

Embora o teste do corante apresente boa reprodutibilidade e alta sensibilidade (CAMARGO, 1964a), há alguns inconvenientes na sua execução tornando-o pouco utilizado em vários laboratórios, como, por exemplo, o emprego de parasitas vivos o que aumenta o risco de infecção acidental e a necessidade do “fator acessório” do soro fresco normal.

O “fator acessório” está relacionado com algumas frações do complemento, necessitando, por isso, de cuidados especiais nos processos de obtenção e armazenamento. Contudo, atualmente, esse teste é utilizado em inquéritos epidemiológicos. SMITH & FRENKEL (1995) testaram soros de 273 mamíferos silvestres através do teste do corante, nos quais anticorpos foram encontrados em 65 (24%) dos 273 mamíferos testados.

A reação de imunofluorescência indireta (KELEN *et al.*, 1962; CAMARGO, 1964b) é um teste amplamente utilizado para o diagnóstico da toxoplasmose. Como antígeno utilizam-se taquizoítas formolizados fixados em uma lâmina, o que elimina o risco de infecções pela manipulação de organismos vivos durante a realização do teste. O

antígeno é colocado para incubar com o soro a ser testado, a 37°C, por 1 hora. Depois de lavada a preparação, acrescentam-se conjugados fluorescentes antiglobulínicos, o que resultará em fluorescência onde houver anticorpos. Os resultados obtidos com esse teste são comparáveis àqueles do teste do corante. A maior desvantagem é a necessidade de um microscópio com iluminação especial, com filtros ópticos adequados para revelar os parasitas fluorescentes. Em nosso meio, SALATA *et al.* (1985) analisaram soros de 162 animais (cães domésticos, gatos domésticos, tatus e ratos), dos quais apenas 30 eram pertencentes a uma espécie de hábitos domiciliares (cão) e 3 de hábitos selváticos (gambá) apresentaram sorologia positiva à reação de imunofluorescência indireta, ainda que em diluições não superiores a 1:16.

Na reação de fixação de complemento (HULDT, 1958; TÓS-LUTZ, 1971), são empregados antígenos diversos, preparados segundo diferentes modalidades. A reação antígeno-anticorpo leva à formação de complexo imune, que produz fixação do complemento pela via clássica, e esta pode ser explorada para determinar a quantidade de antígeno ou anticorpo presente (ROITT *et al.*, 1993). Esse método é trabalhoso, sofre o influxo de muitas variáveis, sendo de menor custo para quem produz os componentes.

Outras técnicas como a hemaglutinação indireta, introduzida por JACOBS & LUNDE (1957), e a aglutinação direta, por FULTON & TURK (1959) têm sido propostas para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose. A primeira baseia-se na aglutinação passiva de hemácias sensibilizadas com extratos de *Toxoplasma gondii*. FERRARONI & MARZOCHI (1980), através da reação de hemaglutinação indireta para toxoplasmose, examinaram amostras de sangue de 10 diferentes espécies de animais domésticos e silvestres, de um grupamento humano de Manaus e de um grupamento indígena no território de Roraima. Entre os animais não domésticos, os felídeos foram os que

apresentaram a maior prevalência de anticorpos, sendo esta igual a 75%. O teste de aglutinação direta está baseado na capacidade aglutinante de anticorpos específicos sobre taquizoítas íntegros fixados. DESMONTS & REMINGTON (1980) e DUBEY & DESMONTS (1987) propuseram certas modificações na técnica visando ao aumento no rendimento das suspensões parasitárias, ao inocularem previamente camundongos com células do sarcoma TG-180. Essas células, utilizadas inicialmente por ARDOIN *et al.* (1967) serviriam como substrato para o crescimento dos taquizoítas, e a replicação destes junto com o tumor aumentaria o rendimento da suspensão parasitária. Os mesmos autores propuseram também o emprego de um agente redutor, o 2-mercaptoetanol, para remover reações inespecíficas.

VANEK *et al.* (1996) testaram 1.367 soros de cervos da cauda branca de 4 regiões geográficas diferentes. Soros de 30% dos cervos tiveram títulos de anticorpos  $\geq 25$ ; 8,6% foram positivos a um título de 25, 11% a um título de 50, e 10% a um título  $\geq 500$ . Todas as amostras foram testadas pela reação de aglutinação direta modificada.

As reações imunoenzimáticas são, provavelmente, as mais utilizadas atualmente em ensaios imunológicos, e têm-se revelado como métodos sorológicos sensíveis.

O ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), introduzido por VOLLER *et al.* (1976), baseia-se na reação de soros testes com poços antígeno sensibilizados em microplacas. O anticorpo ligado é demonstrado pela adição de anti-imunoglobulina marcada com enzima seguido por ensaio da reação da enzima com seu substrato. Essa técnica, além de apresentar alta sensibilidade e boa especificidade, possibilita trabalhar com quantidades variadas de amostras. Os reagentes utilizados são estáveis e, embora enzimas sejam caras, somente pequenas quantidades são usadas, assim, o custo por ensaio torna-se



pequeno. As desvantagens do ELISA são a necessidade de aparelho próprio para leitura e a ocorrência de leituras aberrantes devido a variações placa a placa e poços para poços. Vários autores (DENMARKE & CHESSUM e HALLIDAY & WISDOM apud BURT *et al.*, 1979) têm notado variabilidade na aparente adsorção física de proteínas na superfície interna de poços das placas de microtitulação em diferentes partes da placa, o chamado efeito “edge”. Um fator que pode contribuir para tais efeitos é a variação inter-poços na temperatura durante os períodos de incubação (BURT *et al.*, 1979).

O dot-ELISA (PAPPAS *et al.*, 1986) é uma técnica imunoenzimática com fase sólida, que detecta antígeno ou anticorpo. Contém o mesmo princípio básico de ELISA, ou seja, o antígeno ou anticorpo é imobilizado por adsorção a um suporte sólido, como, por exemplo, a nitrocelulose. A interpretação dos resultados é feita visualmente, baseando-se na intensidade de coloração dos discos de nitrocelulose, comparando-os sempre com os controles negativos e positivos. É um teste ideal para usar em regiões desprovidas de recursos de infra-estrutura, onde a maioria das outras provas tornam-se limitadas, pois dependem de eletricidade, refrigeração e aparelhos próprios para leitura. BAHIA *et al.* (1993) utilizaram o dot-ELISA no diagnóstico da toxoplasmose caprina, em que foram testadas 169 amostras, tendo 70% demonstrado sorologia positiva com títulos variando de 16 a 65.536.

Outros métodos, como a imunohistoquímica (LINDSAY & DUBEY, 1989), são utilizados na toxoplasmose silvestre para confirmar diagnóstico, quando *T. gondii* é encontrado em lesões. Recentemente, descobriu-se um novo hospedeiro para *T. gondii*, ao utilizar-se a imunohistoquímica no diagnóstico “post-mortem” em um porco-espinho adulto do Zoológico Nacional de Costa Rica, que morreu devido a lesões envolvendo coração, pulmões, fígado e rins em decorrência de toxoplasmose (MORALES *et al.*, 1996).

Organismos protozoários reagiram fortemente com anticorpos anti-*T. gondii*. O porco-espinho ficava preso e era alimentado com milho e vegetais, mas não carne. O animal, provavelmente, tornou-se infectado através da ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos.

Dados sobre a sensibilidade e especificidade sugerem que o PCR (reação em cadeia da polimerase) (STILES *et al.*, 1996) pode ser extremamente útil para o diagnóstico de toxoplasmose em medicina veterinária e humana. Recentes experimentos demonstraram que um método desenvolvido, usando uma sequência conhecida específica para *T. gondii* para amplificar a região da subunidade menor ribossomal gene RNA, detecta 0,1 pg de DNA de *Toxoplasma gondii*, o que representa aproximadamente um único organismo (MACPHERSON & GAJADHAR, 1993). Contudo o PCR tem a desvantagem de demarcar positividade ou negatividade sem estabelecer relação com atividade da doença. A presença de anticorpos no caso de infecção crônica não reativada é positiva pelo PCR.

Até o presente, as técnicas sorológicas, para detecção de diversas doenças ou infecções em animais silvestres, são pouco utilizadas na maioria das espécies da fauna brasileira. O propósito do presente trabalho foi verificar a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soros de duas espécies de cervídeos ameaçadas de extinção (*Blastocerus dichotomus* e *Ozotocerus bezoarticus*), além de desenvolver métodos diagnósticos para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, levando em consideração a importância desta zoonose. O desenvolvimento desses métodos, certamente, aumentará o conhecimento do perfil epidemiológico da toxoplasmose-infecção e, conseqüentemente, contribuirá para a preservação das espécies.

# Proposição



## 2- PROPOSIÇÃO

Devido à ausência de informações sobre a toxoplasmose em cervídeos, especialmente nas espécies da fauna brasileira, julgou-se útil determinar a prevalência da toxoplasmose-infecção em amostras de soros de cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) naturalmente infectados. De um modo geral, todas as espécies de cervídeos estão em acentuado declínio populacional, devido à destruição de seus ambientes, à ocorrência de doenças de animais domésticos e à caça. Assim sendo, devido à necessidade do conhecimento da prevalência da infecção pelo *T. gondii* na América do Sul, propôs-se no presente trabalho a:

- Desenvolver testes imunodiagnósticos para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* no soro de cervos do Pantanal e veados-campeiros.
- Avaliar os testes sorológicos: hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, dot-ELISA e ELISA no diagnóstico da toxoplasmose em cervídeos.

# Material e Métodos



### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais estudados**

##### **3.1.1 Captura dos animais**

Para obtenção das amostras de soros de veados-campeiros, foram realizadas quatro expedições no ano de 1995, sendo duas para o Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil, nos períodos de 17 a 22 de julho e 26 de novembro a 02 de dezembro, e duas para o Parque Nacional das Emas, Goiás, Brasil, de 25 de junho a 01 de julho e 10 a 14 de dezembro. As buscas foram feitas diariamente, por uma equipe especializada, comandada por Duarte & PIOVEZAN, 1996, percorrendo-se em média 80Km por dia no Pantanal e 100Km por dia no Parque.

Foi utilizado um novo procedimento de captura, utilizando-se uma técnica de rede de armação rápida, adaptada ao comportamento da espécie e às características fitogeográficas de ambas regiões (DUARTE & PIOVEZAN, 1996).

Após a contenção dos animais pela rede, procedeu-se à imobilização manual dos mesmos e, posteriormente, cada animal capturado recebeu uma combinação anestésica o mais rápido possível. Duas combinações sedativas foram utilizadas: Quetamina + Xylazina + Atropina ou Acepromazina + Quetamina + Midazolan. A Quetamina associada à Xilazina tem a capacidade de causar analgesia e indiferença psíquica, além de imobilidade (COSTA & NUNES, 1996).

O Midazolan, devido às suas características de tranquilização e sua potência em relação à dose aplicada, além de seu amplo emprego em outras espécies, parece

satisfazer as exigências para contenção farmacológica de espécies silvestres (COSTA & NUNES, 1996).

A mortalidade mínima do processo é de 14,63%. Tal mortalidade é aceitável em processos de captura dessa espécie.

Para a captura dos cervos do Pantanal, que habitavam as várzeas marginais do rio Tietê, São Paulo, Brasil, nos períodos de abril a setembro de 1990, dois métodos foram usados por uma equipe especial de captura. O método “net-gun”, que tem sido utilizado com sucesso nos Estados Unidos (FIRCHOW *et al.*, 1986), e foi adaptado pelos funcionários da Companhia Energética de São Paulo (CHARITY *et al.*, 1991). A captura utilizando esse método foi realizada com o auxílio de cinco pessoas: o piloto do helicóptero, um “net-gunner”, um técnico, um veterinário e um coordenador. Após a armação da rede, os animais foram conduzidos para as redes com o auxílio de um helicóptero. Após a captura, cervos do Pantanal foram tranquilizados utilizando-se uma combinação de Ketamina + Xylazina, aplicada diretamente na corrente sanguínea. Informações biométricas foram coletadas, e os animais foram marcados na orelha e no pescoço (“ear-tag” e “radio-collar”).

O método “drive trapping” (DE YOUNG, 1988) utiliza uma rede longa de 200m, colocada em formato de “V”. Este método requer um grupo de aproximadamente 20 pessoas. O método consiste em direcionar um único cervo com auxílio de helicóptero a uma área aberta onde a rede está armada. Dois homens ficam em lados opostos da rede e dirigem o animal para a rede. Após ser capturado, o animal é sedado. Quando comparado com o método “net-gun”, esse método permite que um grande número de amostras biológicas sejam tomadas, devido à sedação dos animais em estudo.

Ainda em relação à captura dos animais, alguns destes, na sua maioria filhotes, foram contidos manualmente.

A viabilidade de cada método pôde ser avaliada pela sua eficácia no campo e pela capacidade de inferir lesões aos animais, em decorrência do seu emprego (DUARTE & PIOVEZAN, 1996).

### **3.1.2 Obtenção das amostras de soros**

Ao serem capturados e sedados, os animais foram posicionados lateralmente para a colheita de sangue, tendo seus olhos vendados e ouvidos tampados para minimizar o “stress”. Foram coletados aproximadamente 5ml de sangue da veia jugular. Após uma centrifugação a 1000g por 10 minutos para obtenção do soro, as amostras foram identificadas com números e estocadas a -20°C.

### **3.1.3 Amostras de soros estudadas**

Foram analisadas 41 amostras de soros de indivíduos da espécie *Ozotocerus bezoarticus*, sendo 20 machos e 21 fêmeas, e 66 amostras de soros da espécie *Blastocerus dichotomus*, sendo 26 machos, 36 fêmeas e 4 não identificados, totalizando 107 indivíduos.

Quanto à faixa etária, foram analisadas 12 amostras de soros de filhotes, 15 de animais jovens, 13 de subadultos, 63 de adultos e 4 amostras de animais não identificados quanto ao sexo.

## **3.2 Obtenção das suspensões parasitárias**

Taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii*, descrita por Sabin e Feldman (SABIN & FELDMAN, 1948), foram obtidos por passagens intraperitoneais seriadas em



camundongos, com intervalo de 2 ou 3 dias. Foram utilizados camundongos com idade variando entre 30 a 60 dias, inoculados com um volume de 0,2ml de exsudato peritoneal de camundongos previamente inoculados.

Para obtenção das suspensões parasitárias, foram utilizados os exsudatos colhidos após lavagens intracavitárias com 3 a 4ml de salina estéril e massagem suave em camundongos previamente inoculados. Os exsudatos foram delicadamente aspirados e uma gota da suspensão foi então examinada à microscopia óptica; a suspensão com poucas células e uma quantidade ideal de taquizoítas era centrifugada a 1000g durante 10 minutos e submetida a duas lavagens com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e armazenada a -20°C, até serem utilizadas para o preparo dos antígenos.

### **3.3 Reações sorológicas**

#### **3.3.1 Reação de hemaglutinação indireta (HAI)**

Foi feita pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* através da aglutinação passiva de hemácias humanas sensibilizadas com antígeno solúvel de *Toxoplasma*.

##### **3.3.1.a Preparo do extrato antigênico solúvel**

Suspensões parasitárias foram descongeladas, adicionando-se em seguida 5ml de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M pH 7,2. A suspensão diluída foi centrifugada a 1000g durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em PBS 0,01M pH 7,2, tratado com 35µl de PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoride, Sigma Chem. Co., St. Louis - MO, USA) e submetido a seis ciclos rápidos de congelamento/descongelamento em N<sub>2</sub> líquido/banho-maria a 37°C (antígeno-criólise *T. gondii*) (YAMAMOTO *et al.*, 1991). Após

o sexto ciclo, procedeu-se à centrifugação do material a 2000g durante 15 minutos e o sobrenadante, contendo o extrato antigênico solúvel, foi analisado quanto à concentração protéica e estocado a -20°C .

### **3.3.1.b Dosagem de proteínas no extrato antigênico**

O extrato antigênico obtido pelo método de criólise (antígeno-criólise) foi dosado quanto à concentração protéica pelo método de LOWRY *et al.* (1951), empregando-se como padrão soro albumina bovina (Sigma Chem. Co., St. Louis - MO, USA).

### **3.3.1.c Caracterização do perfil eletroforético do antígeno-criólise *T. gondii***

Para caracterizar-se o perfil eletroforético do antígeno-criólise anteriormente obtido, foi empregada a técnica de eletroforese vertical, em sistema de tampões descontínuos, em mini-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15%, segundo LAEMMLI (1970).

Para preparação do mini-gel, placas de vidro medindo 12 x 10cm foram lavadas com detergente neutro e várias vezes com água bidestilada. Após secagem à temperatura ambiente, as placas de vidro foram submetidas a uma limpeza complementar com álcool-éter e novamente com água destilada. Após esse processo, as placas foram colocadas para secar em estufa a 37°C. Depois de secas, foram montadas empregando-se espaçadores de teflon de 1mm de espessura. Aplicou-se vaselina sólida em ambas as faces dos espaçadores dispostos lateral e inferiormente nos moldes de vidro, e as placas foram mantidas por garras metálicas.

Para preparação do gel de separação, utilizaram-se: TRIS-HCl (hidroximetil-aminometano) 0,375M pH 8,8, SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,1%, EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-ácetico) 2mM, acrilamida 30%, bis-acrilamida (N,N'-Metileno-bis-acrilamida) 0,8%, H<sub>2</sub>O (água), TEMED (N,N,N,N-tetrametil-aminometano) 0,125% e persulfato de amônio 0,125%. A procedência dos reagentes utilizados foram: Sigma Chem. Co. St. Louis - MO, USA: TRIS, SDS; Quimibrás Indústrias Químicas S.A. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: EDTA; Pharmacia-LKB, Produtos AB, Bromma, Suécia: acrilamida e bis-acrilamida, TEMED e persulfato de amônio.

A mistura correspondente a um mini-gel a 15% de acrilamida/bisacrilamida foi vertida lentamente para dentro das placas, tomando-se cuidado para evitar a formação de bolhas no interior do gel. Para evitar a polimerização do gel em presença de oxigênio, colocou-se uma camada de butanol, que seria descartada após aproximadamente 20 minutos, quando então ocorreria a completa polimerização do gel de separação.

Em seguida, procedeu-se à preparação do gel de empilhamento. Este consistia de: TRI-HCl 0,125M pH 6,8, SDS 0,1%, EDTA 2mM, acrilamida-bisacrilamida 5%, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (água destilada), TEMED 0,125% e persulfato de amônio 0,125%. Após o gel de empilhamento ser depositado na placa, aplicou-se o pente (molde de teflon) para a formação dos poços de aplicação, aguardando-se 20 minutos para que ocorresse a polimerização.

Nas placas contendo o gel a 15%, foram aplicadas, além do antígeno-criólise, várias outras amostras de antígenos de *Toxoplasma gondii* provenientes do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Em tubos plásticos tipo Eppendorf, colocaram-se 25µl de cada amostra, juntamente com 25µl do seguinte "tampão de amostra": 0,1M TRIS pH 6,8, 4% SDS,

0,2% azul de bromofenol (Sigma Chem. Co., St. Louis - MO, USA), 20% de glicerol (Labsynth- Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP) e H<sub>2</sub>O. As amostras foram, a seguir, submetidas à fervura em banho-maria a 100°C durante 3 minutos. Um “kit” contendo marcadores de pesos moleculares (“Electrophoresis calibration for molecular weight determination of high and low molecular weight proteins”, Pharmacia - LKB, Produtos AB, Bromma, Suécia: Albumina = 67.000; Lactato desidrogenase = 36.000; Ovalbumina = 43.000; Anidrase carbônica = 30.000; Inibidor de Tripsina = 20.1000; α-Lactalbumina = 14.400) foi utilizado em todas preparações.

