



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

DEISE APARECIDA DE OLIVEIRA SILVA

**INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum*
EM CÃES E LOBOS-GUARÁ: SOROEPIDEMIOLOGIA E
IMUNODIAGNÓSTICO**

UBERLÂNDIA

2006

DEISE APARECIDA DE OLIVEIRA SILVA

**INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum*
EM CÃES E LOBOS-GUARÁ: SOROEPIDEMIOLOGIA E
IMUNODIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

S586t Silva, Deise Aparecida de Oliveira, 1954-
Infecção por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em
cães e lobos-guará: soroepidemiologia e imunodiagnóstico /
Deise Aparecida de Oliveira Silva. - Uberlândia, 2006.
142f. : il.
Orientador: José Roberto Mineo.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Doenças parasitárias - Teses. I. Mineo, José Roberto.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
III. Título.

CDU: 616.99

Ao meu pai *Nelson Garcia de Oliveira (in memorian)*,
pelo exemplo de vida, de caráter, de honestidade,
de amor e dedicação à família.

À minha mãe *Gertrudes Dacanal Garcia*,
pelo dom da vida e símbolo de fortaleza e união da nossa família.

Ao meu tio *João Batista Garcia de Oliveira*,
pelo constante incentivo, presença e apoio
em todos os momentos difíceis e importantes da minha vida.

Aos meus filhos, *Gustavo, Daniela e Breno*,
e aos meus netos, *Nathália, Guilherme e Fabiana*,
pela paciência, compreensão, carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS,

pelos dons e oportunidades que me concedeu,
pela força e coragem para continuar na luta,
pelas amizades e amores que colocou no meu caminho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo,

meu orientador e mentor científico,

por ter me acolhido, acreditado em mim e pelos valiosos ensinamentos,
amizade e apoio nos momentos decisivos.

Ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi,

meu amigo e companheiro de trabalho,

por ter me ensinado a trabalhar em equipe, com profissionalismo,
dedicação e companheirismo.

À Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza,

minha amiga e colega de trabalho de tantos anos,
pelo companheirismo, amizade, carinho e dedicação.

À Profa. Dra. Chloé C. Musatti,

pelo incentivo e estímulo que me conduziram até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. *Neide Maria da Silva*, pela amizade, dedicação, competência e oportunidade de trabalharmos na mesma equipe em prol da saúde dos animais.

Ao Prof. Dr. *Fernando Antonio Ferreira*, pelo carinho e atenção que sempre me dispensou desde o início da minha carreira e o profissionalismo na arte de cuidar dos animais.

À Profa. Dra. *Júlia Maria Costa-Cruz*, ao Prof. Dr. *Paulo Lourenço da Silva* e Prof. Dr. *Matias Pablo Juan Szabo*, pela participação da banca de qualificação e pelas valiosas sugestões e críticas ao artigo científico e projeto de pós-doutor.

À Profa. Dra. *Eloísa Amália Vieira Ferro*, pelo exemplo de profissionalismo, competência, dedicação, amizade sincera e convívio gratificante em nossos trabalhos em equipe.

À Profa. Dra. *Janethe Deolinda de Oliveira Pena*, pelo exemplo de luta, dedicação e perseverança nos seus ideais.

À Profa. Dra. *Dagmar Diniz Cabral*, pelo incentivo e participação dos primeiros trabalhos desenvolvidos nesta linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. *Rodolfo Pereira Mendes* e Profa. Dra. *Margareth Leitão Gennari-Cardoso*, pela amizade e prazerosa convivência.

Ao amigo e colega de trabalho *Tiago Wilson Patriarca Mineo*, pela oportunidade de trabalharmos juntos e acompanhar com orgulho o seu crescimento profissional.

Ao amigo e colega de trabalho *Jair Pereira Cunha-Júnior*, pela valiosa experiência de vida e profissional que me proporcionou nos últimos anos.

À amiga e colaboradora *Janaina Lobato*, pela extrema dedicação e valioso auxílio na realização de várias etapas metodológicas.

Aos amigos do grupo Apicomplexa: *Ana Cláudia, Fernando, Cristina, Janaína, Carolina, Celene, Taísa, Mônica, Bellisa, Idessânia, Mariana, Lorena, Marta, Eneida, Carla, Gabriele, Samantha*, pelo convívio e oportunidade de aprendizagem e crescimento profissional.

Aos amigos do grupo da Alergia: *Mônica, Karine, Ronaldo, Priscila, Leandro, Rafael, Gesmar, Meimei, Cristiane, Fabiana, Jorge, Sheila, Fabíola*, pelo companheirismo, amizade, dedicação e admirável demonstração de trabalho em equipe.

A todos os colegas, passados e presentes, da Pós-graduação, pelo espírito de solidariedade, companheirismo e inesquecível convivência.

Aos técnicos do Laboratório de Imunologia, *Júnior e Andréia*, pela atenção e apoio na rotina laboratorial e cuidado com os animais.

Aos secretários do Laboratório de Imunologia, *Max*, e da Pós-graduação, *Neto e Lucileide*, pela extrema dedicação, solicitude e atenção dispensadas.

Às minhas amigas de sempre, *Elizabeth, Luísa e Mara*, pelos momentos de solidariedade, apoio e confiança que só vocês sabem doar.

Às minhas irmãs *Vera e Ivana*, e a todos meus familiares, pelo convívio e apoio constantes.

A todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos animais que participaram destes estudos, com todo o respeito e dignidade, por constituir uma população selecionada de animais de sua espécie, muitas vezes privados de sua liberdade, em favor da Ciência.