A corrida eletroforética foi realizada em corrente de 15mA e voltagem de 250V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos, quando então o corante indicador (azul de bromofenol) atingiu o final do gel.

O gel foi cuidadosamente removido e mergulhado em solução fixadora por 14 horas à temperatura ambiente. Essa solução foi composta de: 50% metanol (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 12% ácido acético (Indústria Farmacêutica Rio Química - São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e 0,05% formaldeído (Quimibrás Indústrias Químicas S.A. Rio de Janeiro) em 1000ml água destilada.

A solução fixadora foi, em seguida, desprezada e o gel foi corado pela prata, segundo método descrito por FRIEDMAN (1982), no qual os polipeptídeos se destacam pela cor amarelada. Foram realizados três banhos consecutivos de 20 minutos cada com etanol a 50%, anteriormente ao pré tratamento com 0,1g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5H<sub>2</sub>O (tiosulfato de sódio) em 500ml de água destilada, durante um minuto. Lavou-se com H<sub>2</sub>O bidestilada três vezes durante 20 minutos cada e procedeu-se à impregnação com 2g/l de AgNO<sub>3</sub> (nitrato de prata) por 20 minutos, adicionando-se a este 0,375μl de formol a 35%, no momento do

uso, lavando-se novamente como descrito anteriormente. A revelação foi feita utilizando-se 3,0g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (carbonato de sódio) em 50ml de água contendo 25 $\mu\text{l}$  de formol a 35% e 1ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (tiosulfato de sódio) até o aparecimento de cor. Todos os reagentes utilizados nesse processo foram de procedência Merck S.A. Indústrias Químicas Rio de Janeiro.

Lavou-se com água bidestilada duas vezes durante 20 segundos, e a reação foi interrompida com uma solução de 50% metanol e 12% ácido acético glacial em 100ml água destilada.

O gel foi submetido à secagem durante dois dias, à temperatura ambiente entre folhas de papel celofane, aderidos a um suporte de vidro.

#### **3.3.1.d Técnica de sensibilização de hemácias com antígeno-criólise de *T. gondii***

Hemácias humanas tipo O RH negativas, foram formolizadas segundo técnica utilizada por CAMARGO *et al.* (1973). O sangue humano foi lavado 3 vezes em PBS 0,01M, pH 7,2, centrifugando-se, em cada lavagem, a 1000g por 10 minutos, à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o sedimento de hemácias em PBS 0,01M, pH 7,2 e adicionou-se igual volume de solução de formalina a 10% em PBS 0,01M, pH 7,2. A suspensão de hemácias foi incubada a 37°C por 18 horas, com agitações eventuais, evitando-se a formação de bolhas nesse processo de agitação, tendo sido lavadas 3 vezes em PBS 0,01M pH 7,2 contendo formalina a 2%. Essa suspensão foi estocada a 4°C em alíquotas de 5 a 10ml.

A técnica utilizada para sensibilização das hemácias formolizadas foi a técnica do ácido tânico (YAMAMOTO *et al.*, 1991).

Nesta técnica, as hemácias formolizadas a 2% foram lavadas por três vezes em solução salina fisiológica por 10 minutos a 2000g e ressuspensas em ácido tânico a 1/15000 (V/V). Essa preparação foi incubada a 37°C durante 30 minutos, tendo sido lavada três vezes por centrifugações de 10 minutos cada a 2000g em solução salina. Ao sedimento foi adicionado o antígeno-criólise diluído em solução salina tamponada 0,15M pH 6,4, na concentração protéica ideal, como previamente estabelecido. Essa mistura foi incubada a 37°C por 60 minutos, com agitações a cada 10 minutos, lavada três vezes com NaCl 0,15M por 10 minutos a 2000g e ressuspensa em 20ml de solução estabilizadora (solução salina tamponada com fosfatos 0,15M pH 6,4), contendo 3,0ml de leite desnatado 10%, 20µl de EDTA 10% e 855µl de formaldeído. O reagente foi armazenado a 4°C até o momento do uso.

### **3.3.1.e Triagem e titulação das amostras de soros de cervídeos utilizando a reação de HAI**

O reagente desenvolvido (HA-Toxo) foi testado inicialmente com várias amostras de soros de referência comprovadamente positivos e negativos para anticorpos anti-*T. gondii*, provenientes de diversos grupos de organismos, como bovinos, caninos, caprinos e de humanos. Aliquotas de 50µl das amostras de soros foram utilizadas nas diluições de 1:16 e 1:32. Foram testados vários diluentes para a realização das reações. O diluente utilizado, 50µl/poço, foi aquele do “kit” denominado Hematoxo, utilizado no diagnóstico da toxoplasmose humana (Biolab Diagnostic S. A., Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil). A quantidade do reagente HA-Toxo foi de 25µl/poço.

Confirmada a capacidade da preparação HA-Toxo em dar reatividade com as amostras de soros positivos, sem contudo dar reação inespecífica com as amostras

negativas, procedeu-se à triagem das amostras de soros dos cervídeos utilizando este reagente produzido.

Em placas de microtitulação de poliestireno com cavidades em forma de “V” (Biolab Diagnostic S.A., Jacarepaguá), as amostras de soros (50µl/poço) foram inicialmente testadas nas diluições 1:16 e 1:32. Adicionou-se uma gota de 25µl do reagente HA-Toxo e, após completa homogeneização, a placa foi deixada em repouso, à temperatura ambiente, em câmara úmida, em local isento de trepidações.

A leitura foi efetuada após uma hora de incubação. Em todas as reações, foram feitos controles com hemácias não sensibilizadas na diluição de 1:16. Todas as 107 amostras de soros de cervídeos foram testadas, seguindo as mesmas condições já descritas. Os soros positivos foram titulados para a determinação do “end-point” de reatividade, desde a diluição de 1:16 até 1:2048, na razão 2. O padrão de aglutinação foi determinado após 1 hora de incubação à temperatura ambiente.

### **3.3.2 Reação de imunofluorescência indireta (IFI)**

#### **3.3.2.a Preparo do antígeno**

A suspensão de *Toxoplasma gondii* foi obtida do exsudato peritoneal de camundongos inoculados com a cepa RH de *T. gondii* dois dias antes, como anteriormente descrito. Após centrifugação a 1000g durante 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado duas vezes em PBS durante 10 minutos a 1000g. 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, procedeu-se a uma centrifugação rápida a 600g durante 1 minuto. Descartou-se o sedimento e centrifugou-se novamente o

material presente no sobrenadante a 2000g por 10 minutos. O sedimento foi, a seguir, lavado com PBS, por duas vezes, durante 10 minutos a 2000g e, finalmente, ressuspenso em água destilada estéril num volume de 2,0ml. A concentração foi acertada por visualização em campo microscópico, em lâminas de microscopia, até a obtenção de uma concentração parasitária de 20 a 30 parasitas por campo microscópico com aumento 400x. Foram adicionados 10 $\mu$ l da suspensão parasitária em áreas demarcadas das lâminas de imunofluorescência (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Essas lâminas foram previamente mergulhadas em detergente neutro por aproximadamente 1 hora, a seguir lavadas em água destilada, mergulhadas em álcool 70 e secadas à temperatura ambiente.

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.

### **3.3.2.b Preparo do conjugado fluorescente**

O soro anti-IgG de cervo foi fornecido pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais, Brasil, obtido pela imunização em coelhos com IgG de cervos.

Foi feita dosagem protéica da IgG de coelho anti-cervo pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

O conjugado fluorescente foi preparado pela marcação dos anticorpos anti-IgG de cervo com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Co. St. Louis - MO, USA), segundo método descrito por CLARK & SHEPARD (1963). Adicionou-se à solução a marcar 0,3ml de tampão carbonato 0,5M pH 9,5 e esta foi colocada numa membrana de diálise



(Sigma Co. St. Louis - MO, USA). Procedeu-se ao preparo da solução de banho composta por 1,8ml de tampão carbonato 0,5M pH 9,5 e 7,2ml de NaCl 0,15M, à qual foi adicionada 0,0014g de FITC. Em seguida, a membrana de diálise com a proteína a ser marcada foi mergulhada no banho alcalino com o fluorocromo, sob agitação lenta contínua, por 18 horas a 4°C. Após essa incubação, foi feita uma diálise, trocando-se o banho de FITC por uma solução de PBS, com finalidade de remover o fluorocromo livre, presente no interior do saco de diálise.

O material obtido, num total de 2ml de conjugado, foi aplicado numa coluna de gel-filtração (Sephadex G-25, Pharmacia, Bromma, Suécia), e procedeu-se à cromatografia para a purificação final do conjugado obtido. O conjugado-FITC foi coletado em tubos de vidro, tendo sido posteriormente concentrado em solução de sacarose para até  $\frac{1}{4}$  do seu volume inicial. O conjugado-FITC foi finalmente dialisado em PBS por 24 horas a 4°C, transferido para frasco âmbar devidamente identificado e estocado a -20°C até o momento da sua titulação.

### **3.3.2.c Titulação do conjugado anti-IgG de cervo-FITC**

O conjugado anti-IgG de cervo-FITC foi titulado, para determinação da diluição ótima de uso, com amostras de soros de referência positivos e negativos, segundo determinação obtida pela reação de hemaglutinação indireta.

### **3.3.2.d Triagem e titulação das amostras de soros de cervídeos utilizando a reação de IFI**

A reação foi executada de acordo com a técnica descrita por CAMARGO (1964b). Lâminas previamente preparadas para IFI, como já descrito, foram aclimatadas à

temperatura ambiente. As amostras de soro foram utilizadas para triagem em diluições duplas, seriadas em PBS 0,01M pH 7,2, nas diluições de 1:4 e 1:8. Em todas as reações, foram incluídos controles com amostras de soros reativos e não-reativos. As diluições das amostras de soro foram incubadas a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida. Foram feitas três lavagens em PBS 0,01M pH 7,2, de 5 minutos cada e, em seguida, o conjugado foi incubado por 30 minutos a 37°C em uma câmara úmida, em diluição previamente determinada, tendo sido preparada na presença de azul de Evans. Procedeu-se à nova série de lavagens como anteriormente descrito. As lâminas foram montadas entre lamínulas, colocando-se uma gota de glicerina tamponada pH 8,8. As preparações foram, então, observadas em microscópio fluorescente com epi-iluminação (Olympus Mod. BH<sub>2</sub>, Tokyo, Japão). Os soros reagentes foram, a seguir, titulados a partir da diluição de 1:8 até 1:1024. Reações foram consideradas positivas, quando os taquizoítas demonstravam completa marcação fluorescente em toda a sua superfície. Procurou-se realizar a leitura por intermédio de dois observadores e um terceiro confirmaria ou não a leitura inicial.

### **3.3.3 Teste imunoenzimático dot-ELISA (dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay).**

#### **3.3.3.a Preparo do antígeno**

No dot-ELISA, utilizaram-se como suporte sólido discos de nitrocelulose de 7,5mm em microplacas de 24 poços (Plate-Corning Co., Corning, USA). Esses discos foram sensibilizados com antígeno solúvel de *T. gondii* (antígeno-criólise), obtido como no item 3.3.1.a. Esse antígeno foi fixado nos discos de nitrocelulose e esses foram posteriormente expostos à temperatura ambiente para secar. Diferentes concentrações

antigênicas nos discos foram avaliadas para obter-se a concentração ideal de antígeno a ser utilizada (100ng/2µl/dot). Os discos de nitrocelulose sensibilizados foram selados em papel alumínio e estocados a -20°C.

### **3.3.3.b Estudo da estabilidade do antígeno de dot-ELISA**

Os discos de nitrocelulose, sensibilizados com antígeno previamente preparados e conservados a -20°C, foram avaliados quanto a sua estabilidade. Foram feitas reações (PAPPAS *et al.*, 1986), inicialmente a cada dois meses e depois a cada três meses, até que um ano de estocagem fosse completado, mediante a utilização de amostras de soros padrão positivos e negativos dos grupos de organismos: bovinos, cervídeos e humanos.

### **3.3.3.c Triagem e titulação das amostras de soros de cervídeos utilizando a reação de dot-ELISA**

Placas contendo discos de nitrocelulose sensibilizados com antígeno solúvel de *T. gondii* foram lavadas por 15 minutos à temperatura ambiente com PBS-Tween 20 (PBS-T) a 0,5% e incubadas por 10 minutos com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% para bloqueio da peroxidase endógena. Após adição das amostras de soros, em diluições duplas seriadas de 1:4 a 1:128, essas placas foram incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente. As membranas foram, então, lavadas em PBS-T 0,5% por 4 períodos de 5 minutos cada. A proteína A-peroxidase (Sigma Co., St. Louis, USA), diluída a 1:250, foi utilizada como reagente secundário e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após novo procedimento de lavagem, as membranas foram incubadas por 25 minutos com uma solução de substrato, consistindo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (IBIZA Química Ltda., Guarulhos, São Paulo,

Brasil), diaminobenzidina (Sigma Chem. Co., St. Louis - MO, USA),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (cloreto de níquel P.A.) (Química Fina Ltda, São Paulo, Brasil) e Trizma-HCl 0,5M pH 7,6 (Sigma Chem. Co., St. Louis - MO, USA). Foram incluídos em todos os testes controles com amostras de soros reagentes e não-reagentes. Como etapa final, os discos com antígenos foram lavados com água destilada por quatro vezes, e a leitura foi feita através da observação visual do aparecimento ou não de cor cinza-escura nos discos de nitrocelulose.

### **3.3.4 Teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma***

#### **3.3.4.a Preparo do antígeno**

Exsudato peritoneal de dois camundongos, previamente inoculados com a cepa RH de *Toxoplasma gondii*, foi obtido como descrito no item 3.2.

Após centrifugação a 1000g durante 10 minutos, foram realizadas duas lavagens em PBS pH 7,2, e ao sedimento adicionou-se 10ml de PBS pH 7,2. Em seguida procedeu-se à contagem dos parasitas em câmara hemocitométrica e acertada a concentração dos parasitas para uma concentração final de  $1 \times 10^5$  taquizoítas/poço em PBS, adicionado de gelatina a 1%. Essa solução foi depositada (100µl/poço) em placas de poliestireno para ELISA (Interlab, São Paulo, Brasil), incubando-se por 18 horas à temperatura ambiente. As placas sensibilizadas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e estocadas a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso.

### 3.3.4.b Titulação do conjugado proteína A-peroxidase

A proteína A-peroxidase (Sigma Co., St Louis, USA) foi o conjugado utilizado nessa reação. Esse reagente foi titulado com amostras de soros positivos e negativos, como determinado pelas reações de Hemaglutinação Indireta, Imunofluorescência Indireta e dot-ELISA. Assim, obteve-se a diluição ótima de uso de 1:100.

### 3.3.4.c Titulação das amostras de soros de cervídeos utilizando a reação de ELISA

As placas de poliestireno para ELISA, previamente sensibilizadas com taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii*, foram retiradas do congelador e deixadas à temperatura ambiente para aclimação. As reações foram feitas segundo técnica descrita por VOLLER *et al.* (1976), com pequenas modificações. Procedeu-se à lavagem das referidas placas com PBS-T 0,1%, 3 vezes, durante 5 minutos cada ciclo. Adicionaram-se 50µl das amostras de soros diluídas em PBS-T 0,1% a partir da diluição de 1:16 até 1:2048, e incubou-se a 37°C por 45 minutos. Em todas as placas, foram feitos controles do conjugado, omitindo-se as amostras de soros e adicionando-se 50µl de PBS-T. O conjugado enzimático (proteína A-peroxidase) foi testado em várias diluições (1:500, 1:250 e 1:100) para obter-se a diluição ótima de uso em PBS-T 0,1%. Esse conjugado foi, então, adicionado às placas e incubado por 45 minutos a 37°C. As placas foram lavadas, como descrito anteriormente, após cada etapa de incubação. O substrato enzimático consistiu de água oxigenada 0,03% em tampão cromógeno (OPD - orto-fenilenediamina - Merck), diluídos em tampão citrato-fosfato pH 5,0 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,975g/250ml; ácido cítrico, 1,750g/250ml em água destilada). Após adição da solução reveladora, procedeu-se à incubação por 15 a 20 minutos à temperatura ambiente, em câmara escura. A reação

enzimática era interrompida adicionando-se 25 $\mu$ l de solução de ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Flow Titertek Multiskan Plus - USA), a 492nm.

### 3.4 Análise estatística

Dispondo-se dos resultados do primeiro teste realizado, a hemaglutinação indireta, que foi neste trabalho tomado como teste de referência por ser o mais antigo descrito na literatura para diagnóstico da toxoplasmose em cervídeos, calculou-se a sensibilidade de referência, ou índice de co-positividade, e a especificidade de referência, ou índice de co-negatividade.

Foi utilizado o teste de diferenças entre duas porcentagens pela distribuição binomial para a determinação das prováveis diferenças existentes em relação a diferentes parâmetros estudados, como as porcentagens de amostras reagentes em relação à espécie, ao sexo e à faixa etária.

Foi considerado 0,05 como limite máximo para o erro de primeiro espécie.

# Resultados





## 4- RESULTADOS

### 4.1. Padronização da reação de hemaglutinação indireta

#### 4.1.1 Caracterização do antígeno-criólise *T. gondii*

A dosagem protéica do antígeno-criólise foi igual a 745µg/ml. Quanto ao perfil eletroforético do mesmo, foi possível constatar uma banda de 30 kDa, intensamente corada, sugerindo ser este o componente mais importante desse antígeno (SAG-1/P30). O resultado dessa análise está ilustrado na Figura 1 (Anexo 1): o antígeno-criólise utilizado nas reações de hemaglutinação indireta e dot-ELISA é aquele que se encontra na terceira coluna (criólise, 6 ciclos-PMSF). Antígenos das colunas 2, 3 e 4 foram obtidos da mesma combinação de exsudato peritoneal de vários camundongos infectados previamente com a cepa RH de *Toxoplasma gondii*. As colunas 5 e 6 foram obtidas de outro material. As concentrações protéicas indicadas ao lado dos antígenos referem-se à quantidade aplicada em cada poço.

#### 4.1.2 Título do antígeno-criólise utilizado na reação de hemaglutinação indireta

A titulação do antígeno-criólise foi feita em bloco. Este antígeno foi testado nas concentrações de 25µg/ml, 12µg/ml, 6µg/ml e 3µg/ml. Amostras de soros padrão positivos e negativos provenientes de diferentes organismos (humanos, caprinos, caninos e bovinos) foram utilizados. Essas são correntemente utilizados no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, MG. Tomou-se como título a maior diluição que fornecia reatividade máxima, sem reações inespecíficas. Utilizou-se o antígeno na concentração de 6µg/ml para todas as espécies.

#### 4.1.3 Escolha do diluente de soro na reação de hemaglutinação indireta

Foram feitos testes com 3 diluentes diferentes, visando obter um melhor padrão de aglutinação, sem reações inespecíficas. Foram testados salina (NaCl 0,1M), diluentes comercialmente adquiridos da Biolab (Hematoxo) e diluente da SALCK (SALCK Ind. Com. Prod. Biológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Houve pouca diferença entre os resultados utilizando-se os diferentes diluentes. A salina não foi usada como diluente porque, por ser incolor, torna difícil a visualização da reação durante os procedimentos de diluição. Optou-se pelo diluente da Hematoxo-Biolab, por facilitar a realização das reações durante o processo de diluição e estar disponível em quantidades adequadas no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, MG. A Figura 2 (Anexo 1) representa os resultados de uma reação de hemaglutinação indireta.

#### 4.1.4 Resultado da triagem das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) pela reação de hemaglutinação indireta

Das 107 amostras de soros de cervídeos, observou-se reatividade em apenas 14 (13,08%) das amostras. Em 41 amostras de soros de veados-campeiros analisadas por HAI, 5 foram reativas para *Toxoplasma* e, em 66 amostras de soros de cervos do Pantanal, 9 demonstraram reatividade (Tabelas 1 e 2, Anexo 1).

Inicialmente, foi feita uma leitura após 30 minutos de incubação das amostras de soros com o regente HA-Toxo, e a leitura final foi realizada 1 hora após incubação. Foi adotado o seguinte critério como padrão de aglutinação: 4+  $\Rightarrow$  amostras de soros muito reativas; 3+  $\Rightarrow$  amostras de soros de média reatividade; 2+  $\Rightarrow$  amostras de soros de média

a baixa reatividade; 1+  $\Rightarrow$  amostras de soros de pouca reatividade (foram consideradas como não-reagentes) e -  $\Rightarrow$  amostras de soros não reativas.

Em relação ao sexo, 8 de 46 machos testados e 6 de 57 fêmeas foram sororeagentes para *T. gondii* pela HAI.

A Tabela 3 (Anexo1) demonstra os resultados obtidos quanto à faixa etária. Dos 107 animais testados pela HAI, 11 de 63 cervos adultos foram considerados sorologicamente reagentes, enquanto que somente 1 de 13 subadultos, 1 de 15 jovens e 1 de 12 filhotes apresentaram reatividade por este teste.

#### **4.1.5 Titulação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) pela reação de hemaglutinação indireta**

Nas 14 (13,08%) amostras positivas após a triagem, foi feita titulação, sob as mesmas condições das reações utilizadas na triagem. Em placas de microtitulação em forma de V, 50 $\mu$ l/poço de cada amostra de soro foi incubada com 25 $\mu$ l do reagente HA-Toxo. Os soros foram titulados a partir da diluição de 1:16, em razão 2, até 1:2048. Após 1 hora, foi realizada a leitura final. Nessas reações, foram utilizados soros de bovinos, caninos, cervídeos e soro comercialmente adquirido (Hematoxo-Biolab) como soros-padrão positivos e negativos.

A reação de hemaglutinação indireta foi a que exibiu títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* mais elevados, variando de 16 a  $\geq 2048$ . Os resultados da titulação das amostras de soros de veados-campeiros e cervos do Pantanal estão representados nas Tabelas 1, 2 e 3 (Anexo 1).

## **4.2 Reação de imunofluorescência indireta**

### **4.2.1 Titulação do conjugado anti-IgG de cervo-FITC**

Foram utilizados 2 soros de cervídeos reagentes na reação de HAI e 3 soros não-reagentes como padrões positivos e negativos respectivamente, nas diluições de 1:8, 1:16 e 1:32. O conjugado foi titulado, em razão 2, desde a diluição de 1:2,5 até 1:20. O título escolhido para o conjugado foi de 2,5, no qual foi possível observar os taquizoítas fortemente marcados, demonstrando completa fluorescência na sua superfície, quando o conjugado era colocado para incubar em presença de soros-padrão positivos enquanto o mesmo padrão não era encontrado, quando se utilizavam soros-padrão negativos. Esses resultados estão ilustrados nas Figuras 3, 4 e 5 (Anexo 1). Em todas as amostras de soro não-reagentes (com exceção de apenas duas amostras de soro de cervos do Pantanal), foi observada a chamada coloração polar. Nas Figuras 4 e 5 (Anexo 1), as setas estão indicando esta região.

### **4.2.2 Resultado da triagem das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*), utilizando a reação de imunofluorescência indireta**

Na reação de imunofluorescência indireta, encontramos, após triagem, 5 (12,19%) das amostras de soros de veados-campeiros reagentes. Em relação à outra espécie de cervo, cervos do Pantanal, 18 (27,27%) das amostras desses animais foram reagentes.

Em todas as lâminas, amostras de soros-padrão reagentes e não-reagentes de cervídeos (testados pela reação de HAI) foram utilizados, e a leitura foi sempre realizada

em acomodações apropriadas, sem influências de fontes de iluminação externa, em microscópio epi-fluorescente (Olympus, Mod. BH2, Tokyo, Japão).

Quanto ao sexo, 11 de 46 machos testados e 12 de 57 fêmeas foram sorologicamente reagentes por essa reação, e em relação à faixa etária 16 de 63 adultos, 3 de 13 subadultos, 3 de 15 jovens e 1 de 12 filhotes demonstraram reatividade para anticorpos anti-*T. gondii* (Tabelas 4 e 5, Anexo 1).

#### **4.2.3 Titulação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) pela IFI**

Uma vez estabelecido o limite mínimo de reatividade para amostras de soro em diluição de 1:8, foi feita titulação em bloco de 23 amostras. Duas amostras apresentaram reatividade máxima a uma diluição de 1:256 e 1:512, respectivamente, demonstrando completa fluorescência na superfície dos taquizoítas. Essas amostras pertenciam à espécie *O. bezoarticus* e foram também reativas na HAI a um título de 2048. Quanto à espécie *B. dichotomus*, obtiveram-se títulos pela imunofluorescência indireta, variando de 8 a 128 entre as 18 amostras submetidas à titulação (Tabelas 4 e 5, Anexo 1).

### **4.3 Padronização do dot-ELISA**

#### **4.3.1 Escolha da concentração ideal do antígeno-criólise utilizado no dot-ELISA**

O antígeno-criólise obtido de suspensões de *Toxoplasma*, submetidas a seis ciclos de congelamento/descongelamento, foi testado em diferentes concentrações utilizando amostras de soros-padrão positivos e negativos humanos, bovinos e de

cervídeos. As concentrações testadas foram de 10ng, 25ng, 50ng e 100ng de proteínas contidas em 2µl. A quantidade mais apropriada de antígeno, adsorvida aos discos de nitrocelulose de 7,5mm de diâmetro, foi de 100ng/2µl. Nessa concentração, foi possível a demonstração visual de pontos escuros no centro dos discos de nitrocelulose, correspondendo às reações positivas, sem contudo haver inespecificidade com reações negativas. Todas as reações foram feitas em presença de controles em duplicata do antígeno. Nesses poços, foi colocado PBS-T 0,5% em presença do antígeno e do conjugado. A leitura foi realizada de 20 a 35 minutos após adição da solução de substrato.

#### **4.3.2 Titulação do conjugado proteína A-peroxidase**

Foram utilizados inicialmente soros-padrão positivos e negativos de bovinos e de humanos para a titulação do conjugado comercialmente adquirido. Esses soros foram utilizados devido à alta capacidade de ligação, ou avidéz dos soros dessas espécies pela proteína A. O conjugado foi diluído 1:1000, 1:500 e 1:250. Observados os resultados dessas reações, procedeu-se à titulação do conjugado proteína A-peroxidase com as amostras de soros de cervídeos reagentes e não-reagentes pelas reações de HAI e IFI. Em todas as reações, foram feitos controles do conjugado, ou seja, na cavidade da placa contendo a nitrocelulose sensibilizada com o antígeno (100ng) era colocado para incubar PBS-T, o conjugado, e acrescentava-se a solução de substrato, não havendo, portanto, incubação prévia com o soro.

Como resultado final, optou-se por utilizar o conjugado a um título de 250.

### 4.3.3 Triagem e titulação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) através da reação de dot-ELISA

Após triagem das 107 amostras de soros de cervídeos, em relação às 41 amostras de soro da espécie *O. bezoarticus*, obtiveram-se 4 animais reagentes com títulos variando de 16 a  $\geq 128$ , sendo 3 machos e apenas 1 fêmea, e essas amostras foram provenientes de animais adultos. Entre as 17 de 66 amostras testadas de soros de cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*), com títulos variando de 8 a  $\geq 128$  encontraram-se, em relação ao sexo, 7 de 46 machos e 10 de 57 fêmeas. Quanto à faixa etária foi possível encontrar 11 de 63 adultos, 4 de 13 subadultos, 1 de 15 jovens e 1 de 12 filhotes testados, todos reagentes ao teste dot-ELISA. A amostra de soro de filhote reagente ao teste dot-ELISA foi também reagente nas reações de HAI e IFI. No dot-ELISA, obteve-se um título de 8 para essa amostra e um título de 64 para as outras duas reações. As Tabelas 6 e 7 e as Figuras 6 e 7 (Anexo 1) representam os resultados obtidos com a reação dot-ELISA.

### 4.3.4 Resultado do teste de estabilidade do antígeno de dot-ELISA

Para o estudo da estabilidade do antígeno-criólise *T. gondii* utilizado no dot-ELISA, foram mantidas as mesmas condições de ensaio durante 12 meses. Os discos de nitrocelulose, sensibilizados com esse antígeno, selados em papel alumínio foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras de soros utilizadas como padrão positivos e negativos foram os mesmos durante todas as reações. Entre todos os reagentes utilizados nas reações, apenas foi periodicamente preparado PBS-T 0,5%. Quanto à solução substrato, diaminobenzidina (DAB), cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), trizma-HCl e água oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), foram utilizados os mesmos reagentes desde o início dos testes, ou seja, pertenciam ao mesmo

lote e ao mesmo fabricante. O cloreto de níquel e o Trizma-HCl, já diluídos, foram estocados a  $-4^{\circ}\text{C}$  por até 10 meses, tendo sido utilizadas as mesmas preparações nas diferentes reações.

Na Figura 8 (Anexo 1) estão demonstradas as últimas reações feitas visando testar a estabilidade do antígeno. Estas foram realizadas exatamente quando se completaram 12 meses de estocagem do antígeno e confirmaram que o padrão de reação inicial foi mantido.

#### **4.4 Padronização da reação de ELISA**

##### **4.4.1 Titulação do conjugado proteína A-peroxidase**

Utilizou-se como conjugado proteína A-peroxidase, que foi o mesmo utilizado na reação de dot-ELISA. Esse reagente foi titulado frente a vários soros de cervídeos, já testados pelas reações de HAI, IFI e dot-ELISA, nas diluições de 1:500, 1:250 e 1:100. Tomou-se como título a maior diluição que forneceu reatividade máxima, ou seja, a diluição de 1:100 (Figura 10, Anexo 1).

##### **4.4.2 Triagem e titulação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) utilizando a reação de ELISA**

Em todas as reações, foram utilizados controles do conjugado, isto é, cavidade da placa sensibilizada com  $1 \times 10^5$  parasitas em PBS gelatina a 1%, sem incubação com a amostra de soro, e tratado com conjugado (1:100) e a solução de substrato.



Nas Tabelas 8 e 9 (Anexo 1), estão indicados os resultados obtidos com as 107 amostras de soros de cervídeos. As médias, desvios-padrão e “cut-off” das densidades ópticas a 492nm encontradas na reação de ELISA para triagem e titulação das 107 amostras de soro de cervídeos, estão ilustradas nas Tabelas 10 e 11 (Anexo 1). Do total de amostras, 31 foram reagentes ao teste ELISA, em que 12 de 41 amostras testadas pertenciam à espécie *Ozotocerus bezoarticus* e 19 de 66 à *Blastocerus dichotomus*. Quanto ao sexo, observou-se que, entre os 46 animais machos e 57 fêmeas testados, 10 machos, 19 fêmeas e 2 que não foram identificados quanto ao sexo foram reagentes.

Quanto à faixa etária, obteve-se reatividade no teste ELISA em 21 de 63 adultos testados em relação à amostra total, 2 de 13 subadultos, 4 de 15 jovens, 2 de 12 filhotes, 2 de 4 animais sem identificação. Os títulos sorológicos variavam de 16 a 256. (Tabelas 8 e 9, Figura 9, Anexo 1).

#### 4.5 Índices de co-positividade e co-negatividade

Os índices de co-positividade ou sensibilidade de referência encontrados foram de: 0,92, 0,78 e 0,64 para os testes de IFI, dot-ELISA e ELISA, respectivamente. Os índices foram obtidos tomando como referência o teste de hemaglutinação indireta. Os índices de co-negatividade ou especificidade de referência também foram obtidos tomando-se como base a hemaglutinação indireta. Esses índices apresentaram os seguintes valores: 0,28, 0,66 e 0,21 para os testes de IFI, dot-ELISA e ELISA, respectivamente. Os índices de co-positividade e co-negatividade estão representados na Figura 11 (Anexo 1).

#### 4.6 Resultados comparativos entre os testes HAI, IFI, dot-ELISA e ELISA

A relação das amostras de soros reagentes em dois ou mais testes e seus respectivos títulos estão representados na Tabela 12 (Anexo 1). As distribuições dos títulos obtidos, quando coincidentes ou diferentes em apenas uma diluição, nos testes estudados, quando associados dois a dois, estão representadas nas Tabelas 13, 14, 15, 16, 17 e 18 (Anexo 1). Observou-se maior grau de associação entre os títulos dos testes dot-ELISA x ELISA, dot-ELISA x IFI e ELISA x IFI, com porcentagens de coincidências ou diferenças em apenas uma diluição em 47,83%, 39,13% e 39,13% das amostras estudadas, respectivamente. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, utilizando-se deste mesmo parâmetro de associação, observou-se que a comparação dot-ELISA x HAI, ELISA x HAI e IFI x HAI apresentou porcentagens de coincidência de títulos ou diferença em apenas uma diluição em 17,39%, 13,04% e 26,09% das amostras estudadas, respectivamente. As porcentagens de reatividade obtidas na comparação dot-ELISA x HAI, ELISA x HAI, embora não significativamente diferentes entre si, foram estatisticamente diferentes daquelas obtidas nos demais grupos de comparações ( $p < 0,05$ ). As porcentagens de reatividade e as distribuições dos títulos obtidos nos testes empregados, quando analisados individualmente, estão representadas nas Figuras 12 e 13 (Anexo 1), respectivamente. Quanto ao número de amostras reativas encontradas, exceto a comparação entre ELISA e HAI, não houve diferenças significativas entre as demais reações sorológicas empregadas no presente estudo ( $p = 0,0048$  e  $p > 0,05$ , respectivamente).

Adotando-se como critério de positividade a reatividade das amostras em, no mínimo, dois testes que foram empregados para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, a prevalência global de anticorpos anti-*T. gondii* foi de 21,50%, representando 23

animais naturalmente infectados. A prevalência global de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) em relação à faixa etária, ao sexo e à espécie, está representada nas Tabelas 19 e 20 (Anexo 1). Essa reatividade apresentou tendência de distribuição não-uniforme, quando se considera o grupo de cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e o grupo de veados -campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*), que apresentaram índices de soropositividade de 27,27% e 12,19%, respectivamente (Tabela 20, Anexo 1). A diferença entre essas duas porcentagens, entretanto, não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,0677$ ). Nas 5 amostras de soro da espécie *Ozotocerus bezoarticus*, encontraram-se 4 animais positivos em todos os quatro testes sorológicos; a exceção foi o animal identificado como 11/02, que foi positivo em três testes (HAI, IFI e ELISA) com títulos variando de 256 a 2048 para HAI, 64 a 512 na IFI e 16 a 256 no ELISA.

Em relação ao sexo, não houve diferença significativa ( $p = 0,8369$ ) entre machos e fêmeas testados (Tabela 20, Anexo 1). A análise estatística dos resultados das amostras de soro em relação à faixa etária, não revelou diferenças significantes entre adultos e jovens ( $p = 0,0769$ ), subadultos e filhotes ( $p = 0,8040$ ), subadultos e jovens ( $p = 0,7403$ ), jovens e filhotes ( $p = 0,8845$ ), mas observaram-se diferenças significativas entre adultos e subadultos ( $p = 0,0273$ ). Há de se destacar que a maior diferença significativa foi aquela observada entre adultos e filhotes ( $p = 0,0018$ ).

# Discussão



## 5- DISCUSSÃO

Não há relatos sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cervídeos no Brasil. Os achados do presente trabalho levam a inferir que a toxoplasmose-infecção está presente nas populações de cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) na forma de infecção natural.

As amostras de soro da espécie *Ozotocerus bezoarticus*, analisadas no presente projeto, foram provenientes de dois ambientes distintos. O Parque Nacional das Emas, situado a sudoeste do estado de Goiás, nas coordenadas 18°15'50" S e 52°53'33" W (sede), possuindo uma área de 132.868ha. O Parque é a maior área de cerrado preservada como reserva, com altitude de 650 a 1000m. Já o Pantanal da Nhecolândia, município de Corumbá, estado do Mato Grosso do Sul, fica nas coordenadas 19s e 56w; sua altitude é baixa, girando em torno de 80m, e a área estudada foi de 30.000ha.

As diferenças entre os dois ambientes é muito grande. No Parque Nacional das Emas, não há bovinos ou outros animais domésticos, enquanto no Pantanal a relação entre essas espécies é notável, estando umas ao lado das outras (DUARTE, 1996). A presença de 5 (12,19%) amostras de soros reagentes para *T. gondii* entre os animais da espécie *Ozotocerus bezoarticus*, encontradas no Parque Nacional das Emas, chama a atenção. Tal fato pode estar correlacionado à presença de felídeos silvestres, que poderiam eventualmente passar pelo local.

Entretanto, apesar da provável presença de felinos, a densidade desses animais é muito pequena no Parque. Além disso, o clima dessa região caracteriza-se por apresentar uma acentuada estação seca de abril à setembro, com registros de temperaturas muito

baixas. No verão, a temperatura pode chegar a 40°C ou mais. A estação seca, no Parque, é geralmente acompanhada de restrição alimentar aos animais e, freqüentemente, ocorrem queimadas de grandes proporções, que, por exemplo, no ano de 1994, destruíram 100% da área de cerrado (DUARTE, 1996). Assim, as próprias condições fitogeográficas não são propícias à dispersão e viabilidade de oocistos.

FERRARONI & MARZOCHI (1980) verificaram a presença da toxoplasmose como infecção muito comum entre humanos, animais domésticos e silvestres, numa aldeia indígena na região de Manaus. Nessa área, a ausência de gatos e a remota possibilidade de presença de felídeos silvestres, devido a sua baixa densidade, grande dispersão e curto período de eliminação de oocistos, excluem a ocorrência de contaminação do ambiente em grau suficiente para explicar a alta prevalência da doença. Os autores chamam a atenção para mecanismos de transmissão ainda não esclarecidos.

BARUZZI (1970), em inquérito sorológico entre 254 indígenas do Alto Xingu vivendo em aldeias isoladas, não dispondo de gatos ou animais de criação e alimentando-se basicamente de mandioca e peixe e, esporadicamente, de macacos abatidos, encontrou 51,1% de positividade pela reação de imunofluorescência indireta com título igual ou superior a 16.

A prevalência de animais soropositivos pode ser influenciada pela pluviosidade, e isto pode estar relacionado ao efeito das condições do solo sobre a sobrevivência dos oocistos (FRENKEL *et al.*, 1975). Os oocistos de *Toxoplasma gondii*, provavelmente, persistem por mais tempo em solo úmido do que em solo seco, porque a incidência de luz solar direta e a aridez diminuiriam sua sobrevivência. Durante períodos de severa aridez e calor, ou ainda sucessivo congelamento e descongelamento, os oocistos perdem sua infectividade.

Fatores geográficos, climatológicos e densidade populacional parecem ter um efeito direto sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em herbívoros e não-carnívoros, e esses grupos, servindo como fonte de alimentos, afetariam, dessa forma, a prevalência em carnívoros. Naturalmente, dieta e outros fatores são importantes na disseminação da infecção pelo *Toxoplasma* e, sendo este abundante na maioria dos ambientes, a exposição parece ocorrer se um indivíduo (de qualquer espécie) simplesmente vive o suficiente para se expor ao parasito.