RESUMO

Toxoplasma gondii e *Neospora caninum* são parasitos protozoários do filo Apicomplexa estreitamente relacionados, embora apresentem diferenças filogenéticas, ultraestruturais, antigênicas e biológicas. Estudos soroepidemiológicos têm demonstrado que a infecção por *T. gondii* é relativamente freqüente em canídeos domésticos e silvestres, enquanto a infecção por *N. caninum* é menos comum, mas tem grande importância epidemiológica porque cães e coiotes são seus hospedeiros definitivos. A presente tese é composta por cinco estudos referentes à infecção por *T. gondii* e *N. caninum* em cães (*Canis familiaris*) e lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), desenvolvidos no Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, com enfoque em soroepidemiologia e imunodiagnóstico. Diferentes preparações de antígenos destes parasitos, bem como várias modalidades de testes sorológicos, tais como hemaglutinação indireta (IHAT), imunofluorescência indireta (IFAT), imunoenzimáticos (ELISA), *immunoblotting* e imunoprecipitação foram desenvolvidos e aplicados em diversas populações de cães e lobos-guará. O primeiro estudo determinou os títulos ótimos de *cut off* em IFAT (1:16) e ELISA (1:64) para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em cães usando a curva TG-ROC (*two-graph receiver-operating characteristic*) e considerando a reatividade ao antígeno de superfície SAG1 como marcador de infecção. O segundo estudo desenvolveu um ELISA de captura IgM utilizando anticorpos heterólogos (anti-IgM humana) e revelou um perfil transitório de IgM na toxoplasmose aguda canina, enquanto a cinética de IgG anti-*T. gondii* em cães demonstrou uma resposta imune precoce e duradoura. *T. gondii* foi isolado por bioensaio e detectado por imunohistoquímica somente de cães com toxoplasmose fatal. O terceiro estudo demonstrou que a soropositividade a *N. caninum* (6,7%) foi menor que para *T. gondii* (36%) em cães com sintomas clínicos, incluindo casos de co-infecção (3,1%). O quarto estudo determinou os títulos ótimos de *cut off* em IFAT (1:50) e ELISA (1:200) para detecção de IgG anti-*N. caninum* em cães, usando a curva TG-ROC, mas ELISA mostrou baixa especificidade. Os antígenos imunodominantes de *N. caninum*, especialmente aqueles abaixo de 35 kDa, foram fracamente inibidos por antígenos de *T. gondii* em *immunoblotting* de inibição, indicando ser mais espécie-específicos. O quinto estudo demonstrou a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* no lobo-guará (8,5%), embora em menor proporção quando comparado a *T. gondii* (74,6%), utilizando conjugados homólogos (anti-IgG lobo), heterólogos (anti-IgG de cão) ou de afinidade (Proteína A), em ELISA ou IFAT. Os resultados destes estudos permitiram concluir que o diagnóstico da infecção por *T. gondii* em cães deve ser baseado na combinação de testes sorológicos, particularmente IFAT e ELISA, com ênfase na determinação dos títulos e classes de anticorpos, como IgM específica, que foi detectada pelo ELISA de captura IgM, utilizando anticorpos heterólogos. A infecção por *N. caninum* parece estar presente em cães de Uberlândia, MG e deve ser considerada no diagnóstico clínico diferencial com *T. gondii* em animais com sinais clínicos, empregando preferencialmente IFAT e *immunoblotting* para detectar antígenos imunodominantes. A ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em lobos-guará pôde ser avaliada por conjugados homólogos, heterólogos e de afinidade, indicando a relevante exposição desta espécie de canídeo silvestre a *T. gondii* e, em menor extensão, a *N. caninum*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. *Neospora caninum*. Cães. Lobos-guará. Sorodiagnóstico.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are two closely related apicomplexan parasites, even though phylogenetic, ultrastructural, antigenic and biological differences have been already described. Seroepidemiological studies have demonstrated that *T. gondii* infection is often in domestic and sylvatic canids, whereas *N. caninum* infection is less common, but it is epidemiologically relevant because dogs and coyotes are their definitive hosts. This thesis consisted of five studies on *T. gondii* and *N. caninum* infection in dogs (*Canis familiaris*) and maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) conducted in the Immunoparasitology Laboratory, Federal University of Uberlândia, with emphasis on seroepidemiology and immunodiagnosis. Different antigen preparations and various serological tests, such as indirect hemagglutination test (IHAT), indirect fluorescence antibody test (IFAT), immunoenzymatic test (ELISA), immunoblotting and immunoprecipitation were developed and employed in different dog and maned wolf populations. The first study established the optimal cut off titers in IFAT (1:16) and ELISA (1:64) for the detection of IgG antibodies to *T. gondii* in dogs by using the two-graph receiver-operating characteristic (TG-ROC) curve and considering the reactivity to the major surface antigen SAG1 as infection marker. The second study developed a capture IgM-ELISA using heterologous antibodies (anti-human IgM) and showed a transient IgM profile in canine acute toxoplasmosis, whereas the kinetics of IgG antibodies to *T. gondii* in dogs revealed an early and long-time immune response. *T. gondii* was demonstrated by mouse bioassay and immunohistochemical assay only from dogs with fatal toxoplasmosis. The third study showed that seropositivity to *N. caninum* (6.7%) was lower than to *T. gondii* (36%) in dogs with clinical symptoms, including animals with co-infection (3.1%). The fourth study established the optimal cut off titers in IFAT (1:50) and ELISA (1:200) for the detection of IgG antibodies to *N. caninum* in dogs by using TG-ROC curve, but ELISA showed low specificity. Immunodominant antigens of *N. caninum*, especially those below 35 kDa, were weakly inhibited by *T. gondii* antigens in inhibition immunoblotting, indicating that they are more species-specific antigens. The fifth study showed the occurrence of antibodies to *N. caninum* in maned wolves (8.5%), even though in lower proportion as compared to *T. gondii* (74.6%), by using homologous (anti-wolf IgG), heterologous (anti-dog IgG) or affinity (Protein A) conjugates in ELISA or IFAT. Altogether, it can be concluded that the diagnosis of *T. gondii* infection in dogs should be based on the combination of serological tests, particularly IFAT and ELISA, with emphasis in the determination of antibody titers and classes, such as specific IgM, which was efficiently detected by capture IgM-ELISA using heterologous antibodies. *N. caninum* infection can be present in dogs from Uberlândia city and should be considered in the differential clinical diagnosis with *T. gondii* in dogs presenting clinical signs, by using preferentially IFAT and immunoblotting to detect immunodominant antigens. The occurrence of antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* in maned wolves could be evaluated by homologous, heterologous and affinity conjugates, indicating a relevant exposure of this species to *T. gondii* and, in lower extension, to *N. caninum*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. *Neospora caninum*. Dogs. Maned wolves. Serodiagnosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Parasitos.....	12
1.2 Hospedeiros intermediários e definitivos.....	13
1.3 Ciclos biológicos.....	14
1.4 Transmissão.....	16
1.5 Relações filogenéticas entre parasitos do filo Apicomplexa.....	18
1.6 Características morfológicas e ultraestruturais.....	19
1.7 Linhagens de <i>T. gondii</i>	23
1.8 Isolados de <i>N. caninum</i>	24
1.9 Patogênese e interação célula-hospedeiro.....	25
1.10 Resposta imune.....	26
1.11 Sintomatologia.....	28
1.12 Diagnóstico.....	29
1.12.1 Métodos diretos.....	29
1.12.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
1.12.1.2 Imunohistoquímica (IHC).....	30
1.12.1.3 Isolamento em animais ou cultura celular.....	31
1.12.2. Métodos indiretos.....	31
1.12.2.1 Teste do corante de <i>Sabin-Feldman</i> (SFDT).....	32
1.12.2.2 Testes de aglutinação (DAT, MAT, IHAT).....	32
1.12.2.3 Teste de imunofluorescência indireta (IFAT).....	32
1.12.2.4 Testes imunoenzimáticos (ELISA).....	33
1.12.2.5 Reações de <i>immunoblotting</i>	34
1.13 Epidemiologia e soroprevalência.....	35
1.14 <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i> em canídeos silvestres.....	41
2. OBJETIVOS.....	45
2.1 Geral.....	45
2.2 Específicos.....	45
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 Animais e amostras de soros.....	46
3.2 Manutenção e obtenção de parasitos.....	47