Como já mencionado anteriormente, um fator primário que afeta a prevalência de toxoplasmose-infecção em uma área é a presença de membros da família dos felídeos. Um gato infectado pode liberar milhões de oocistos, que são potencialmente capazes de infectar um grande número de animais. Por outro lado, um roedor infectado ou uma ave infectada é capaz de infectar, com frequência, somente um único carnívoro. É óbvio que uma maior população de felídeos aumenta o risco de infecção para todas as espécies de animais. Por outro lado, uma área com poucos gatos, mas com um grande número de roedores, pode se constituir em um risco de infecção, e estes roedores poderiam infectar grande número de carnívoros ainda que gatos sejam relativamente raros. Coyotes, lince e outros carnívoros, por exemplo, podem comer centenas de roedores durante um ano. Entre os hospedeiros intermediários de *T. gondii*, roedores e aves são considerados a principal fonte de infecção para os hospedeiros definitivos (STEWART *et al.*, 1995). Tal fato reafirma a hipótese da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* ser consistentemente maior em gatos e outros carnívoros do que em herbívoros e outros não-carnívoros.

Em populações humanas, a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* aumenta com a idade (FRANTI *et al.*, 1976). Alguns estudos indicam que as taxas de positividade variam de 0%, em indivíduos abaixo dos cinco anos, 18% de 6 a 15 anos e 26% de 16 a 30

anos (REY, 1991). Nos animais de pequeno porte, a toxoplasmose-infecção também aumenta com a idade.

SOGORB *et al.* (1972), ao detectarem anticorpos anti-*T. gondii* por meio da observação sorológica de 130 gatos, observaram que os animais mais jovens foram menos positivos, embora tivessem os títulos de anticorpos mais elevados. Em estudos com filhotes de gatos, alimentados com cistos teciduais infectados, DUBEY & FRENKEL (1972) observaram o desenvolvimento de toxoplasmose aguda com frequência, enquanto todos os animais adultos alimentados com os mesmos cistos teciduais permaneceram clinicamente normais.

A prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cervídeos é também mais elevada entre os animais adultos. Os achados do presente trabalho estão de acordo com os registros da literatura. Foi possível observar que a prevalência de anticorpos cresce com o aumento da idade. Registraram-se 17 de 63 de adultos, 3 de 13 de subadultos, 2 de 15 de jovens e apenas 1 de 12 filhotes soropositivos. A prevalência global foi de 21,50%.

BEHYMER *et al.* (1989), ao testarem amostras de soros de cervos da Califórnia através do teste ELISA, encontraram uma prevalência de 12%. FRANTI *et al.* (1976), utilizando o teste de HAI, encontraram 20% de cervos da cauda preta soropositivos.

Vários estudos têm sido conduzidos procurando-se correlacionar o sexo das espécies com a prevalência de infecção (FRANTI *et al.*, 1976; BURRIDGE *et al.*, 1979; LINDSAY *et al.*, 1991; HUMPHREYS *et al.*, 1995). Em um estudo sorológico sobre a prevalência da infecção pelo *T. gondii*, observou-se, entre as populações humanas e em espécies de animais domésticos e silvestres examinados, uma maior prevalência de anticorpos no sexo masculino, com exceção das aves nas quais o sexo não foi considerado



(FERRARONI & MARZOCHI, 1980). No presente estudo, observou-se a não existência de diferenças significativas na prevalência de anticorpos em relação ao sexo.

Quanto às diferenças na prevalência da toxoplasmose entre as espécies aqui estudadas, observou-se que, para *Ozotocerus bezoarticus* e para *Blastocerus dichotomus*, houve diferenças marcantes, sendo que, para *B. dichotomus*, a prevalência foi mais elevada. KAPPERUD (1978) demonstrou diferenças significantes na frequência de animais soropositivos entre duas de três espécies de cervídeos examinadas. As observações foram atribuídas a diferenças no clima e à presença de gatos, afetando a sobrevivência e a ocorrência de oocistos, respectivamente. A mais alta frequência de cervídeos soropositivos foi observada entre os cervos Roe. Em outras espécies diferentes de cervídeos testados sorologicamente, cervo da Califórnia e cervo da cauda branca, CHOMEL *et al.* (1994) encontraram prevalência de anticorpos mais elevada (15%) na primeira espécie, utilizando um teste de aglutinação indireta comercial. Qualquer soro com título igual ou maior de 32 foi considerado positivo, tendo sido estabelecido um gradiente em termos de intensidade de reação (32 = baixo positivo; 64 a 512 = positivo; 1024 = muito positivo).

Limiares de reatividade (pontos "cut-off") que sejam experimentalmente válidos para interpretação de títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma* não foram estabelecidos para quaisquer espécie de hospedeiro (QUIST *et al.*, 1995). FRANTI *et al.* (1975), em um estudo sorológico em 382 cervos da Califórnia, encontraram os títulos mais elevados (32.768) em duas fêmeas, uma de 4 anos de idade e outro filhote da mesma área, mas os autores não sabiam se os dois animais estavam relacionados. No mesmo estudo, foi observado ainda uma fêmea de 14 anos de idade com um título de 16.384. O teste utilizado foi a hemaglutinação indireta. BURRIDGE *et al.* (1979), estudando a prevalência sorológica de *T. gondii* em animais silvestres na Flórida, observaram altos títulos de anticorpos (>

256) nos carnívoros, estando entre estes ursos pretos, além de roedores, tatus e gambás. O título mais alto foi 16.384, e este foi encontrado no único cervo da cauda branca positivo, de um total de 30 cervos testados.

A sensibilidade e a especificidade da reação de hemaglutinação indireta têm sido pouco avaliadas em estudos que envolvem diferentes espécies (DUBEY, 1995b). No presente trabalho, anticorpos foram encontrados em 5 (12,19%) dos 41 veados-campeiros testados e 9 (13,64%) dos 66 cervos do Pantanal. Essa foi a reação que apresentou os títulos de anticorpos mais elevados (2048), quando comparados com os outros testes utilizados. Os cervos eram considerados positivos, quando apresentavam títulos de 16. GORMAN *et al.* (1986) avaliaram 127 mamíferos sorologicamente pelo teste de HAI, 24 (25,2%) de 95 artiodactídeos foram positivos. Esses autores utilizaram diluições de 1:2 e 1:4 como controles dos eritrócitos. Diluições de 1:8 a 1:512 foram também realizadas, e títulos  $\geq 16$  também foram considerados indicativos de infecção pelo *T. gondii*.

Diferentes técnicas são utilizadas para o preparo do antígeno solúvel de *T. gondii*, empregados nos testes de hemaglutinação indireta entre os diferentes laboratórios, e não existem dados comparando a sensibilidade com os vários testes utilizados.

Os anticorpos detectados pela reação de hemaglutinação indireta aparecem mais tardiamente que os determinados por outros testes, como, por exemplo, os do teste do corante de Sabin-Feldman (SABIN & FELDMAN, 1948) e os da reação de imunofluorescência indireta, pois, enquanto os antígenos para esses dois testes encontram-se na superfície do parasito, aqueles que sensibilizam as hemácias tratadas para o teste de hemaglutinação incluem também os encontrados no interior dos *Toxoplasmas*, sendo estes liberados somente depois que os parasitas começam a ser destruídos. Os títulos elevam-se muito e mantêm-se elevados por longo tempo (REY, 1991).

A reação de hemaglutinação indireta vem sendo amplamente utilizada em inquéritos sorológicos envolvendo espécies silvestres pela sua facilidade e simplicidade de execução, não necessitando, por exemplo, de conjugados espécie-específicos (PATTON *et al.*, 1986). IPPEN *et al.* (1981), estudando a toxoplasmose em animais de zoológicos, utilizaram a reação de HAI para testar amostras de soros de 2.338 animais. Um total de 194 espécies ou sub-espécies (89 mamíferos e 105 aves) reagiram positivamente. Dos 200 animais representantes da família Cervidae, foram detectados anticorpos em 45 (22,5%). Foram positivas 14 espécies e sub-espécies: *Moschus moschiferus*, *Muntiacus muntjak*, *Odocoileus virginianus*, *O. hemionus*, *Rangifer tarandus*, *Elaphurus davidianus*, *Axis axis*, *Rusa sp.*, *Dama dama*, *Cervus nippon*, *C. n. pseudaxis*, *Cervus elaphus*, *C. e. maral* e *C. e. bactrianus*. Para demonstrar a presença dos anticorpos anti-*Toxoplasma*, utilizaram-se como antígeno eritrócitos de ovelha liofilizados fixados em formalina e ácido tânico.

O tratamento de hemácias com ácido tânico tem sido, geralmente, utilizado para a sensibilização com antígenos protéicos (BUTLER, 1963), ao passo que a sensibilização com antígeno polissacarídeo ocorre por contato direto.

YAMAMOTO (1987), ao desenvolver reagente de hemaglutinação passiva para fins de diagnóstico, demonstrou que o tratamento prévio das hemácias com ácido tânico propiciava a ligação de antígenos que detectavam anticorpos IgG da fase crônica. No presente trabalho, as hemácias utilizadas como suporte foram taninizadas. Utilizaram-se hemácias humanas, que foram formolizadas segundo técnica descrita por CAMARGO *et al.*, (1973). YAMAMOTO descreveu que melhores resultados são obtidos, quando se utilizam como suporte hemácias homólogas, ou seja da mesma espécie que se está trabalhando (Informação verbal).

Na análise do perfil eletroforético do antígeno *T. gondii* utilizado nas reações de HAI e dot-ELISA, ficou caracterizado o envolvimento de uma fração antigênica de 30 kDa. Os estudos físico-químicos do componente P30 mostraram que a molécula é predominantemente protéica e resistente a sucessivos processos de congelamento e descongelamento (SANTORO *et al.*, 1986). A P30 é a mais abundante proteína da superfície do *T. gondii* (MCLEOD *et al.*, 1991; KASPER & BOOTHROYD, 1993) e está envolvida no processo de invasão da célula hospedeira (ROBERT *et al.*, 1991; GRIMWOOD & SMITH, 1992; MINEO *et al.*, 1993 e 1994; MINEO & KASPER, 1994). Entretanto a P30 está presente somente na superfície dos taquizoítas, não se encontrando na superfície dos bradizoítas ou esporozoítas. O antígeno P30 é uma molécula altamente imunogênica e induz uma resposta de anticorpos poli-isotípica em humanos e modelos experimentais (SHARMA, 1983; DECOSTER *et al.*, 1988; KHAN *et al.*, 1991; GODARD *et al.*, 1994).

Quanto à reação de imunofluorescência indireta, em síntese, essa reação consistiu-se em se fazer agir diluições crescentes dos soros de cervídeos a serem testados sobre esfregaços de *Toxoplasma* fixados em lâminas microscópicas. A manipulação de um grande número de lâminas, quando se titulam vários soros em uma reação, constitui uma das dificuldades técnicas da reação de imunofluorescência, especialmente na fase de leitura microscópica. Por isso, procurou-se realizar a leitura por intermédio de dois observadores e um terceiro confirmaria ou não a leitura inicial. Um detalhe técnico que facilita muito a leitura das reações, tornando o ponto de viragem mais evidente, é o emprego de coloração de contraste pelo azul de Evans. Aqui, diluiu-se o conjugado em azul de Evans, como descrito por CAMARGO (1964a).

Já foi demonstrado que diferenças nos lotes de isotiocianato de fluoresceína podem ser um dos fatores responsáveis pelas colorações inespecíficas dos conjugados

(FROMMHAGEN & SPLENDORE, apud CAMARGO, 1964a). Por isso, recomenda-se o emprego de isotiocianato da mais alta pureza, como o isômero I, sabendo-se que mesmo produtos de boa procedência contêm, por vezes, 30% ou mais do seu peso em componentes degradados. Esses pesquisadores chamam a atenção para o matiz laranja de tais componentes contrastando com a cor pálida, amarelo-esverdeada do isotiocianato puro.

CERTAIN (1958) verificou que, nos conjugados de isotiocianato de fluoresceína, os componentes mais responsáveis pelas colorações inespecíficas eram aqueles com maior mobilidade eletroforética, isto é, com maior carga negativa. Tais componentes eram os que possuíam maiores quantidades de fluorocromo por miligrama de proteína. Foram estudadas as causas predominantes dos fenômenos de fluorescência inespecífica e concluiu-se que, como fator de influência decisiva, a relativa acidez dos conjugados com relação às estruturas orgânicas a eles submetidas (MAYESBACH & SCHUBERT apud CAMARGO, 1964a). GOLDSTEIN *et al.* (1961) confirmaram essas observações. As moléculas de proteínas, em consequência da combinação com moléculas de fluorocromo, perdem cargas elétricas positivas. Esta perda é tanto maior quanto mais extensa a marcação, isto é, quanto maior for o número de moléculas de fluorocromo ligadas a cada molécula protéica. Em consequência, há uma baixa do ponto isoelétrico das proteínas e aumento de sua mobilidade eletroforética, além de outras modificações. Esses mesmos autores trataram globulinas imunes com quantidades variáveis de isotiocianato de fluoresceína e verificaram que a marcação resultante era intensa, à medida que eram maiores as quantidades de fluorocromo oferecidas para conjugação.

Para a marcação do conjugado espécie-específica no presente trabalho, utilizou-se o método de diálise, como descrito por CAMARGO (1964a), com pequenas

modificações. Assim, o fluorocromo foi adicionado à solução protéica de maneira gradual, evitando-se concentrações locais elevadas do corante na solução, que poderiam condicionar conjugações heterogêneas.

As reações positivas traduzem-se por fluorescência dos *Toxoplasmas*, mais evidente na periferia dos parasitas, onde formam um limite brilhante, cuja intensidade vai decrescendo com o aumento progressivo das diluições do soro, enquanto as reações negativas aparecem como uma imagem muito tênue dos *Toxoplasmas*, ligeiramente esverdeada, contrastando mal com o fundo.

Entretanto, muitas vezes, encontra-se fluorescência dos *Toxoplasmas* localizada exclusivamente na extremidade mais arredondada dos parasitas e nitidamente distinta da fluorescência específica que se dispõe sempre homogeneamente em toda a periferia. É a chamada fluorescência zonal ou polar (CAMARGO, 1964a). Quase todas as amostras de soros consideradas negativas, ao serem examinadas pela técnica de imunofluorescência indireta, no presente trabalho, com exceção de duas amostras, apresentaram fluorescência polar. *Toxoplasma gondii*, como outros membros do filo Apicomplexa, é caracterizado por apresentar uma porção apical especializada que contém organelas únicas que parecem estar associadas com os processos de invasão da célula hospedeira (MORRISSETTE *et al.*, 1994).

Proteínas associadas com organelas ligadas à membrana-roptrias, micronemas e grânulos densos, têm sido identificadas em *Toxoplasma* e *Plasmodium* ([ACHBAROU *et al.*, 1991a e 1991b; CHARIF *et al.*, 1990; DE CARVALHO *et al.*, 1991; FOUSSARD *et al.*, 1991; HERION *et al.*, 1993; LERICHE & DUBREMETZ, 1990 e 1991; MERCIER *et al.*, 1993; OSSARIO *et al.*, 1992; SADAK *et al.*, 1988; SAFFER *et al.*, 1992; SAM-YELLOW *et al.*, 1992] apud MORRISSETTE *et al.*, 1994), mas os antígenos do complexo apical, incluindo aqueles

associados com o conóide e várias outras estruturas do citoesqueleto, estão para serem melhor caracterizados.

A película de *Toxoplasma* é composta de três unidades de membrana: uma membrana plasmática externa e um complexo de membrana (ICM), que começa no anel polar apical e corre em uma estreita aposição à membrana plasmática ao longo de todo o comprimento do parasito.

*Toxoplasma gondii* replica por endodiogenia, um processo em que duas células-filhas formam-se dentro da célula-mãe. Todas as classes de antígenos são visíveis por imunofluorescência durante replicação, a localização desses antígenos durante os estágios iniciais da endodiogenia pode ser observada em parasitas maiores como dois pontos subterminais em adição à marcação apical da célula-mãe.

MORRISSETTE *et al.* (1994) isolaram e caracterizaram 26 anticorpos monoclonais para a porção apical de *Toxoplasma gondii*, fornecendo base para o estudo de proteínas associadas com esta região. “Immunoblots” das classes de antígenos da porção apical de *T. gondii* foram feitos e comparados com proteínas do *Plasmodium falciparum* e *Homo sapiens*. Anticorpos que reconhecem bandas de 38, 93, 120 e 163 kDa não reagem cruzadamente com proteínas de *Plasmodium* ou humanas.

Muitas proteínas encontradas no *T. gondii* têm similaridade com algumas proteínas de outros parasitas Apicomplexa, como, por exemplo, a tubulina, fatores de crescimento e proteínas de roptrias. Por isso, poder-se-ia questionar se a fluorescência no complexo apical das amostras de soro de cervídeos não-reagentes, no teste de imunofluorescência indireta, foi uma reação inespecífica por reatividade cruzada com proteínas de outra origem que não de *T. gondii*. Entretanto, um estudo preliminar, que envolveu uma comparação da frequência dinucleotídeos e codons comuns entre *T. gondii* e

*Plasmodium falciparum* (JOHNSON, 1990), revelou surpreendentes diferenças, indicando que nenhuma relação especialmente próxima existe entre eles.

ELLIS *et al.* (1993) utilizaram uma escala multidimensional métrica para investigar similaridades gerais no padrão de codons comuns entre os Piropasmas (*B. bovis*, *B. rodhaini*, *T. parva* e *T. annulata*) e os Coccidia (*T. gondii* e *E. tenella*) e *P. falciparum*. Dessa análise, observaram que *T. gondii* encontra-se ligeiramente distante de *B. bovis*, *T. parva* e *T. annulata*. A maior distância observada foi entre *T. gondii* e *P. falciparum* e a mais próxima foi aquela existente entre *T. gondii* e *E. tenella*. Os mesmos autores relataram que as diferenças observadas em codons comuns entre espécies taxonomicamente relacionadas pela escala métrica multidimensional, ainda que pequenas, provavelmente representam verdadeiras diferenças entre eles. Ainda em relação aos resultados inespecíficos que podem ocorrer nas diversas reações sorológicas, há de se ressaltar que, no presente trabalho, as amostras sorológicas só foram consideradas como sendo positivas quando reagiram em pelo menos dois dos testes utilizados.

Todas as amostras de soro de cervídeos foram também testadas para verificar a presença de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina*. Estes parasitas, também pertencentes ao filo Apicomplexa, poderiam reagir cruzadamente com *Toxoplasma gondii* e, nas reações sorológicas, dar resultados falso-positivos. Dentre as 41 amostras de soros de veados-campeiros, que foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta por MACHADO & MULLER (1996), pôde-se verificar 11,76% de positividade nos animais capturados no Pantanal da Nhecolândia. No Parque Nacional das Emas, observaram-se 8,33% de animais positivos para *Babesia bovis* e 29,71% de animais positivos para *Babesia bigemina*. Comparando esses resultados com aqueles obtidos para *T. gondii*, observou-se que entre as amostras positivas para babesiose, em



veados-campeiros, o animal identificado como FNMA 13, macho, adulto, foi reagente na imunofluorescência indireta para *B. bovis* e *B. bigemina* e foi positivo para *T. gondii*. Essa amostra foi considerada positiva para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, porque foi reagente nos testes de HAI, dot-ELISA, IFI e ELISA, a títulos de 256, 64, 128 e 64, respectivamente. Outras três amostras positivas para anticorpos anti-*Babesia bigemina* (FNMA 02, FNMA 16 e FNMA 26) e para anticorpos anti-*Babesia bovis* (FNMA 16) foram também reagentes no teste ELISA a títulos de 32 (FNMA 02 e FNMA 26) e 16 (FNMA 16). Pelo fato dessas amostras serem reagentes somente no teste ELISA e a títulos relativamente baixos, foram consideradas negativas para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

Quanto à outra espécie de cervídeo, cervo do Pantanal, as 66 amostras de soro desses animais foram também testadas para anticorpos anti-*Babesia bovis* pelos testes de dot-ELISA e IFI. Não foi encontrada nenhuma amostra positiva pelo teste de IFI e, pelo teste de dot-ELISA, somente 2 (3,33%) amostras foram positivas. Dessas, uma foi também positiva para anticorpos anti-*T. gondii* por três dos quatro testes aqui utilizados, HAI, dot-ELISA e IFI, com títulos de 64, 8 e 128, respectivamente. Essa amostra refere-se ao animal identificado como 04, jovem e macho.