3.3	Preparação de antígenos dos parasitos.....	48
3.3.1	Taquizoítas intactos (formolizados).....	48
3.3.2	Antígenos solúveis (sonicados).....	49
3.3.3	Antígenos totais (SDS).....	49
3.3.4	Antígenos excretados-secretados (ESA).....	49
3.4	Testes sorológicos.....	50
3.4.1	Hemaglutinação indireta (IHAT).....	50
3.4.2	Imunofluorescência indireta (IFAT).....	50
3.4.3	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	51
3.4.3.1	ELISA indireto.....	51
3.4.3.2	ELISA de captura IgM.....	52
3.4.3.3	ELISA de inibição.....	53
3.4.4	<i>Immunoblotting</i>	53
3.4.4.1	<i>Immunoblotting</i> de inibição.....	54
3.4.4.2	Imunoprecipitação.....	55
3.5	Deteção de parasitos.....	55
3.5.1	Bioensaio em camundongos.....	55
3.5.2	Imunohistoquímica.....	56
3.6	Análise estatística.....	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	Estudo I.....	60
4.2	Estudo II.....	67
4.3	Estudo III.....	85
4.4	Estudo IV.....	94
4.5	Estudo V.....	116
5.	CONCLUSÕES.....	124
	REFERÊNCIAS.....	126

1. INTRODUÇÃO

A presente tese é baseada nos seguintes artigos científicos que serão referidos durante o texto pelos seus respectivos numerais romanos:

- I. SILVA, N.M.; LOURENÇO, E.V.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R. Optimisation of cut-off titres in *Toxoplasma gondii* specific ELISA and IFAT in dog sera using immunoreactivity to SAG-1 antigen as a molecular marker of infection. **The Veterinary Journal**, v.163, n.1, p.94-98, 2002.
- II. SILVA, D.A.O.; SILVA, N.M.; MINEO, T.W.P.; PAJUABA NETO, A.A.; FERRO, E.A.V.; MINEO, J.R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.3, p.181-195, 2002.
- III. MINEO, T.W.P.; SILVA, D.A.O.; COSTA, G.H.N.; VON ANCKEN, A.C.B.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined at a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.98, n.4, p.239-245, 2001.
- IV. SILVA, D.A.O.; LOBATO, J.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Manuscrito submetido para publicação em Veterinary Parasitology**, 2006.
- V. SILVA, D.A.O.; VITALIANO, S.N.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Evaluation of homologous, heterologous and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **Journal of Parasitology**, v.91, n.5, p.1212-1216, 2005.

1.1 Parasitos

Toxoplasma gondii é um dos parasitos mais intensamente estudados, não só por ser agente causal de uma zoonose como também pela sua importância médica e veterinária, já que pode causar abortos ou infecções congênitas em seus hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

T. gondii foi identificado pela primeira vez em coelhos no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (SPLENDORE, 1908) e, no mesmo ano, em um roedor norte-africano (*Ctenodactylus gondi*) no Instituto Pasteur da Tunísia (NICOLLE; MANCEAUX, 1908). O gênero *Toxoplasma* foi introduzido em 1909 e uma única espécie *Toxoplasma gondii* tem sido identificada em vários isolados de animais e humanos. Sua classificação taxonômica o coloca no Reino Protista, Sub-Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (NEVES, 2000).

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa e subclasse Coccidia, que tem sido extensivamente estudado nos últimos anos, por causar doença neuromuscular em cães e aborto em bovinos de todo o mundo (DUBEY, 2003).

Historicamente, *N. caninum* foi primeiramente reconhecido em 1984 na Noruega, em cães com distúrbios neurológicos e soronegativos para *T. gondii* (BJÆRKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Em 1988, em um estudo retrospectivo em cortes histológicos de cães com doença fatal sugestiva de toxoplasmose, Dubey e colaboradores (1988a) encontraram um parasito semelhante, mas três características diferenciavam do quadro de toxoplasmose: (1) paralisia predominante dos membros posteriores; (2) cistos teciduais com paredes espessas (1-4 µm) e restritos a tecidos neurais; (3) testes sorológicos e imunohistoquímicos negativos para *T. gondii*. Assim, um novo gênero *Neospora* e espécie *Neospora caninum* foram propostos para este novo protozoário e, posteriormente, análises morfológicas e imunohistoquímicas dos parasitos encontrados por estes pesquisadores demonstraram ser os mesmos organismos (BJÆRKAS; DUBEY, 1991). Logo após a sua descrição, *N. caninum* foi isolado em cultura celular a partir de cistos teciduais de cães com infecção congênita (DUBEY et al., 1988b). Recentemente, uma outra espécie, *N. hughesi*, foi proposta para o parasito isolado de eqüinos, com base em diferenças antigênicas e moleculares (MARSH et al., 1998).

1. 2 Hospedeiros intermediários e definitivos

T. gondii possui uma ampla faixa de hospedeiros intermediários, incluindo o homem e várias espécies de animais, particularmente mamíferos (domésticos, silvestres e marinhos) e aves (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

N. caninum parece estar amplamente distribuído em muitos animais, embora cause doença clínica importante em bovinos e cães. Evidência direta (identificação do parasito) de infecção natural por *N. caninum* tem sido demonstrada também em carneiros, cabras, veados e cavalos. Exposição a *N. caninum* (resposta de anticorpos) tem sido relatada em búfalos e várias espécies de animais silvestres (raposas, coiotes, lobos, alpacas e camelos) (DUBEY, 2003). Infecções experimentais têm sido realizadas com êxito em bovinos, carneiros, cabras, porcos, cães, gatos, camundongos, gerbis, macacos e pombos (DUBEY et al., 2002a).

Outros possíveis hospedeiros intermediários de *N. caninum* são os humanos, levantando a questão sobre o seu potencial zoonótico. Embora não haja relatos comprovados sobre a infecção por *N. caninum* em humanos (GRAHAM et al., 1999; PETERSEN et al., 1999), evidências sorológicas de exposição ao parasito têm sido demonstradas em diferentes populações humanas (NAM; KANG; CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999; TREES; WILLIAMS, 2000). Mais recentemente, o nosso grupo demonstrou uma maior soropositividade a *N. caninum* em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e com distúrbios neurológicos quando comparado a indivíduos saudáveis, aludindo novas questões sobre o papel de *N. caninum* em pacientes imunocomprometidos (LOBATO et al., 2006).

O hospedeiro definitivo de *T. gondii* foi descoberto somente após 60 anos da descrição dos estágios assexuados em hospedeiros intermediários, pela demonstração de oocistos nas fezes de gatos e a descoberta de estágios sexuais no intestino delgado de felídeos (HUTCHISON, 1965).

A estreita relação de *N. caninum* com *T. gondii* levou à suspeita inicial de um hospedeiro definitivo carnívoro para *N. caninum*. Além disso, estudos epidemiológicos indicavam uma associação entre a presença de cães e o risco de aborto ou infecções neonatais por *N. caninum* em bovinos (PARÉ et al., 1998; WOUDA et al., 1999). Em 1998, após 10 anos de sua descrição, foi descoberto o seu hospedeiro definitivo, pela demonstração de oocistos nas fezes de cães alimentados com cistos teciduais de camundongos experimentalmente infectados com *N. caninum* (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999). Embora cães tenham sido reconhecidos como hospedeiros definitivos de *N. caninum* em infecção experimental, até o momento somente três casos de

eliminação de oocistos em cães naturalmente infectados foram relatados: na Argentina (BASSO et al., 2001a), na República Tcheca (SLAPETA et al., 2002) e na Inglaterra (McGARRY et al., 2003). Mais recentemente, coiotes (*Canis latrans*) foram considerados como um hospedeiro definitivo adicional de *N. caninum* (GONDIM et al., 2004a) e é possível que outros canídeos silvestres possam exercer o papel de hospedeiros definitivos para *N. caninum*.

1.3 Ciclos biológicos

T. gondii e *N. caninum* têm ciclos biológicos heteroxenos alternando entre hospedeiros definitivos (replicação sexuada) e intermediários (replicação assexuada). A fase assexuada de ambos parasitos ocorre em uma ampla faixa de hospedeiros intermediários herbívoros ou onívoros (mamíferos domésticos e silvestres), enquanto a fase sexuada é limitada a hospedeiros definitivos carnívoros, membros da família de felídeos (principalmente o gato) para *T. gondii* e de canídeos (cão e coiote) para *N. caninum* (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; GONDIM et al., 2004a).

O ciclo de vida de ambos parasitos (Figura 1) é complexo e envolve três formas infecciosas: taquizoítas (livres ou em grupos), bradizoítas (em cistos teciduais) e esporozoítas (em oocistos).

Taquizoítas e cistos teciduais são encontrados em hospedeiros intermediários, onde ocorrem duas fases de desenvolvimento assexuado: na primeira fase, taquizoítas invadem as células e se multiplicam rapidamente por endodiogenia, levando à formação de pseudocistos que se rompem e liberam taquizoítas que disseminam para vários tecidos (sistema nervoso central, olho, músculos esquelético e cardíaco). Os taquizoítas causam uma forte resposta inflamatória e destruição de tecidos e são responsáveis pela manifestação clínica da doença (fase aguda). Sob a pressão da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítas se transformam em bradizoítas que iniciam a segunda fase de desenvolvimento assexuado (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Bradizoítas se multiplicam lentamente por endodiogenia e vão formar os cistos teciduais intracelulares, predominantemente em tecidos neurais e musculares, podendo persistir por toda a vida do hospedeiro (fase crônica), embora possa ocorrer uma baixa taxa de reativação espontânea. Quando ingeridos por hospedeiros definitivos, a parede dos cistos é digerida por enzimas proteolíticas, liberando bradizoítas que invadem células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento da fase assexuada (esquizogonia) com formação de