DUBEY *et al.* (1996) realizaram experimentos em que amostras de soros de animais foram examinadas para produção de anticorpos anti-*Neospora caninum* e reatividade cruzada com *Toxoplasma gondii*. Os testes de IFI e ELISA foram utilizados para investigar reatividade para *N. caninum*, enquanto que a aglutinação direta modificada, o teste do corante de Sabin-Feldman e a IFI, para *T. gondii*. Como resultado, a reatividade cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* foi nenhuma ou mínima pelo teste de IFI. Estudos

similares foram também realizados por outros autores que observaram que *N. caninum* e *T. gondii* podem ser distinguidos estrutural e antigenicamente (GUO & JOHNSON, 1995).

Em relação a outro protozoário da família Toxoplasmatinae, *Besnoitia jellisoni*, embora taquizoítas sejam estruturalmente similares, não há proteção cruzada entre eles (GRISARD *et al.*, 1997).

No teste ELISA, obtiveram-se, dentre as amostras reagentes, 14 amostras com títulos variando de 16 a 64. Essas amostras foram consideradas como negativas por serem reativas somente nesse teste. DUBEY (1995b), demonstrou a sensibilidade e a especificidade de vários testes sorológicos para detecção de infecção pelo *T. gondii* em porcos naturalmente infectados. O teste de ELISA foi o que apresentou maiores índices de resultados falso-positivos. No presente trabalho, os índices de co-positividade e co-negatividade, obtidos para o teste de ELISA em relação ao teste de hemaglutinação indireta, foram de 0,64 e 0,21, respectivamente. Entre as 23 amostras sorológicas positivas em pelo menos dois testes, o ELISA foi capaz de detectar 17 amostras positivas.

Cada teste requer reagentes diferentes, habilidade técnica e, freqüentemente, podem ser feitos paralelamente em laboratórios. Em locais onde é possível se obter fracionamento antigênico, o teste ELISA pode ser aplicado em amostras de soros contra vários antígenos simultaneamente. O método ELISA serve como modelo para ser aplicado em estudos soroepidemiológicos de animais de vida livre e animais de zoológico. Como há dificuldades no manejo de grandes grupos de animais, métodos mais aperfeiçoados, rápidos e eficazes tornam-se muito importantes.

O método ELISA tem vantagens distintas para testes sorológicos de animais silvestres. Problemas tais como atividade anti-complementar, toxicidade e aglutinação não

específica, que podem também estar associados com outros métodos sorológicos, não ocorrem com o ELISA (BEHYMER *et al.*, 1989).

Entretanto, para dar leituras mais precisas, o ELISA normalmente requer equipamentos caros tal como espectrofotômetro. A leitura pode ser feita visualmente quando fotômetros não estão disponíveis, mas os resultados tornam-se altamente subjetivos (PAPPAS *et al.*, 1986).

O diagnóstico de toxoplasmose deve ser, freqüentemente, baseado na avaliação crítica de um ou mais testes sorológicos (VOLLER *et al.*, 1976). A análise conjunta dos resultados de vários testes darão certamente informações mais precisas sobre a infecção.

O dot-ELISA tem sido amplamente aceito como um teste rápido e versátil para a detecção de doenças parasitárias em humanos e em gado (ZIMMERMAN *et al.*, 1985; DEGASPARI *et al.*, 1994; LISSALDO *et al.*, 1994; VAZ DE LIMA *et al.*, 1994; ELSAID *et al.*, 1995). Esse teste é capaz de detectar baixos níveis de anticorpos, em comparação com outros testes sorológicos, como a IFI, por exemplo. O uso de discos de nitrocelulose para a imobilização de antígenos provou ser eficiente em vários sistemas de avaliação de complexos antígeno-anticorpo (BAHIA *et al.*, 1993). Modificações recentemente introduzidas tornaram possível a avaliação simultânea de um grande número de amostras e a utilização de quantidades menores de reagentes, reduzindo os custos da reação sem contudo prejudicar sua eficiência (MONTENEGRO *et al.*, 1991).

O uso de membrana de nitrocelulose permite a visualização de uma reação colorida contra um fundo branco, o que aumenta o contraste na leitura, quando comparado com outros testes, tornando a discriminação de reações positivas e negativas mais fácil (HAWKES *et al.*, 1982).

No presente trabalho, observou-se que o antígeno solúvel empregado (*T. gondii*-criólise), adsorvido à membrana de nitrocelulose, é estável por, pelo menos, 12 meses, se mantido à temperatura de -20°C. Na prática, a sensibilidade de detecção de um antígeno particular depende de um número de determinantes. A utilização de 100ng do antígeno-criólise de *T. gondii* proporcionou “dots” visíveis, permitindo que mesmo baixas concentrações de anticorpos sejam detectáveis. O fato da forte capacidade de ligação de membranas de nitrocelulose a proteínas, e estas não serem rapidamente liberadas, faz dessas uma das mais úteis fases sólidas para uma ampla variedade de aplicações (HARLOW & LANE apud STEINITZ & TAMIR, 1995). Além disso, proteínas antigênicas imobilizadas sobre nitrocelulose são freqüentemente bons imunógenos (STEINITZ & TAMIR, 1995).

O dot-ELISA foi capaz de detectar anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em 21 amostras. Destas, 19 foram positivas em outro teste e apenas duas só foram positivas no dot-ELISA. Os reagentes utilizados neste teste mostraram-se estáveis por vários meses, mesmo depois de diluídos, como no caso do cloreto de níquel e trizma.

Dentre os quatro testes aqui estudados, o dot-ELISA foi considerado o mais indicado para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cervídeos. É uma técnica simples e que pode ser realizada em nível de campo, sendo, portanto, de grande valia no trabalho com populações nativas de espécies ameaçadas de extinção.

A prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cervos é relativamente alta, como comprovada no presente estudo e em investigações já realizadas em outros países. Com isso, caçadores de cervos deveriam usar luvas impermeáveis, quando realizarem o abate dos animais e lavar as mãos e utensílios com água e sabão após a preparação da carcaça, assim como os consumidores de carne de cervo devem tomar cuidados especiais na preparação dessa carne. A carne de cervo deve ser congelada pelo

menos a 10°C durante um período mínimo de 24 horas ou cozida a 66°C ou temperaturas mais elevadas, para matar os oocistos (DUBEY, 1994).

Muitos caçadores particulares abandonam uma parte ou a carcaça de cervo quase que inteira no mato, quando o animal é morto (COLLINS, 1981). As vísceras não devem ser deixadas no ambiente, a fim de prevenir seu consumo por felídeos silvestres e outros animais.

Tem sido demonstrado que a identificação do papel e da relevância de mamíferos silvestres no ciclo natural de microorganismos patogênicos é de grande importância epidemiológica devido a vários aspectos, tais como: o conhecimento da interação existente entre parasito-hospedeiro, partindo-se de um ponto de vista evolucionário, patogênico e ecológico; e o entendimento do processo envolvido na dinâmica de transmissão, se presente em um ambiente natural ou em um ambiente já foi modificado pelo homem.

# Conclusões



## 6. CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos testes imunodiagnósticos para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soros de cervos do Pantanal e veados-campeiros.

Todas as amostras de soro foram testadas através das reações de hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, dot-ELISA e ELISA. As quatro reações foram avaliadas, segundo a facilidade e tempo de execução e custos.

A reação de HAI aqui estudada apresenta as seguintes características:

1. Detecta anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas amostras de soro. Os títulos variaram de 16 a 2048.
2. O reagente desenvolvido (HA-Toxo) pode ser exequívelmente preparado, destinando-se ao teste de hemaglutinação
3. A HAI é um teste simples, prático e rápido, realizável em qualquer laboratório sem a necessidade de equipamentos especializados.

A reação de IFI utilizada, apresenta as seguintes características:

1. Detecta anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas amostras de soro com títulos que variam de 8 a 512.
2. Este teste foi aquele que detectou o maior número de amostras positivas. Entre as 23 amostras positivas, segundo o critério adotado de serem consideradas como positivas aquelas amostras reagentes em dois ou mais testes, 20 (86,95%) amostras foram positivas.

3. A principal desvantagem da IFI é a necessidade de um conjugado espécie-específico, mas é também um teste prático e rápido, realizável em laboratórios que disponham de microscópio de imunofluorescência.

#### A reação de dot-ELISA:

1. Detecta anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas amostras de soro com títulos que variam de 8 a 128.
2. Os reagentes utilizados neste teste apresentam longa estabilidade.
3. O antígeno utilizado neste teste, quando estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , é estável por pelo menos 12 meses.
4. Este teste foi capaz de detectar 19 (82,60%) amostras positivas, segundo o critério adotado de serem consideradas como positivas aquelas amostras reagentes em dois ou mais testes.
5. Esta é a reação mais indicada para o diagnóstico da toxoplasmose-infecção em cervídeos, pois não depende da existência de infra-estrutura laboratorial complexa, sendo por isso facilmente executável a nível de campo.

#### A reação de ELISA:

1. Detecta anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas amostras de soro a títulos que variam de 16 a 256.
2. O conjugado utilizado nesta reação, assim como na reação de dot-ELISA, é de baixa avidéz para anticorpos presentes no soro de cervídeos.
3. Este teste foi capaz de detectar 17 (73,91%) amostras positivas, segundo o critério adotado de serem consideradas como positivas aquelas amostras reagentes em dois ou mais testes.



4. O ELISA requer a utilização de um espectrofotômetro para dar leituras mais precisas.

Se este aparelho estiver disponível no laboratório, o teste é muito rápido, sendo também recomendável para o diagnóstico da toxoplasmose-infecção.

Os dados apresentados no presente trabalho indicam que a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* não deve ser baseada em testes sorológicos isolados, mas em dois ou mais testes, para que se possa ter um quadro diagnóstico mais preciso.

# Resumo



## 7- RESUMO

Amostras de soros de 107 cervídeos foram examinadas para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* através de quatro testes sorológicos: hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), dot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) e enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Parte dessas amostras (38%) foram provenientes de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) que habitam a região do Pantanal e o Parque Nacional das Emas, Brasil. As amostras remanescentes (62%) pertenciam a outra espécie de cervídeo, o cervo do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*), que vive nas várzeas marginais do rio Tietê, Brasil.

A prevalência global de anticorpos anti-*T. gondii* foi de 23 (21,50%), tomando-se como base que as amostras foram consideradas positivas quando demonstraram reatividade em pelo menos dois testes.

Através da reação de HAI, 13,08% das amostras de soro de cervos apresentaram títulos variando de 16 a 2048. Pela reação de IFI, 21,49% tiveram títulos variando de 8 a 512, enquanto 19,63% das amostras de soros tiveram anticorpos detectáveis pelo dot-ELISA, com títulos de 8 a 128. Pelo teste ELISA, 28,97% tiveram títulos de 16 a 256.

A prevalência mais elevada de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* foi encontrada entre subadultos (32,08%), seguida por adultos (26,98%) e jovens (13,33%). Somente uma amostra de soro de filhote de cervo (8,33%) foi positiva nos testes sorológicos.

Os achados do presente trabalho são consistentes com a hipótese, pois demonstram a existência de infecção natural pelo *Toxoplasma gondii* dessas populações de cervídeos nas regiões estudadas.

*Abstract*



## 8- ABSTRACT

Serum samples from 107 cervids were examined for *Toxoplasma gondii* antibodies by using four serological tests: indirect hemagglutination (IHA), indirect immunofluorescence (IFA), dot-enzyme linked immunosorbent assay (dot-ELISA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Part of these samples (38%) were obtained from pampas deer (*Ozotocerus bezoarticus*) living at Pantanal region and Emas National Park, Brazil. The remaining samples (62%) came from marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) living at Tietê river course, Brazil.

Taken into account that the samples were considered positive when showing reactivity in at least two tests, the global prevalence of antibodies anti-*T. gondii* was found in 23 out of 107 cervids (21,50%).

By IHA, 13.08% of the deer serum samples had titers from 16 to 2048. By IFA, 21.49% had titers from 8 to 512, while 19.63% of the serum samples had detectable antibodies by dot-ELISA, with titers ranging from 8 to 128. By ELISA, 28.97% had titers from 16 to 256.

The highest prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies was found in sub-adults (32.08%), following by adults (26.98%) and juveniles (13.33%). Only one serum sample (8.33%) from infant deer was positive in the serological tests.

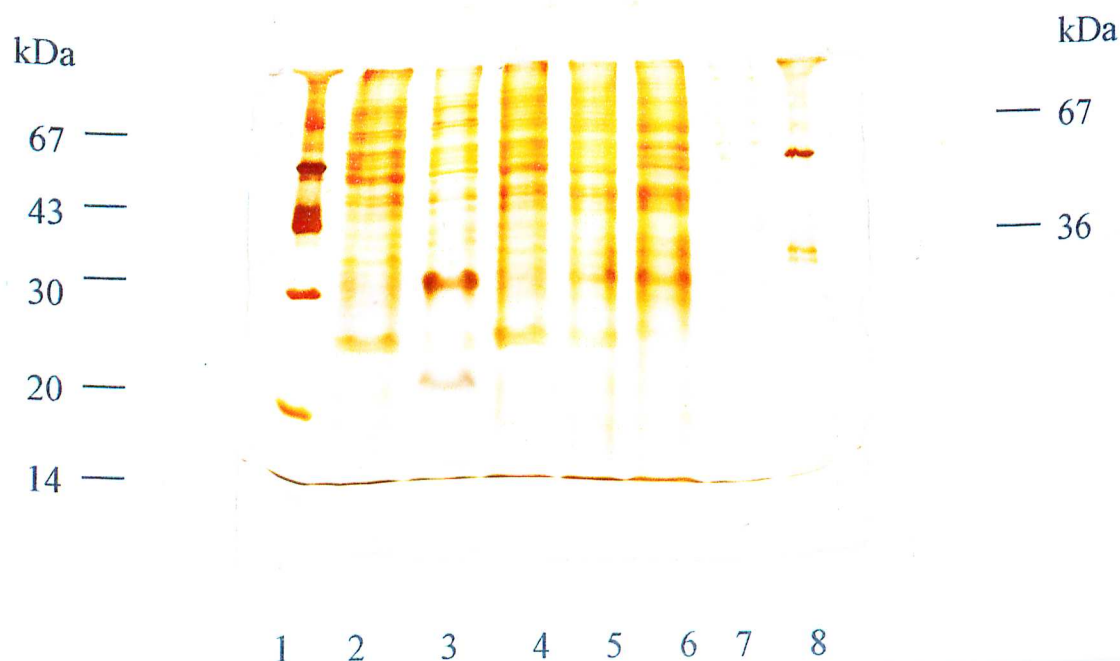
These findings are consistent with the hypothesis that points out the existence of natural infection of these cervid populations by *Toxoplasma gondii* in those studied regions.

*Anexo*

A decorative horizontal flourish consisting of a central scroll-like element with two long, thin, tapering lines extending outwards to the left and right.

01366/97

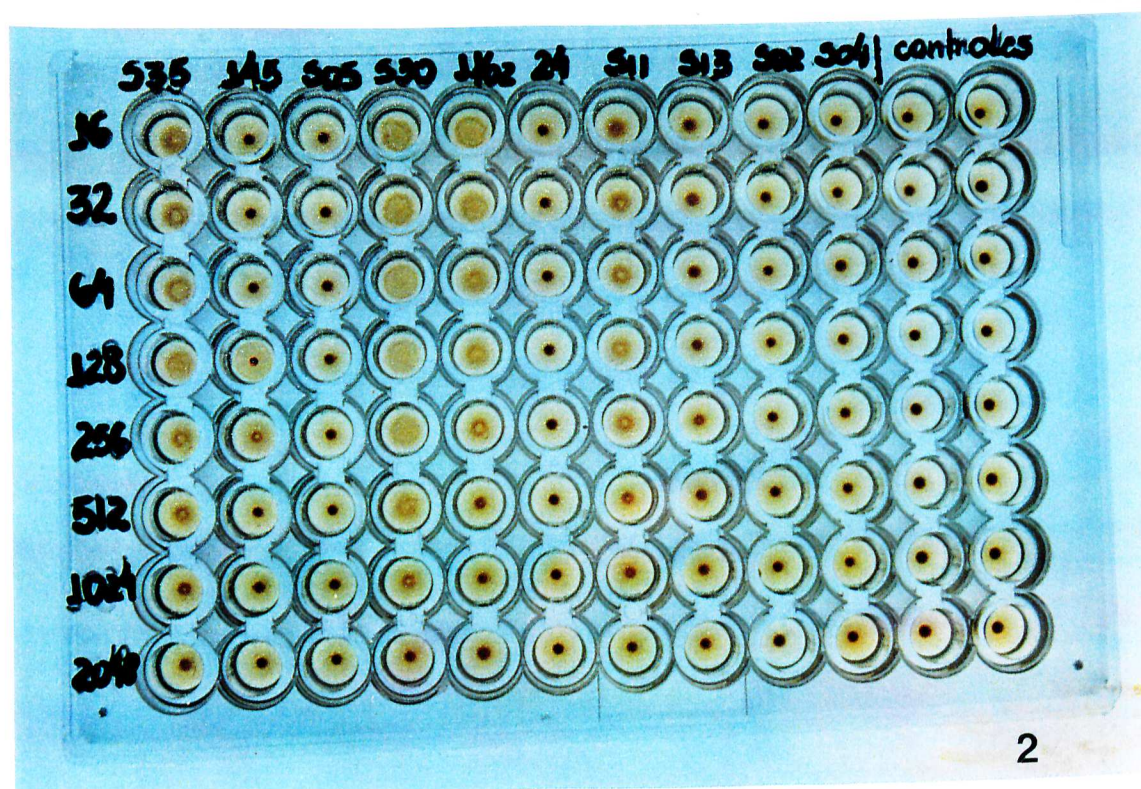
## 9- ANEXO



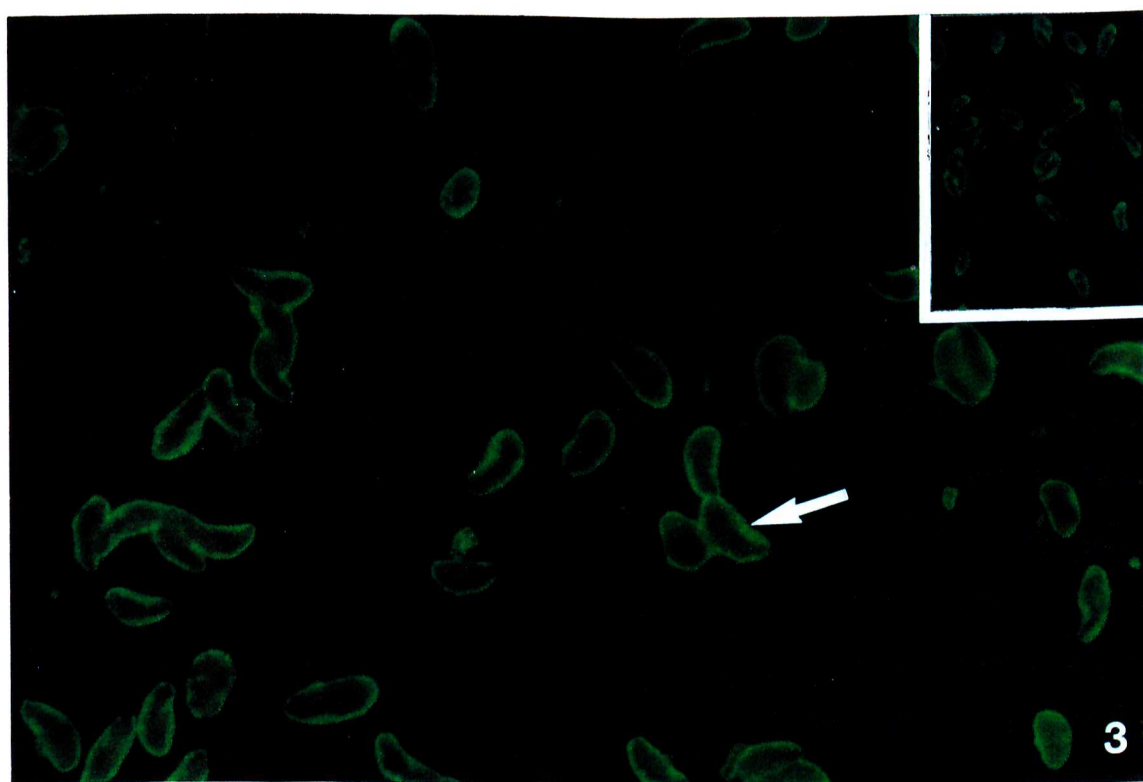
COLUNAS: 1 e 8 – Padrões de peso molecular  
 2 – Antígeno sonificado I – 8,6  $\mu\text{g}$   
 3 – Antígeno obtido por criolise (6 ciclos, PMSF) – 5,6  $\mu\text{g}$   
 4 – Antígeno obtido por criolise (1 ciclo) – 7,8  $\mu\text{g}$   
 5 – Antígeno sonificado II – 7,6  $\mu\text{g}$   
 6 – Antígeno obtido por criolise II (6 ciclos) – 9,1  $\mu\text{g}$   
 7 – Antígeno secretado / excretado (ESA) – 4,5  $\mu\text{g}$

**Figura 1** - Perfil eletroforético de antígenos de *Toxoplasma gondii* obtidos por diferentes métodos de extração através de SDS-PAGE a 15% e coloração por nitrato de prata.