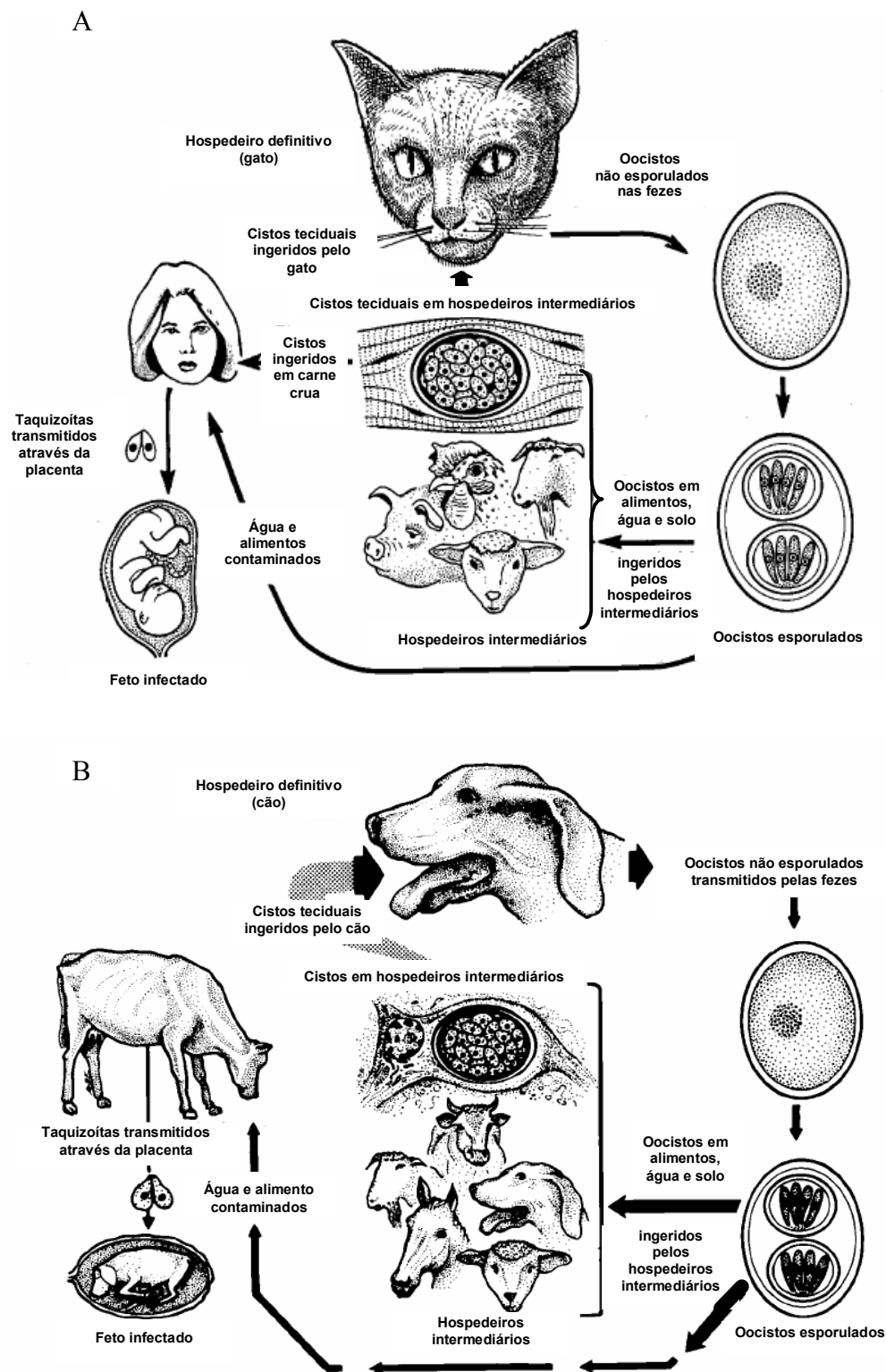


Figura 1. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* (A) e *Neospora caninum* (B).
 Fonte: (A) Dubey, Lindsay e Speer (1998); (B) Dubey (2003).

esquizontes e liberação de merozoítas, os quais iniciam a fase sexuada (gamogonia) com a produção final de oocistos não esporulados (imaturos ou não infecciosos) que são eliminados com as fezes. No ambiente, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia entre 1 e 5 dias, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados (infecciosos) que podem permanecer viáveis no solo por longo tempo (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Após a ingestão de oocistos esporulados por hospedeiros intermediários, os esporozoítas são liberados no trato digestivo e invadem as células do epitélio intestinal, fibroblastos e leucócitos, multiplicando-se como taquizoítas que disseminam por todo o organismo. Após alguns ciclos de multiplicação, taquizoítas dão origem a bradizoítas e formam novos cistos teciduais (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Comparado a *T. gondii*, cujo ciclo de vida já está bem descrito e elucidado, muitos aspectos do ciclo biológico de *N. caninum* não estão completamente descritos, incluindo os estágios entero-epiteliais (esquizontes e gametas) no hospedeiro definitivo antes da formação do oocisto e sua sobrevivência no meio ambiente (DUBEY, 2003).

1.4 Transmissão

As três formas de *T. gondii* (taquizoítas, bradizoítas em cistos teciduais e esporozoítas em oocistos esporulados) são infecciosas tanto para hospedeiros intermediários como definitivos, que podem adquirir a infecção pelas seguintes vias de transmissão:

- (1) ingestão de cistos encontrados em carne crua ou mal cozida (principalmente de porco e carneiro);
- (2) ingestão de oocistos através da contaminação de água e alimentos ou disseminados por vetores mecânicos (cães, moscas, baratas, ratos);
- (3) transferência transplacentária de taquizoítas (transmissão vertical) principalmente na fase aguda da doença;
- (4) ingestão ou contato com taquizoítas viáveis presentes em secreções (saliva, urina, colostro, leite, espermatozoides) ou órgãos transplantados e acidentes laboratoriais;

A transmissão mecânica de oocistos de *T. gondii* por cães tem levantado um papel para os cães como potencial fator de risco para infecção em humanos (FRENKEL; PARKER, 1996; LINDSAY et al., 1997). Recentemente, oocistos de *T. gondii* foram isolados das fezes de cães em condições naturais, mostrando que cães podem ingerir oocistos por coprofagia e servir como vetores mecânicos para *T. gondii*, representando assim um potencial risco de transmissão para outras espécies (SCHARES et al., 2005).

Para *N. caninum*, pouco é conhecido sobre as rotas naturais de transmissão bem como o desenvolvimento e modo de distribuição nos tecidos animais (DUBEY, 1999).

A transmissão vertical tem sido demonstrada em vários hospedeiros (bovinos, carneiros, cabras, cães, gatos, camundongos, macacos e porcos) e é o principal modo de transmissão em bovinos. O parasito é transmitido da mãe para o feto via placenta durante sucessivas gestações, contribuindo significativamente para a persistência da infecção no rebanho. Desta forma, os termos “vertical, congênita e transplacentária” têm sido considerados inadequados para descrever duas situações extremamente diversas. Uma delas refere-se à transmissão fetal que ocorre como resultado de infecção materna durante a gestação, sendo definida como infecção transplacentária exógena. A outra situação refere-se à transmissão fetal que ocorre após reativação de infecção materna pré-natal, sendo caracterizada como uma infecção transplacentária endógena (TREES; WILLIAMS, 2005). O primeiro modo de transmissão (exógena) é o mais freqüentemente observado para *T. gondii* em humanos e animais, enquanto o segundo modo de transmissão (endógena) é mais raro, sendo encontrado apenas em alguns roedores, com sucessivas gerações de animais infectados (BEVERLEY, 1959).

A transmissão horizontal pode ocorrer pela ingestão de cistos teciduais (cérebro, medula espinhal, coração e músculos) ou pela ingestão de oocistos, através de água ou alimento contaminados. A transmissão heteroxena cíclica de *N. caninum* tem sido comprovada experimentalmente entre cães e vários hospedeiros intermediários (cabras, carneiros, gerbis, cobaias, ratos e camundongos) (SCHARES et al., 2001a). A transmissão cíclica de *N. caninum* entre cães e bovinos foi também demonstrada pela administração oral de oocistos a bovinos e a subsequente administração de tecidos dos bovinos infectados a cães, com nova eliminação de oocistos, e assim sucessivamente (GONDIM; GAO; McALLISTER, 2002).

A eliminação de oocistos de *N. caninum* por cães infectados experimentalmente ocorre após 6-9 dias da infecção (período pré-patente) por 7-19 dias (período patente) (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999). Entretanto, em um cão naturalmente infectado, McGarry e colaboradores (2003) relataram a eliminação de oocistos de *N. caninum* por um tempo relativamente longo (até 4 meses), quando comparado a um período de 1 a 2 semanas de eliminação de oocistos de *T. gondii* por gatos, após infecção primária (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Além disso, os efeitos de uma exposição prévia a *N. caninum* sobre a re-eliminação de oocistos após re-infecção foram recentemente investigados, demonstrando que os cães podem tornar-se refratários em eliminar oocistos entre 8 e 18 meses após uma infecção primária (GONDIM; McALLISTER; GAO, 2005).

É importante ressaltar que um baixo número de oocistos de *N. caninum* tem sido encontrado em fezes de cão naturalmente (BASSO et al., 2001a; McGARRY et al., 2003) ou mesmo experimentalmente (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999; GONDIM; GAO; McALLISTER, 2002) infectados, em comparação aos vários milhões de oocistos de *T. gondii* eliminados por gatos após infecção primária (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Um dos fatores que pode influenciar sobre a produção de oocistos de *N. caninum* pode ser a fonte de infecção. Assim, cães alimentados com tecidos de bovinos (hospedeiros intermediários naturais) infectados produziram significativamente um maior número de oocistos que aqueles alimentados com tecidos de camundongos infectados, que atuariam como hospedeiros intermediários menos eficientes (GONDIM; GAO; McALLISTER, 2002). Por outro lado, Dijkstra e colaboradores (2001) demonstraram que cães eliminam oocistos de *N. caninum* após a ingestão de placenta de bovinos naturalmente infectados, mas não de colostro bovino adicionado de taquizoítas de *N. caninum*, concluindo que a placenta de bovinos infectados constitui na principal fonte de infecção natural para cães de áreas rurais. Recentemente, a idade dos cães mostrou ser um outro fator interferente na produção de oocistos de *N. caninum*, uma vez que cães jovens eliminaram significativamente mais oocistos que os adultos, após infecção primária (GONDIM; McALLISTER; GAO, 2005).

1.5 Relações filogenéticas entre parasitos do filo Apicomplexa

Técnicas moleculares utilizando DNA ou RNA ribossomal (rDNA ou rRNA) têm sido amplamente utilizadas em estudos filogenéticos para inferir relações entre organismos estreitamente relacionados. Assim, regiões selecionadas do rDNA ou rRNA, tais como seqüências da grande subunidade (LSU) ou pequena subunidade (SSU) ou ainda do espaçador 1 do transcrito interno (ITS1) que apresenta maior variabilidade que as seqüências LSU e SSU, têm possibilitado a distinção entre os gêneros estreitamente relacionados *Toxoplasma*, *Neospora* e *Hammondia* (DUBEY et al., 2002a).

Em análises filogenéticas baseadas nas seqüências do rRNA-LSU, Mugridge e colaboradores (1999) mostraram que as duas espécies de *Hammondia* (*H. hammondi* e *H. heydorni*) são parafiléticas e que *N. caninum* forma um clado monofilético com *H. heydorni* e não com *T. gondii*, que por sua vez, foi mais intimamente relacionado com *H. hammondi*. Mais recentemente, Su e colaboradores (2003) demonstraram que os gêneros *Toxoplasma*, *Neospora* e *Hammondia* formam uma tríade intimamente relacionada e o ancestral comum mais recente destes parasitos foi estimado ter uma idade relativa de 12 milhões de anos (Fig.

2A). Análises de polimorfismo genético baseado nas regiões do ITS1-rDNA, claramente separaram *N. caninum* de *T. gondii*, reforçando as origens monofiléticas de *H. hammondi* e *T. gondii* bem como de *H. heydorni* e *N. caninum* (Fig. 2B). Analisando-se a co-evolução com hospedeiros definitivos, vale destacar que cães são hospedeiros definitivos de *Neospora caninum* (patogênico) e *Hammondia heydorni* (não-patogênico), cujos oocistos são pequenos (10-13 μm) e morfologicamente indistinguíveis, tornando praticamente impossível o diagnóstico coprológico. Um problema similar ocorre com gatos que são hospedeiros definitivos de *T. gondii* (patogênico) e *H. hammondi* (não-patogênico). Neste contexto, características do ciclo de vida como a co-evolução com hospedeiros definitivos reforçam a íntima relação filogenética entre *T. gondii* e *H. hammondi* (hospedeiros definitivos felídeos) bem como entre *N. caninum* e *H. heydorni* (hospedeiros definitivos canídeos) (Fig. 2C) (SU et al., 2003).

1.6 Características morfológicas e ultraestruturais

As três formas infecciosas (taquizoítas livres ou em grupos, bradizoítas em cistos teciduais e esporozoítas em oocistos) de *T. gondii* e *N. caninum* são muito semelhantes à microscopia óptica comum, mas podem ser diferenciadas com base em certas características ultraestruturais.

Taquizoítas: apresentam forma de meia-lua e representam os estágios de multiplicação rápida dentro de vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos. Taquizoítas de *T. gondii* (6,8 x 1,5-3 μm) são ligeiramente menores que aqueles de *N. caninum* (7,5 x 2 μm) (SPEER et al., 1999). Possuem uma película externa consistindo de uma membrana externa contínua (plasmalema) e duas membranas internas incompletas. Na extremidade anterior ou apical, situa-se o conóide composto por anéis de microtúbulos (anéis apicais 1 e 2 e anéis polares 1 e 2). O citoesqueleto subpelicular é composto por 22 microtúbulos que se dispõem de maneira espiral sob o complexo da membrana interna e se estendem do anel polar até a extremidade posterior do parasito, o que lhe confere a motilidade (Fig. 3A) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Possuem também várias organelas secretórias como roptrias, micronemas e grânulos densos. As roptrias de *N. caninum* são mais numerosas (6 a 16) e homogeneamente elétrondensas que as de *T. gondii* (4 a 10; translúcidas) e são localizadas principalmente anterior ao núcleo. As micronemas são mais numerosas em taquizoítas de *N. caninum* que de *T. gondii*, predominantemente na extremidade anterior. Os grânulos densos encontram-se dispersos por todo o citoplasma em taquizoítas de ambos parasitos, mas são mais numerosos na extremidade posterior de *N. caninum* e na extremidade anterior de *T. gondii*.