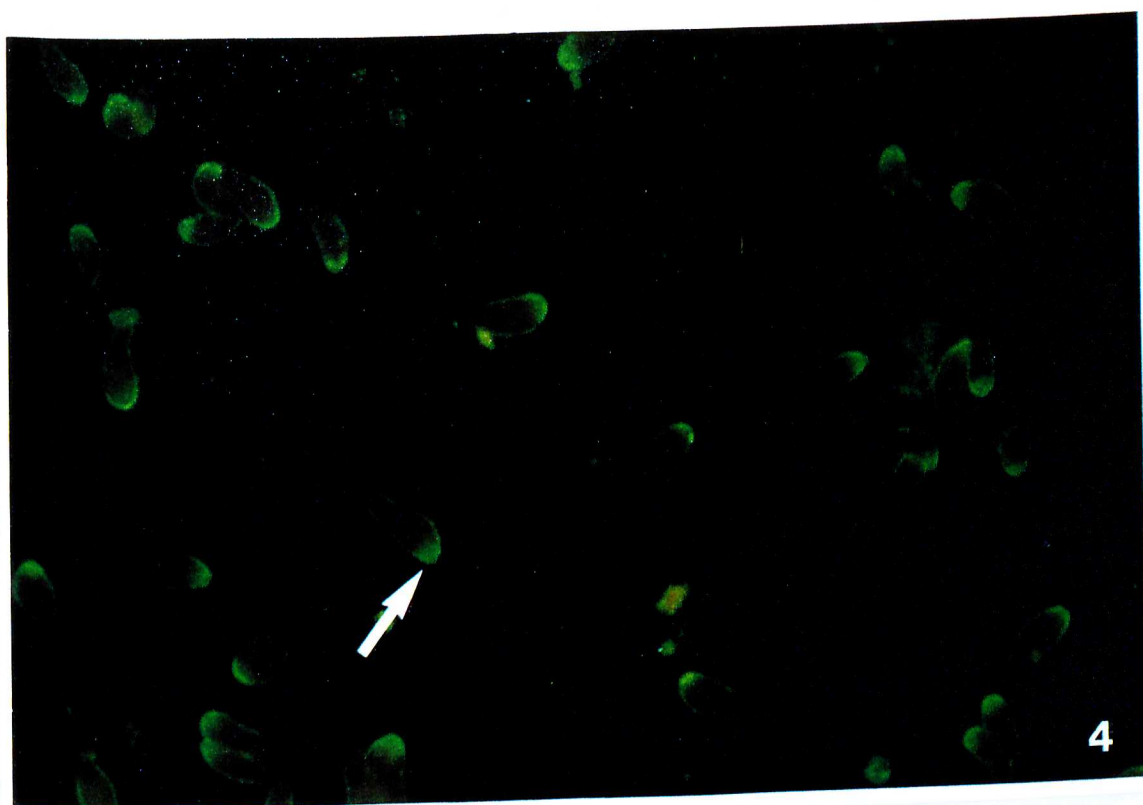




**Figura 2** - Experimento representativo da reação de Hemaglutinação Indireta para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, em mostras de soros de cervídeos utilizando como suporte hemácias humanas formolizadas e sensibilizadas com antígeno-criólise *T. gondii* (6µg/ml).



























**Figura 3** - Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* demonstrando sorologia positiva. A seta indica completa fluorescência na superfície de taquizoíta (aumento de 290X). Na borda superior direita, visualiza-se aumento de 115X.



**Figura 4** - Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* demonstrando sorologia negativa. A seta indica coloração polar na região apical do taquizoíta (aumento de 290X).



**Figura 5** - Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* demonstrando sorologia negativa. Os asteriscos indicam coloração polar na região apical dos taquizoíta (aumento de 115X).

<div>Diluição</div> <div>Nº do soro</div>	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
35						
03						
19						
30						

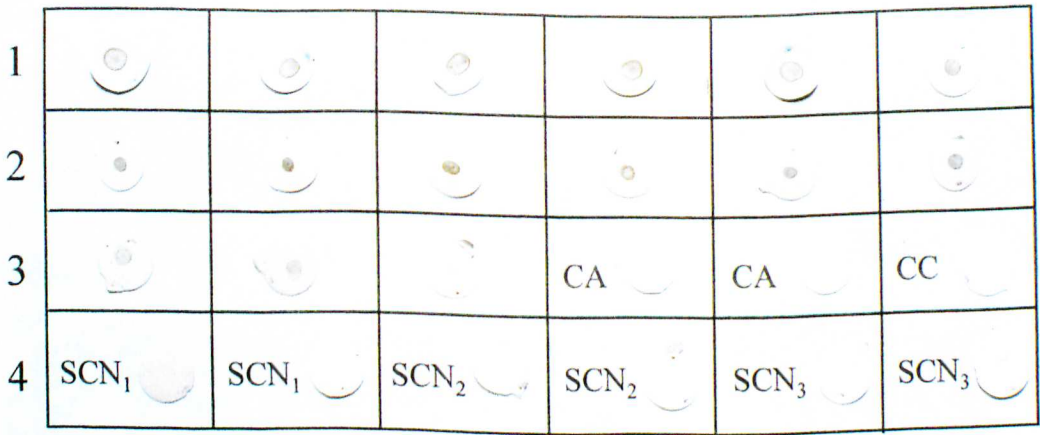
**Figura 6** - Dot-ELISA em discos de nitrocelulose, demonstrando resultados de amostras de soros de veados-campeiros reagentes (35 e 30) e não-reagentes (03 e 19) para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

<div>Diluição</div> <div>Nº do soro</div>	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
144						
99						
Controles*	CA	CC	SCP	SCN <sub>1</sub>	SCN <sub>2</sub>	SCN <sub>3</sub>

\* = CA: controle do antígeno; CC: controle do conjugado; SCP: soro controle positivo; SCN<sub>1</sub>: soro controle negativo 1; SCN<sub>2</sub>: soro controle negativo 2; SCN<sub>3</sub>: soro controle negativo 3.

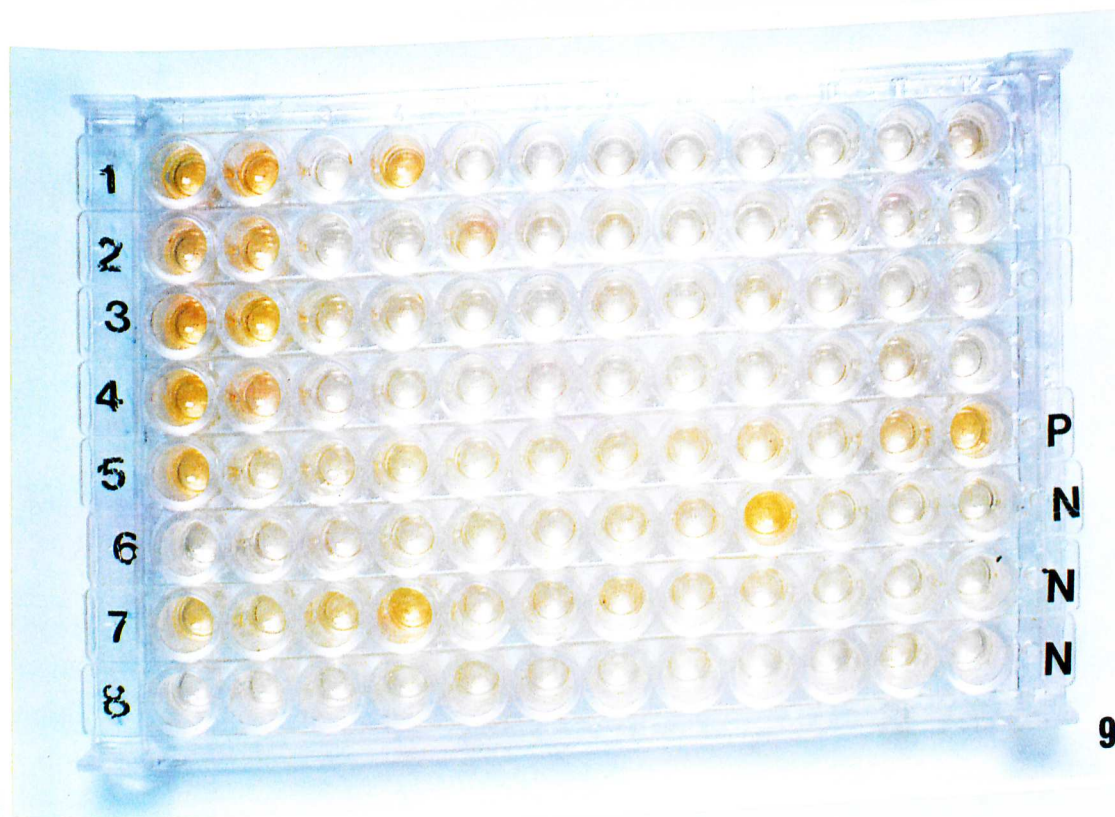
**Figura 7** - Dot-ELISA em discos de nitrocelulose, demonstrando resultados de amostras de soro de cervos do Pantanal reagentes (144 e 99) e não-reagentes (SCN<sub>1</sub>, SCN<sub>2</sub> e SCN<sub>3</sub>) para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.





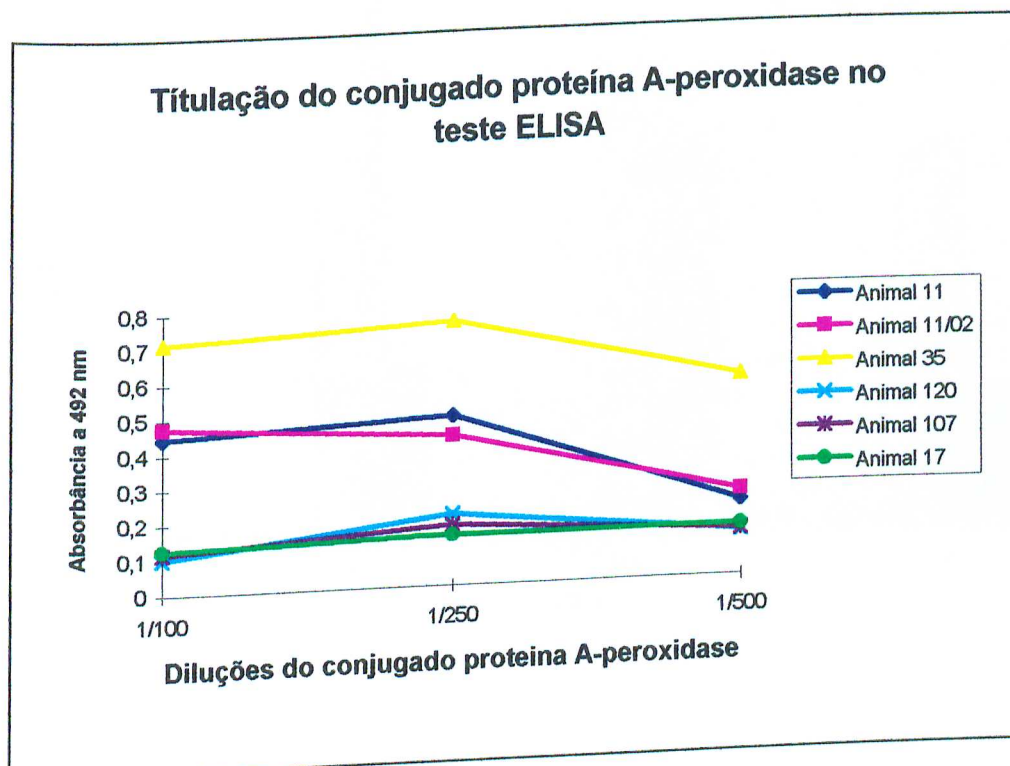
8

**Figura 8** - Dot-ELISA em discos de nitrocelulose, demonstrando resultado final de teste de estabilidade do antígeno-criólise de *T. gondii*. Linha 1 → amostras de soro bovino; Linha 2 → amostras de soro humano; Linha 3 → amostras de soro de cervídeo e Linha 4 → amostras de soros controles. CA: controle do antígeno; CC: controle do conjugado. SCN<sub>1</sub>: soro controle negativo 1 (bovino), em duplicata; SCN<sub>2</sub>: soro controle negativo 2 (humano) em duplicata; SCN<sub>3</sub>: soro controle negativo 3 (cervídeo) em duplicata).



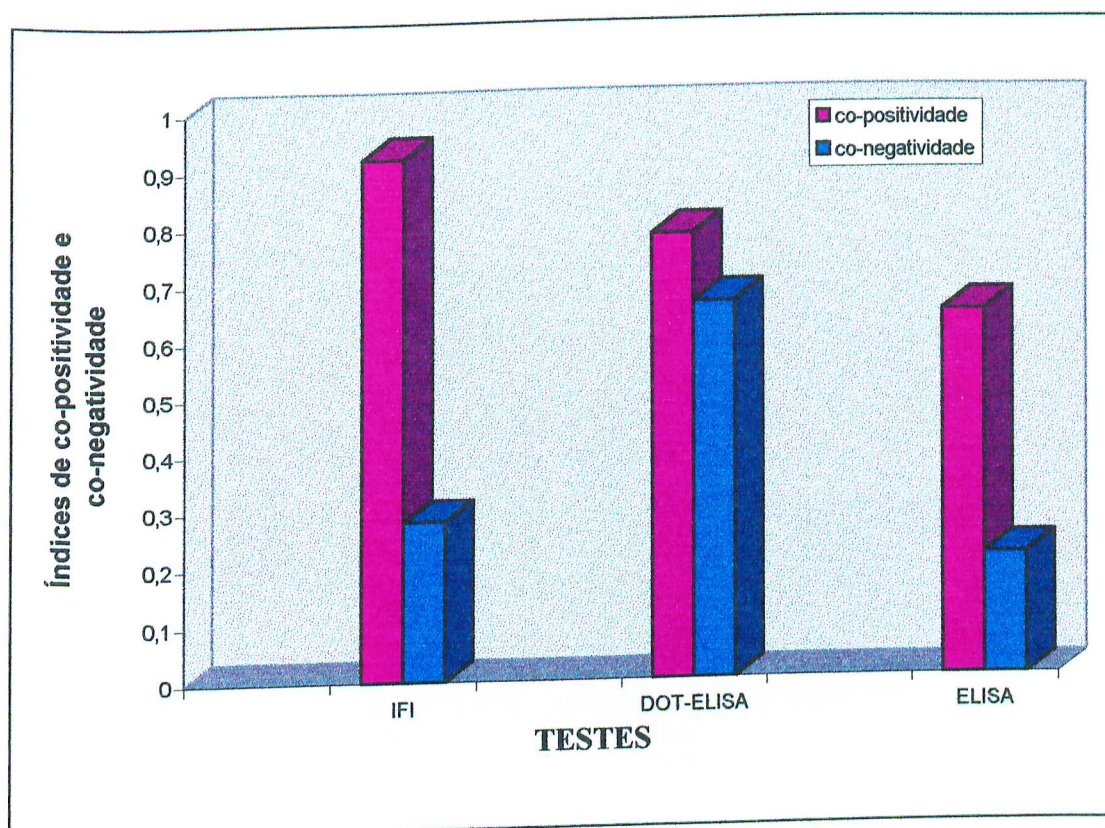
**Figura 9** - Experimento representativo da reação de ELISA para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. As placas de poliestireno foram sensibilizadas com antígeno ( $1 \times 10^5$  taquizoítas/poço). As amostras de soro de cervídeos testadas foram adicionadas e o conjugado proteína A-peroxidase foi usado para detecção do anticorpo. P→ soro controle positivo, N→ soros controle negativos, 1-8→ diluições crescentes das amostras de soro (1:16 a 1:2048).