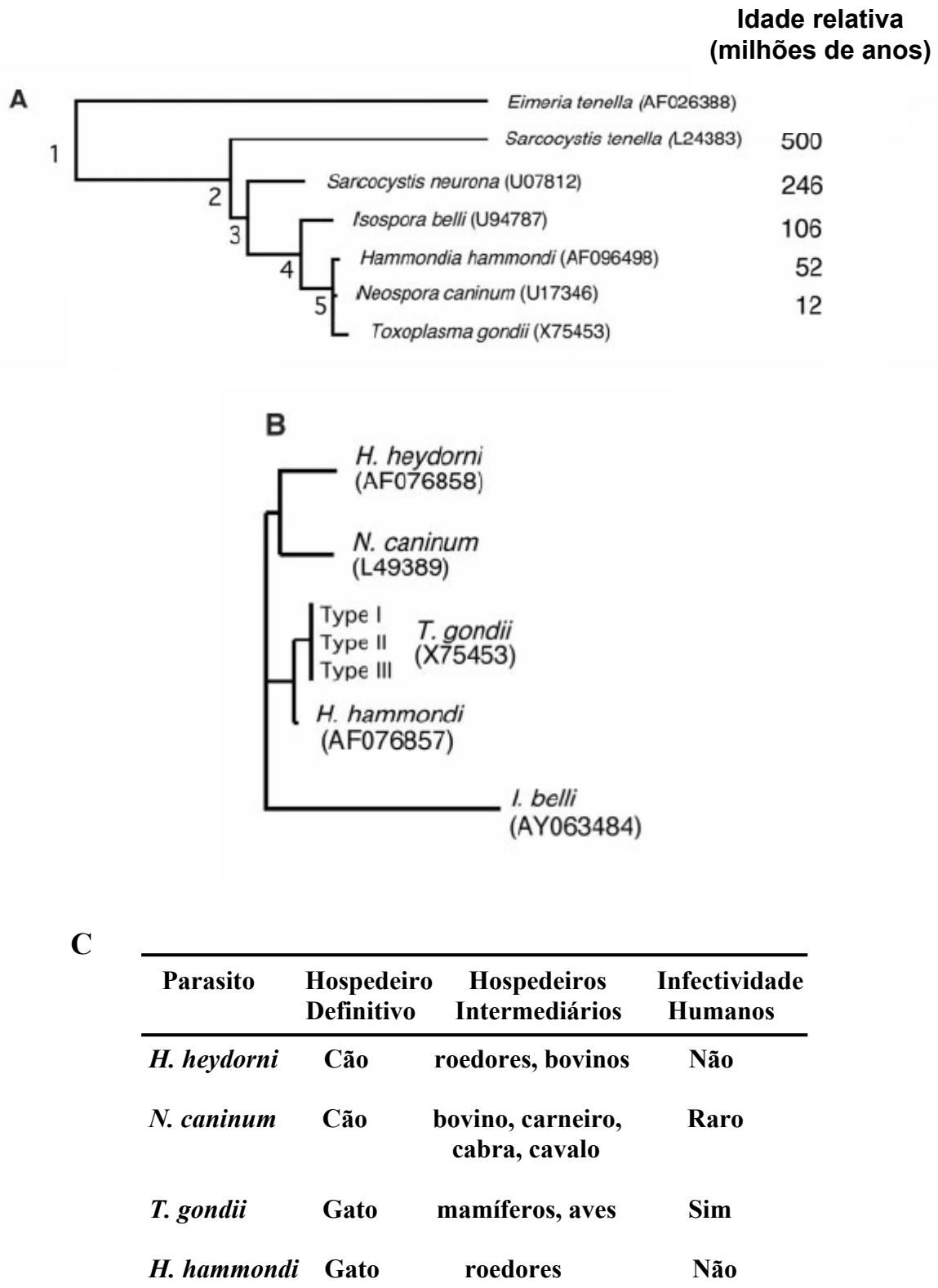


Figura 2. Comparação filogenética entre parasitos do filo Apicomplexa baseada em sequências SSU (A) e ITS1 (B) do DNA ribossomal. Ciclos de vida e características de transmissão entre parasitos Apicomplexa (C). Fonte: Modificado de SU e colaboradores (2003).