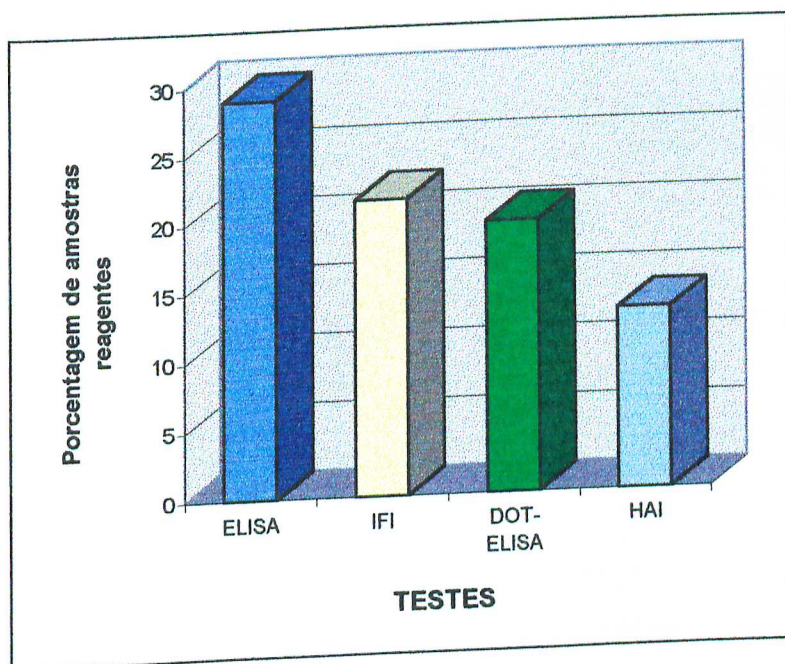


**Figura 10** - Resultado da titulação do conjugado proteína A-peroxidase utilizado no teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

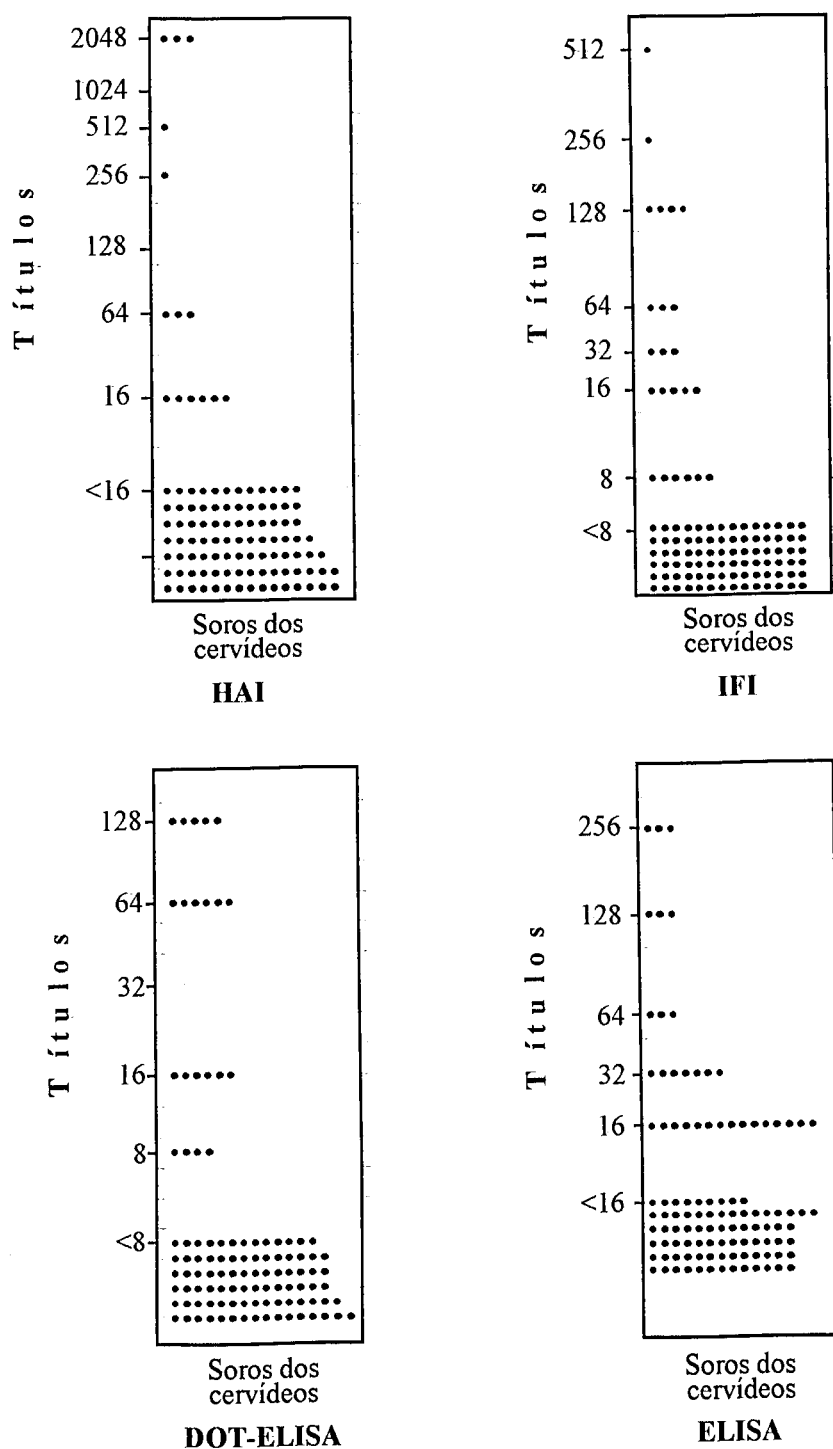
Animais identificados como 11, 11/02 e 35 representam amostras de soros de cervídeos reagentes e animais identificados como 120, 107 e 17 representam amostras de soros de cervídeos não-reagentes.



**Figura 11** - Índices de co-positividade e co-negatividade obtidos conforme os resultados da reação de HAI em comparação com os testes de IFI, dot-ELISA e ELISA.



**Figura 12** - Porcentagem de amostras reagentes para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* determinada pelos testes Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA = 28,97%), Imunofluorescência Indireta (IFI = 21,49%), dot Enzyme Linked Immunosorbent Assay (dot-ELISA = 19,63%), e Hemaglutinação Indireta (HAI = 13,08%).



**Figura 13** - Títulos obtidos em 107 amostras de soros de cervídeos submetidas aos testes de HAI, IFI, dot-ELISA e ELISA para o diagnóstico de toxoplasmose. O “cut-off” considerado para as reações HAI e ELISA foi o título 16, enquanto que, para as reações IFI e dot-ELISA, o “cut-off” foi o título 8.

**Tabela 1** - Resultado da titulação das 5 amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*), utilizando como suporte hemácias humanas formolizadas, sensibilizadas com reagente HA-Toxo para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

Títulos	Identificação das amostras					PADRÕES*
	S35	S30	S11/02	S13	S11	
16	4+	4+	4+	3+	3+	BOV-
32	4+	4+	4+	3+	3+	BOV+
64	3+	4+	4+	3+	3+	CERVO23
128	3+	4+	4+	2+	3+	CERVO140
256	3+	4+	4+	2+	3+	CÃO+
512	3+	4+	4+	1+	2+	KIT+
1024	3+	4+	3+	-	1+	KIT-
≥2048	2+	3+	2+	-	-	Antígeno**

\* Foram utilizados como padrão soros bovinos positivo e negativo, soros de cervos negativos, soro de cão positivo e padrão positivo e negativo comercialmente adquirido (Hematoxo-Biolab).

\*\* Controle do Antígeno: isto é, cavidade tratada com hemácias não sensibilizadas.

Foi adotado como padrão de aglutinação: 4+ para soros muito reativos, 3+ soros de média reatividade, 2+ soros de média a baixa reatividade, 1+ soros de pouca reatividade (foram considerados como soros não-reagentes), e - para soros não reativos.

**Tabela 2** - Resultado da titulação das 9 amostras de soros de cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*), utilizando como suporte hemácias humanas formolizadas, sensibilizadas com reagente HA-Toxo para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

Títulos	Identificação das amostras									PADRÕES*
	N15	N04	N128	N110	N28	N103	N127	N134	N15 <sup>b</sup>	
16	2+	2+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	BOV-
32	1+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	BOV+
64	1+	2+	2+	3+	-	-	-	-	-	CERVO23
128	-	1+	1+	1+	-	-	-	-	-	CERVO140
256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CÃO+
512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	KIT+
1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	KIT-
≥2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Antígeno**

\* Foram utilizados como padrão soros bovinos positivo e negativo, soros de cervos negativos, soro de cão positivo e padrão positivo e negativo comercialmente adquirido (Hematoxo-Biolab).

\*\* Controle do Antígeno: isto é, cavidade tratada com hemácias não sensibilizadas.

Foi adotado como padrão de aglutinação: 4+ para soros muito reativos, 3+ soros de média reatividade, 2+ soros de média a baixa reatividade, 1+ soros de pouca reatividade (foram considerados como soros não-reagentes), e - para soros não reativos.

**Tabela 3** - Relação das amostras de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes ao teste de HAI segundo o título sorológico, sexo e faixa etária.

Espécie e N <sup>o</sup> do animal	Título	Sexo	Faixa etária
<i>O. bezoarticus</i>			
11	512	Macho	Adulto
13	256	Macho	Adulto
30	≥2048	Fêmea	Adulto
35	≥2048	Macho	Adulto
11/02	≥2048	Macho	Adulto
<i>B. dichotomus</i>			
15 <sup>b</sup>	16	Macho	Subadulto
134	16	Fêmea	Adulto
127	16	Fêmea	Adulto
04	64	Macho	Jovem
128	64	Macho	Filhote
15	16	Fêmea	Adulto
08	16	Fêmea	Adulto
110	64	Fêmea	Adulto
103	16	Macho	Adulto

**Tabela 4** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) reagentes ao teste de IFI segundo o título sorológico, sexo e faixa etária.

Identificação do animal	Título	Sexo	Faixa etária
11	128	Macho	Adulto
13	128	Macho	Adulto
30	64	Fêmea	Adulto
35	512	Macho	Adulto
11/02	256	Macho	Adulto



**Tabela 5** - Relação das amostras de soros de cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes ao teste de IFI segundo o título sorológico, sexo e faixa etária.

Identificação do animal	Título	Sexo	Faixa etária
02	16	Fêmea	Subadulto
141	8	Macho	Subadulto
17	16	Macho	Adulto
27	8	Macho	Adulto
18	8	Fêmea	Adulto
103	8	Macho	Adulto
106	8	Fêmea	Jovem
134	128	Fêmea	Adulto
127	8	Fêmea	Adulto
04	128	Macho	Jovem
128	64	Macho	Filhote
15	64	Fêmea	Adulto
08	32	Fêmea	Adulto
110	16	Fêmea	Adulto
113	16	Fêmea	Adulto
148	32	Macho	Jovem
132	16	Fêmea	Subadulto
118	32	Fêmea	Adulto

**Tabela 6** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) reagentes ao teste de dot-ELISA segundo o título sorológico, sexo e faixa etária.

Identificação do animal	Título	Sexo	Faixa etária
11	16	Macho	Adulto
13	64	Macho	Adulto
30	16	Fêmea	Adulto
35	$\geq 128$	Macho	Adulto

**Tabela 7** - Relação das amostras de soros de cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes ao teste de dot-ELISA segundo o título sorológico, sexo e faixa etária.

Identificação do animal	Título	Sexo	Faixa etária
02	64	Fêmea	Subadulto
141	16	Macho	Subadulto
17	≥128	Macho	Adulto
96	16	Fêmea	Adulto
27	16	Macho	Adulto
16	8	Macho	Subadulto
134	64	Fêmea	Adulto
99	≥128	Macho	Adulto
04	8	Macho	Jovem
128	8	Macho	Filhote
15	≥128	Fêmea	Adulto
08	64	Fêmea	Adulto
110	64	Fêmea	Adulto
113	16	Fêmea	Adulto
144	≥128	Fêmea	Adulto
111	8	Fêmea	Subadulto
118	64	Fêmea	Adulto

**Tabela 8** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) reagentes ao teste de ELISA segundo o título sorológico, sexo e faixa etária.

Identificação do animal	Título	Sexo	Faixa etária
11	16	Macho	Adulto
13	64	Macho	Adulto
30	256	Fêmea	Adulto
35	256	Macho	Adulto
11/02	256	Macho	Adulto
S02	32	Fêmea	Jovem
S10	16	Fêmea	Adulto
S14	16	Fêmea	Adulto
S16	16	Macho	Adulto
S26	32	Fêmea	Adulto
S36	16	Macho	Jovem
S37	16	Fêmea	Adulto

**Tabela 9** - Relação das amostras de soros de cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes ao teste de ELISA segundo o título sorológico, sexo e faixa etária.

Identificação do animal	Título	Sexo	Faixa etária
02	32	Fêmea	Subadulto
114	16	Fêmea	Jovem
17	64	Macho	Adulto
27	16	Macho	Adulto
135 <sup>A</sup>	64	ND*	ND*
135 <sup>B</sup>	32	ND*	ND*
106	16	Fêmea	Jovem
134	128	Fêmea	Adulto
127	32	Fêmea	Adulto
95 <sup>A</sup>	16	Fêmea	Filhote
151	32	Fêmea	Subadulto
19	16	Macho	Adulto
08	32	Fêmea	Adulto
110	128	Fêmea	Adulto
113	16	Fêmea	Adulto
89 <sup>A</sup>	16	Fêmea	filhote
144	16	Fêmea	Adulto
99	16	Macho	Adulto
118	128	Fêmea	Adulto

ND\*: Não Determinado

**Tabela 10** - Médias, desvios-padrão e “cut-off” das densidades ópticas a 492nm encontradas na reação de ELISA para triagem de 107 amostras de soros de cervídeos.

Médias e desvios- padrão	Placa 1	Placa 2	Placa 3
“Cut-off”			
	0,153 (± 0,08)	0,249 (± 0,12)	0,145 (± 0,16)
	177	285	157

**Tabela 11** - Médias, desvios-padrão e "cut-off" das densidades ópticas a 492nm encontradas na reação de ELISA para titulação de 107 amostras de soros de cervídeos.

Médias e desvio-padrão	Placa 1	Placa 2	Placa 3
"Cut-off"	0,141 ( $\pm$ 0,18)	0,200 ( $\pm$ 0,36)	0,147 ( $\pm$ 0,27)
	195	308	228

**Tabela 12** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes por 2 ou mais testes segundo o título sorológico.

Espécie e Nº do animal	Título em:			
	HAI	IFI	DOT-ELISA	ELISA
<i>O. bezoarticus</i>				
11	512	128	16	16
13	256	128	64	64
30	≥2048	64	16	256
35	≥2048	512	≥128	256
11/02	≥2048	256	NR*	256
<i>B. dichotomus</i>				
16	16	NR	8	NR
134	16	128	64	128
127	16	8	NR	32
04	64	128	8	NR
128	64	64	8	NR
15	16	64	≥128	NR
08	16	32	64	32
110	64	16	64	128
103	16	8	NR	NR
02	NR	16	64	32
141	NR	8	16	NR
17	NR	16	≥128	64
144	NR	NR	≥128	16
27	NR	8	16	16
99	NR	NR	≥128	16
118	NR	32	64	128
113	NR	16	16	16
106	NR	8	NR	16

NR\* -Não Reagente



**Tabela 13** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes pelos testes HAI e IFI que apresentaram títulos de anticorpos coincidentes ou diferentes em uma diluição .

Título em:										
IFI \ HAI	8	16	32	64	128	256	512	1024	≥2048	Total
8		1								1
16	1									1
32		1								1
64				1						1
128				1		1				2
256										0
512										0
1024										0
2048										0
Total	1	2	0	2	0	1	0	0	0	6

**Tabela 14** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes pelos testes HAI e dot-ELISA que apresentaram títulos de anticorpos coincidentes ou diferentes em uma diluição.

Título em:											
DOT- ELISA	HAI	8	16	32	64	128	256	512	1024	≥2048	Total
	8	1									1
16					2						2
32											0
64					1						1
128											0
256											0
512											0
1024											0
2048											0
Total		0	1	0	3	0	0	0	0	0	4

**Tabela 15** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes pelos testes HAI e ELISA que apresentaram títulos de anticorpos coincidentes ou diferentes em uma diluição.

Título em:											
ELISA \ HAI	8	16	32	64	128	256	512	1024	≥2048	Total	
8										0	
16										0	
32		2								2	
64										0	
128				1						1	
256										0	
512										0	
1024										0	
2048										0	
Total	0	2	0	1	0	0	0	0	0	3	

**Tabela 16** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes pelos testes IFI e dot-ELISA que apresentaram títulos de anticorpos coincidentes ou diferentes em uma diluição.

		Títulos em:							Total
DOT-ELISA \ IFI	IFI	8	16	32	64	128	256	512	
	8								0
	16	2	1						3
	32								0
	64			2		2			4
	128				1		1		2
	256								0
	512								0
	Total	2	1	2	1	2	1	0	9

**Tabela 17** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes pelos testes IFI e ELISA que apresentaram títulos de anticorpos coincidentes ou diferentes em uma diluição.

		Títulos em:							Total
ELISA \ IFI	IFI	8	16	32	64	128	256	512	
	8		1						1
	16	1	1						2
	32		1	1					2
	64					1			1
	128					1			1
	256						1	1	2
	512								0
Total		1	3	1	0	2	1	1	9

**Tabela 18** - Relação das amostras de soros de veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) e cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) reagentes pelos testes ELISA e dot-ELISA que apresentaram títulos de anticorpos coincidentes ou diferentes em uma diluição.

Títulos em:								
ELISA \ DOT-ELISA	8	16	32	64	128	256	512	Total
8								0
16		3						3
32								0
64			2	1	3			6
128				1		1		2
256								0
512								0
Total	0	3	2	2	3	1	0	11

**Tabela 19** - Prevalência global de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) em relação à faixa etária.

Faixa etária	Nº de amostras testadas	Reativos (%) <sup>*</sup>	Não-reativos(%)
ND <sup>**</sup>	4	0 (0,00)	4 (100,00)
Filhote	12	1 (8,33)	11 (91,67)
Jovem	15	2 (13,33)	13 (86,67)
Subadulto	13	3 (23,08)	10 (76,92)
adulto	63	17 (26,98)	46 (73,02)
<b>Total</b>	<b>107</b>	<b>23 (21,50)</b>	<b>84 (78,50)</b>

\* A prevalência global foi calculada a partir de amostras reagentes em pelo menos dois testes sorológicos. Para HAI e ELISA, o "cut-off" utilizado foi o título de 16 e para IFI e dot-ELISA o títulos de 8.

\*\* ND = Não Determinado.

**Tabela 20** - Prevalência global de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*) em relação ao sexo e à espécie.

	Nº de amostras testadas	Reagentes (%) <sup>*</sup>	Não-reagentes(%)
<b>Sexo</b>			
Machos	46	11 (23,91)	35 (76,09)
Fêmeas	57	12 (21,05)	45 (78,95)
ND**	4	0 (0,00)	4 (100,00)
<b>Espécie</b>			
<i>B. dichotomus</i>	66	18 (27,27)	48 (72,73)
<i>O. bezoarticus</i>	41	5 (12,19)	36 (87,81)
<b>Total</b>	<b>107</b>	<b>23 (21,50)</b>	<b>84 (78,50)</b>

\* A prevalência global foi calculada a partir de amostras reagentes em pelo menos dois testes sorológicos. Para HAI e ELISA, o "cut-off" utilizado foi o título de 16 e para IFI e dot-ELISA o títulos de 8.

\*\* ND = Não Determinado.



# *Referências Bibliográficas*

---

## 10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO NETO, V., COTRIM, J.X., LAUS, W.C., GOMES, M.C.O. Nota sobre o encontro de *Toxoplasma gondii* em sangue destinado à transfusão. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.5, n.2, p. 68-69, 1963.
- ARDOIN, P., COUZINEAU, P., BAUFINE-DUCROCQ, H. Sur l'utilisation du sarcome TG-180 pour l'obtention d'une suspension riche en *Toxoplasma gondii* extracellulaires. **Comptes Rendus Des Seances de La Societe de Biologie et De Ses Filiales**, v.161, p. 117-119, 1967.
- BAHIA, M.T., VÍTOR, R.W.A., ANTUNES, C.M.F., CHIARI, C.A. Diagnosis of toxoplasmosis caprina by a dot enzyme-linked immunosorbent assay. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, n. 2, p. 173-182, 1993.
- BARUZZI, R.G. Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology: serologic survey among the indians of the Upper Xingu River, Central Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.12, p. 93-104, 1970.
- BEHYMER, D., JESSUP, D., JONES, K., FRANTI, C.E., RIEMANN, H.P., BAHR, A. Antibodies to nine infectious disease agents in deer from California. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.20, n.3, p. 297-306, 1989.

BERNARDES, A.T., MACHADO, A.B.M., RYLANDS, A.B. **Fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1990. 62p.

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

BRISCOE, N.J., HUMPHREYS, J.G., DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infections in Pennsylvania black bears, *Ursus americanus*. **Journal of Wildlife Diseases**, v.29, p. 599-601, 1993.

BURRIDGE, M.J., BIGLER, W.J., HENNEMANN, J.M. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in wild animals in Florida. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.175, n.9, p. 964-967, 1979.

BURT, S.M., CARTER, T.J.N., KRICKA, L.J. Thermal characteristics of microtitre plates used in immunological assays. **Journal of Immunological Methods**, v.31, p. 231-236, 1979.

BUTLER, W.T. Haemagglutination studies with formalized erythrocytes. Effect of bis-diazo-benzidine and tannic acid treatment on sensitization by soluble antigen. **Journal of Immunology**, v.90, p. 663-671, 1963.

BUXTON, D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitology Today**, v.9, n.9, p. 335-337, 1993.

CABRERA, A. Catalogo de los mamíferos de america del Sur. **Revista Museo Argentino Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia**, v.4, p. 309-732, 1960.

CAMARGO, M.E. Estudo comparativo das reacções de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmose, em 1000 soros humanos: comportamento anômalo de alguns soros. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.24, p. 1-26, 1964a.

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

CAMARGO, M.E., HOSHINO, S., SIQUEIRA, G.R.V. Hemagglutination with preserved, sensitized cell, a practical test for routine serologic diagnosis of american trypanosomiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.18, p. 215-226, 1973.

CERTAIN, C.C. Eletroforesis of fluorescent antibody. **Nature**, v.182, p. 1305-1306, 1958.

- CHARITY, S., BUSCHINELLI, M.C., GASPARINI, R.L., TOMAS, W.M., NUNES, A.L.V., OLIVEIRA, P., SANTIAGO, M.E., CURY, M. Translocation of a total Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) population at Tietê river, 1991, São Paulo State, Brazil. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 24., 1991, **Anais...** 1991. p.194.
- CHOMEL, B.B., CARNICIU, M.L., KASTEN, R.W., CASTELLI, P.M., WORK, T.M., JESSUP, D. Antibody prevalence of eight ruminant infectious diseases in California Mule and Black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.30, p. 51-59, 1994.
- CLARK, H.F., SHEPARD, C.C. A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. **Virology**, v.20, p. 642-644, 1963.
- COLLINS, G.H. Studies in Sarcocystis species VIII: Sarcocystis and Toxoplasma in red deer (*Cervus elaphus*). **New Zealand Veterinary Journal**, v.29, p. 126-127, 1981.
- CONNER, M.C., SOUTIERE, E.C., LANCIA, R.A. Drop-netting deer: costs and incidence of capture myopathy. **Wildlife Society Bulletin**, v.15, p. 434-438, 1987.
- COSTA, J.L.O., NUNES, N. Emprego da Associação de Acepromazina, Midazolan e Quetamina para produção de anestesia dissociativa em veados-campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*). **Relatório Final de Pesquisa -Projeto Veado-Campeiro**, Jaboticabal, p. 47-55, 1996.

DE ALENCAR, A.A. Toxoplasmose espontânea e inaparente em anfíbios dos gêneros *Leptodactylus* e *Bufo*. **Jornal Brasileiro de Neurologia**, v.9, p. 137-146, 1957.

DE YOUNG, C.A. Comparison of net-gun and drive-net capture for White-Tailed deer. **Wildlife Society Bulletin**, v.16, p. 318-320. 1988.

DECOSTER, A., DARCY, F., CARON A., CAPRON, A. IgA antibodies against P30 as marks of congenital and acute toxoplasmosis. **Lancet**, p. 1104-1107, 1988.

DE-GASPARI, E.N., RIBEIRO-FILHO, A.A., ZOLLINGER, W.D. The use of filter paper monoclonal antibodies in a dot-blot test for typing *Neisseria meningitis* B. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p. 2889-2893, 1994.

DESMONTS, G., REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, p. 562-568, 1980.

DRESSEN, D.W. *Toxoplasma gondii* in wildlife. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.196, p. 274-276, 1990.

DUARTE, J.M.B. Guia de identificação de cervídeos brasileiros, SZB - Sociedade de Zoológicos do Brasil, Grupo de Interesse em cervídeos, UNESP - Jaboticabal, SP, 14p. 1996.

DUARTE, J.M.B., PIOVEZAN, U. Avaliação da eficiência da técnica de rede de armação rápida para a captura de veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) no Pantanal - MS e no Parque Nacional de Emas - GO. **Relatório Final de Pesquisa - Projeto Veado-Campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*)**, Jaboticabal, p. 31-46, 1996.

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

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

DUBEY, J.P. Effect of immunization of cats with *Isospora felis* and BCG on immunity to reexcretion of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Protozoology**, v.25, p. 380-382, 1978.

DUBEY, J.P., DESMONTS, G. Serological response of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v.19, p. 337-339, 1987.

DUBEY, J.P., BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Florida: CRC Press, Incorporated, Boca Raton, 1988. 220p.

DUBEY, J.P., THULLIEZ, P., POWELL, E.C. Acute primary toxoplasmic hepatitis in an adult cat shedding *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, p. 1616-1618, 1990.

DUBEY, J.P., CAMARGO, M.E., RUFF, M.D., WILKINS, G.C., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in Turkeys. **Journal of Parasitology**, v.79, n.6, p. 949-952, 1993.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.205, p. 1593-1598, 1994.

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

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

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., ADAMS, D.S., GAY, J.M., BASZLER, T.V., BLAGBURN, B.L., THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n.3, p. 329-336, 1996.

ELLIS, J., GRIFFIN, H., MORRISON, D., JOHNSON, A.M. Analysis of dinucleotide frequency and codon usage in the phylum Apicomplexa. **Gene**, v.126, p. 163-170, 1993.



ELSAID, M.M.A., BAHIA, M.T., MACHADO-COELHO, G.L., VÍTOR, R.W.A.

Diagnosis of human toxoplasmosis by a dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

**Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.37, n.2, p. 117-122,

1995.

FERRARONI, J.J., MARZOCHI, M.C.A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma*

*gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos humanos da Amazônia.

**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.75, n.1-2, p. 99-109, 1980.

FIRCHOW, K.M., VAUGHAN, M.R., MYTTON, W.R. Evaluation of the hand-held net-

gun for capturing pronghorns. **Journal Wildlife Management**, v.50, p. 320-322,

1986.

FOWLER, E.M., BOEVER, W.J. **Zoo and wild animal medicine**. 2. edition. W.B.

Saunders Company, 1986. p. 981-985.

FRANTI, C.E., CONNOLLY, G.E., RIEMANN, H.P., BEHYMER, D.E., RUPPANNER,

R. A survey for *Toxoplasma gondii* antibodies in deer and other wildlife on a sheep

range. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.167, p. 565-

568, 1975.

- FRANTI, C.E., RIEMANN, H.P., BEHYMER, D.E., SUTHER, D., HOWARTH, J.A.,  
RUPPANNER, R. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild and domestic  
animals in Northern California. **Journal of the American Veterinary Medical  
Association**, v.169, p. 901-906, 1976.
- FRENKEL, J.K., RUIZ, A., CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in  
Kansas and Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.24,  
p. 439-443, 1975.
- FRENKEL, J.K. False negative serologic tests for *Toxoplasma* in birds. **Journal of  
Parasitology**, v.67, p. 952-953, 1981.
- FRIEDMAN, R.D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary  
protein detection in alkaline polyacrilamide gels. **Annals of Biochemistry**, v.126, p.  
346-349, 1982.
- FULTON, J.D., TURK, J.L. Direct agglutination tests for *Toxoplasma gondii*. **Lancet**,  
v.2, p. 1068-1069, 1959.
- GODARD, I., ESTAQUIER, J., ZENNER, L., BOSSUS, M., AURIAULT, C., DARCY,  
F., GRAS-MASSE, H., CAPRON, A. Antigenity and immunogenicity of P30: derived  
peptides in experimental models of toxoplasmosis. **Molecular Immunology**, v.31, p.  
1353-1363, 1994.

GOLDSTEIN, G., SLIZYS, J., CHASE, M.W. Studies on fluorescent antibody staining. I. non-specific fluorescent with fluorescein coupled sheep antirabbit globulins. **Journal of Experimental Medicine**, v.114, p. 89-110, 1961.

GORMAN, T.R., RIVEROS, V., ALCAÍNO, H.A., SALAS, D.R., THIERMANN, E.R. Helminthiasis and toxoplasmosis among exotic mammals at the Santiago National Zoo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.189, n.9, p. 1068-1070, 1986.

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.

GRISARD, E.C., ELSAID, M.M.A., TAFURI, W.L., LIMA, J.D., CARVALHO PINTO, C.J., STEINDEL, M., VÍTOR, R.W.A. *Besnoitia* sp. (Protozoa: Toxoplasmatinae) from *Akodon montesis* (Rodentia: Cricetidae) in Santa Catarina State, Brazil. (Aceito para publicação: **Journal of Parasitology**. Abril, 1997 ?).

GUO, Z.G., JOHNSON, A.M. Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, v.81, p. 365-370, 1995.

HAWKES, R., NIDAY, E., GORDON, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Analytical Biochemistry**, v.119, p. 142-147, 1982.

- HULDT, G. The dye test and complement fixation test in toxoplasmosis: a comparative investigation. *Acta Pathological Et Microbiologica Scandinavica*, v.43, p. 141-146, 1958.
- HUMPHREYS, J.G., STEWART, R.L., DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of hunter-killed White-tailed deer in Pennsylvania. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, p. 172-173, 1995.
- IPPEN, R., KOZOJED, V., JÍRA, J. Toxoplasmosis in zoo animals. *Folia Parasitologica*, v.28, p. 109-115, 1981.
- JACOBS, L., LUNDE, M.N. A hemagglutination test for toxoplasmosis. *Journal of Parasitology*, v.43, p. 308-314, 1957.
- JOHNSON, A.M. Comparison of dinucleotide frequency and codon usage in *Toxoplasma* and *Plasmodium*: evolutionary implications. *Journal of Molecular Evolution*, v.30, p. 383-387, 1990.
- JOHNSON, A.M., ROBERTS, H., MUNDAY, B.L. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibody in wild macropods. *Australian Veterinary Journal*, v.65, n.7, p. 199-201, 1988.
- KAPPERUD, G. Survey for toxoplasmosis in wild and domestic animals from norway and sweden. *Journal of Wildlife Diseases*, v.14, p. 157-162, 1978.

- KASPER, L.H., BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In:  
WARREN, K.S. (ed). **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections.**  
Cambridge: Blackwell, 1993. p. 269-295.
- KELEN, A.E., AYLLON-CLEINDL, L., LABZOFFSKY, N.A. Indirect fluorescent  
antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. **Canadian Journal of  
Microbiology**, v.8, p. 545-554, 1962.
- KHAN, I.A., ELY, K.H., KASPER, L.H. A purified parasite antigen (P30) mediates  
CD8+ Tcell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Journal of  
Immunology**, v.147, p. 3501-3506; 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of  
bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.
- LEVINE, N.D. Taxonomy of Toxoplasma. **Journal of Protozoology**, v.24, p. 36-41,  
1977.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in  
tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, p. 1981-1983,  
1989.

LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., DUBEY, J.P., MASON, W.H. Prevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from White-tailed deer in Alabama. **Journal of Parasitology**, v.77, p. 62-64, 1991.

LINDSAY, D.S., SMITH, P.C., BLAGBURN, B.L. Prevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from wild turkeys in Alabama. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v.61, n.1, p. 115-117, 1994.

LISSALDO, A.M., HOSHINO-SHIMIZU, S., UMEZAWA, E.S., STOLF, A.M.S. Alkaline soluble *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigen (ASEA) applied to dot-ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.36, n.2, p. 163-166, 1994.

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

MACHADO, R.Z., MULLER, E. Frequência de anticorpos contra *Babesia* em veado-campeiro no Pantanal e Parque de Emas. **Relatório Final de Pesquisa, Projeto Veado-Campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*)**. Jaboticabal, p. 124-132, 1996.

MACPHERSON, J.M., GAJADHAR, A.A. Sensitive and specific polymerase chain reaction of *Toxoplasma gondii* for veterinary and medical diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.57, p. 45-48, 1993.

MAURO, R.A. **Abundância e padrão de distribuição de cervo do Pantanal**

*Blastocerus dichotomus* no Pantanal Mato-Grossense. Mato Grosso do Sul, 1993.

48p. (Dissertação, Mestrado).

MCLEOD, R., MACK, D., BROWN, C. MiniReview *Toxoplasma gondii*: new advances in cellular and molecular biology. **Experimental Parasitology**, v.72, p. 109-121, 1991.

MINEO, J.R., MCLEOD, R., MACK, D., SMITH, J., KHAN, I.A., ELY, K.H., KASPER, L.H. 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, p. 3951-3964, 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.

MINEO, J.R., KHAN, I.A., KASPER, L.H. *Toxoplasma gondii*: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. **Experimental Parasitology**, v.79, p. 351-361, 1994.

MONTENEGRO, S.M.L., ALMEIDA, A.M.P., CARVALHO, A.B., CARVALHO JUNIOR, L.B. The use of dracon plates for dot enzyme linked immunosorbent assay (dot-ELISA). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p. 461-465, 1991.

MORALES, J.A., PEÑA, M.A., DUBEY, J.P. Disseminated toxoplasmosis in a captive Porcupine. **Journal of Parasitology**, v.82, n.1, p. 185-186, 1996.

MORRISSETE, N.S., BEDIAN, V., WEBSTER, P., ROOS, D.S. Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v.79, p. 445-459, 1994.

PAPPAS, M.G., LUNDE, M.N., HAJKOWSKI, R., MCMAHON, J. Determination of IgM and IgG antibodies to *Toxoplasma* using the IFA test, ELISA, and dot-ELISA procedures. **Veterinary Parasitology**, v.20, p. 31-42, 1986.

PATTON, S., JOHNSON, S.L., LOEFFER, D.G., WRIGHT, B.G., JENSEN, J.M. Epizootic of toxoplasmosis in kangaroos, wallabies, and potaroos: possible transmission via domestic cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.189, n.9, p. 1166-1169, 1986.

PINDER, L. Marsh deer wild populations status in Brazil. **Cervo do Pantanal PHVA**. p. 105-112, 1994.

QUIST, C.F., DUBEY, J.P., LUTTRELL, M.P., DAVIDSON, W.R. Toxoplasmosis in wild Turkeys: a case report and serologic survey. **Journal of Wildlife Diseases**, v.31, n.2, p. 255-258, 1995.



REDFORD, K.H. The Pampas deer (*Ozotocerus bezoarticus*) in Central Brazil. In: Wemmer, C. (ed.). **Biology and management of the cervids**. Washington-DC: Smithsonian Institution Press. p. 410-414, 1978.

REY, L. *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose. **Parasitologia**. 2ª edição, Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. p. 274 -285, 1991.

RIBEIRO, A.M. Veados do Brasil segundo as coleções Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. **Revista do Museu Paulista**. v.11, p. 213-308, 1919 apud DUARTE, J.M.B., PIOVEZAN, U. Avaliação da eficiência da técnica de rede de armação rápida para a captura de veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) no Pantanal - MS e no Parque Nacional de Emas - GO. **Relatório Final de Pesquisa - Projeto Veado-Campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*)**, Jaboticabal, p. 31-46, 1996.

ROBERT, R., DE LA 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.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Immunology**, Third edition. Mosby - year Book Europe Limited. 1993.

SABIN, A., FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasitic (*Toxoplasma*). **Science**, v.108, p. 660-663, 1948.

- SACKS, J.J., DELGADO, D.G., LOBEL, H.O., PARKER, R.L. Toxoplasmosis infection associated with eating undecooked venison. *American Journal of Epidemiology*, v.118, n.6, p. 832-838, 1983.
- SALATA, E., YOSHIDA, E.L.A., PEREIRA, E.A., CORREA, F.M.A. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.27, n.1, p. 20-22, 1985.
- SANTORO, F., CHARIF, H., CAPRON, A. The imunodominante epitope of the major membrane tachyzoite protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*, v.8, n.6, p. 631-637, 1986.
- SHARMA, S.D. Immunology of Toxoplasmosis. In: *Immunology of Parasites*. 1983. p. 184- 198.
- SMITH, D.D., FRENKEL, J.K. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. 1995. *Journal of Wildlife Diseases*, v.31, n.1, p. 15-21, 1995.
- SOGORB, F.S., JAMRA, L.F., GUIMARÃES, E.C., DEANE, M.P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.14, n.5, p. 314-320, 1972.

SOGORB, F., JAMRA, L.F., GUIMARÃES, E.C. Toxoplasmose em animais de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.19, p. 191-194, 1977.

STEINITZ, M., TAMIR, S. An improved method to create nitrocellulose particles suitable for the immobilization of antigen and antibody. **Journal of Immunological Methods**, v.187, p. 171-177, 1995.

STEWART, J.G., HUMPHREYS, J.G., DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* in Woodchucks (*Marmota monax*) from Pennsylvania. **Journal of Parasitology**, v.81, p. 126-127, 1995.

STILES, J., PRADE, R., GREENE, C. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. **American Journal of Veterinary Research**, v.7, n.3, p. 264-267, 1996.

TÓS- LUTZ, S. A study of *Toxoplasma gondii* antigens used in the complement fixation test. **Acta Parasitologica Polonica**, v.19, n.17, p. 205-225, 1971.

VANEK, J.A., DUBEY, J.P., THULLIEZ, P., RIGGS, M.R., STROMBERG, B.E. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in hunter-killed White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in four regions of Minnesota. **Journal of Parasitology**, v.82, n.1, p. 41-44, 1996.

VAZ DE LIMA, L.R.A., HOSHINO-SHIMIZU, S., SOUZA, V.A.U.F., PANNUTI, C.S., ANDRADE JUNIOR, H.F., SUMITA, L.M., FERREIRA, A.W. Measles serodiagnosis: standardization and evaluation of a dot-ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.36, n.2, p. 139-147, 1994.

VÍTOR, R.W.A., PINTO, J.B., CHIARI, C.A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.42, n.2, p. 147-154, 1991.

VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A., FLECK, D.G., PERKINS, M., OLADEHIN, B. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. **Journal of Clinical Pathology**, v.29, p. 150-153, 1976.

WALLACH, J.D., BOEVER, W.J. **Diseases of exotic animals. Medical and surgical management**, Saunders. 1983.

YAMAMOTO, Y.I. **Toxoplasmose aguda: desenvolvimento do reagente de hemaglutinação passiva (HA-Toxo) para fins de diagnóstico**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1987. 162p. (Dissertação, Doutorado)

YAMAMOTO, Y.I., HOSHINO-SHIMIZU, S., CAMARGO, M.E. A novel IgM-indirect hemagglutination test for the serodiagnosis of acute toxoplasmosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.5, p. 127-132, 1991.

ZIMMERMAN, G.L., NELSON, M.J., CLARK, C.R.B. Diagnosis of ovine fascioliasis by a dot enzyme-linked immunosorbent assay: a rapid microdiagnostic technique. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p. 1513-1515, 1985.