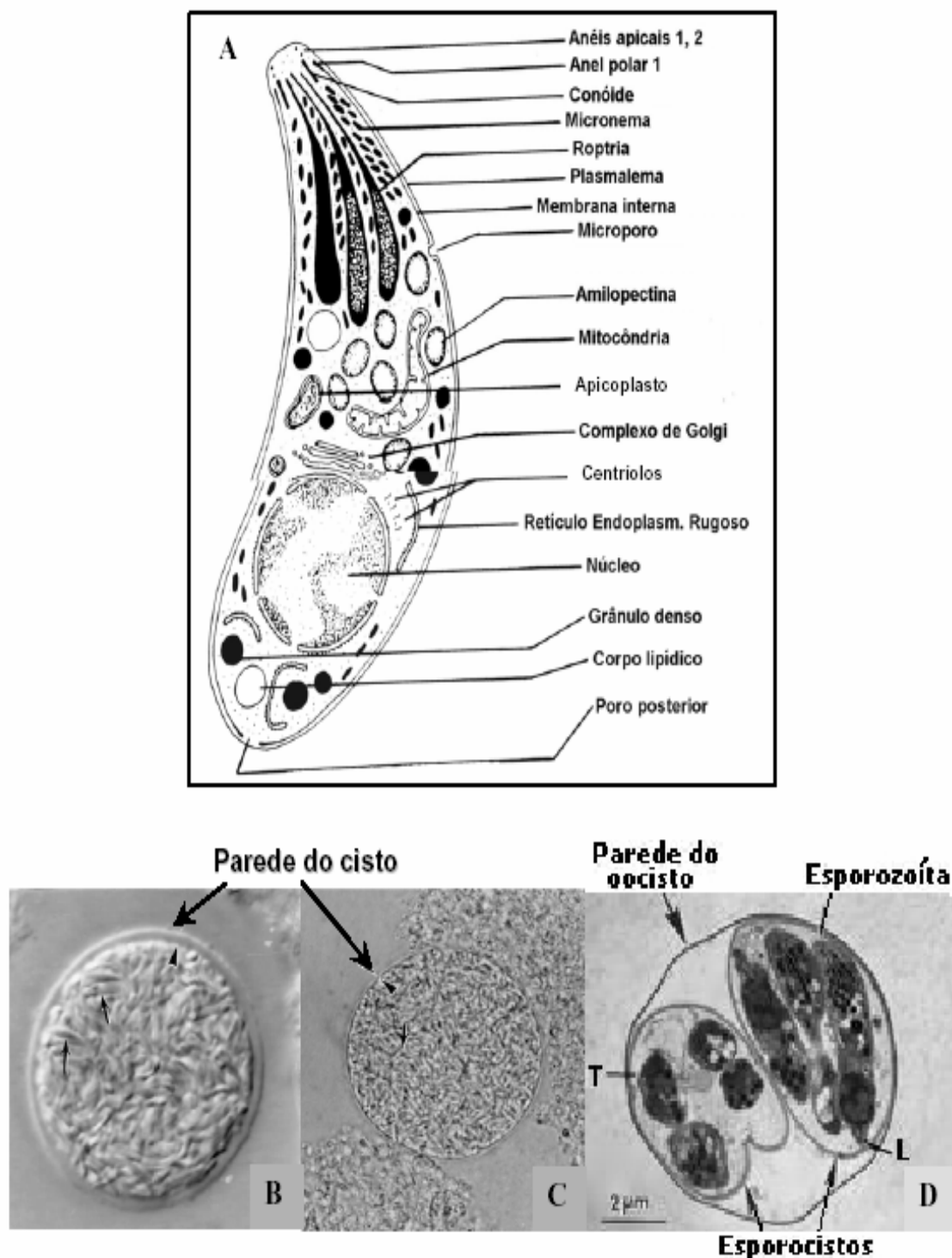


Figura 3. Formas evolutivas de *T. gondii* e *N. caninum*. (A) Desenho esquemático de taquizoítas de *T. gondii* ou *N. caninum*; Cisto tecidual contendo vários bradizoítas de *N. caninum* (B) e *T. gondii* (C); (D) Oocisto contendo dois esporocistos, um em corte transversal (T) e outro em corte longitudinal (L). Fonte: Dubey, Lindsay e Speer (1998); Dubey e colaboradores (2002a).

Microporos são comumente observados em *T. gondii*, mas são raros em *N. caninum*. Várias outras organelas e corpos de inclusão característicos de parasitos coccídeos também estão presentes em ambos parasitos, tais como mitocôndrias, aparelho de Golgi, apicoplasto, retículo endoplasmático, grânulos de amilopectina, corpos lipídicos e núcleo localizado na porção central (SPEER et al., 1999).

Bradizoítas: são morfologicamente idênticos aos taquizoítas, mas funcionalmente diferentes, pois se multiplicam mais lentamente e expressam moléculas específicas ao estágio. As principais diferenças entre taquizoítas e bradizoítas são relacionadas à posição do núcleo (próximo à extremidade posterior nos bradizoítas e mais centralizado nos taquizoítas), maior número de roptrias nos taquizoítas, predominância de grânulos de amilopectina nos bradizoítas e maior resistência dos bradizoítas às enzimas proteolíticas (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Bradizoítas de *T. gondii* (7,5 x 2,5 µm) são ligeiramente menores que aqueles de *N. caninum* (8,1 x 2 µm). Roptrias de bradizoítas de *N. caninum* são sempre elétron-densas e predominam na extremidade anterior (6-12), enquanto as de *T. gondii* são translúcidas em cistos jovens e elétron-densas em cistos maduros (6-8), sendo raras na extremidade posterior do parasito. Micronemas são abundantes na extremidade anterior de ambos parasitos e grânulos densos posteriores são mais encontrados em *N. caninum* (SPEER et al., 1999).

Cistos de *T. gondii* podem ser encontrados em muitos tecidos, mas principalmente em tecidos neurais e musculares, enquanto cistos de *N. caninum* são encontrados primariamente no SNC, embora há relatos de cistos em músculos de cães e bovinos naturalmente infectados (PETERS et al., 2001; DUBEY et al., 2004a), mas não em animais experimentalmente infectados (DUBEY et al., 2002a). O tamanho dos cistos é muito variável, dependendo do número de bradizoítas no cisto, de sua forma e tecido onde se encontram. Cistos de *T. gondii* são geralmente maiores que os de *N. caninum* (contendo 50-500 versus 20-100 bradizoítas, respectivamente) e a parede dos cistos é lisa e fina (< 0,5 µm) em *T. gondii* e irregular e mais espessa (0,5-4 µm) em *N. caninum* (Fig. 3B), embora cistos de parede fina (< 0,5-0,7 µm) tenham sido encontrados recentemente em tecidos musculares de cães naturalmente infectados (DUBEY et al., 2004a). O interior dos cistos teciduais de ambas espécies não é separado em compartimentos por septos (SPEER et al., 1999).

Esporozoítas: são morfologicamente semelhantes aos taquizoítas, porém apresentam micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina mais abundantes que os últimos, e estão contidos em esporocistos dentro de oocistos (Fig. 3C). Oocistos não esporulados de *T. gondii* (10 x 12 µm) e *N. caninum* (11.7 x 11.3 µm) são esféricos e a parede dos oocistos (0,6-0,8 µm

espessura) consiste de duas camadas incolores. A esporulação ocorre no ambiente dentro de 1 a 5 dias, dependendo das condições de aeração e temperatura. Oocistos esporulados de ambos parasitos são subesféricos (11 x 13 μm) e contêm 2 esporocistos elipsóides (8 x 6 μm) e cada esporocisto contém quatro esporozoítas (6-8 x 2 μm) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY et al., 2002a).

1.7 Linhagens de *T. gondii*

T. gondii apresenta uma estrutura populacional altamente clonal, compreendendo três genótipos designados como tipo I, tipo II e tipo III (HOWE; SIBLEY, 1995). As três linhagens clonais de *T. gondii* são altamente similares com raros polimorfismos (1-2%) na sequência de genes individuais. Linhagens recombinantes (atípicas ou exóticas) são ainda mais raras, representando menos de 5% dos isolados de *T. gondii* até agora caracterizados (SU et al., 2003). Entretanto, estas linhagens diferem quanto à virulência em camundongos e ocorrência em uma espécie animal particular em diferentes regiões do mundo. Assim, as linhagens do tipo I (protótipo RH) são extremamente virulentas para camundongos enquanto as do tipo II (ME49 e seus derivados) são avirulentas. As linhagens do tipo III são consideradas moderadamente virulentas (CEP e VEG) (HOWE; SIBLEY, 1995). Estas variações de virulência entre as diferentes linhagens de *T. gondii* sugerem que o genótipo do parasito possa influenciar na severidade da doença.

Geralmente, as linhagens do tipo II de *T. gondii* predominam em infecções humanas enquanto a maioria das linhagens isoladas de animais é do tipo III (HOWE; SIBLEY, 1995). Entretanto, um recente estudo demonstrou que parece haver uma predominância (94%) de isolados de *T. gondii* tipo I circulando tanto em humanos como em animais (gatos, aves, cobaias) da América do Sul (GALLEGO; SAAVEDRA-MATIZ; GOMEZ-MARIN, 2006). Estes resultados confirmam os achados anteriores de vários outros estudos em gatos (DUBEY et al., 2004b; PENA et al., 2006) e galinhas caipiras (DUBEY et al., 2002b, 2003a,b,c, 2005a) da América do Sul, mostrando a predominância dos tipos I e III e ausência do tipo II, em contraste à predominância do tipo II em outros países da América do Norte. Vale destacar que muitos isolados do tipo III de *T. gondii* da América do Sul, particularmente do Brasil e Colômbia, são virulentos para camundongos, sendo portanto, fenotipicamente diferentes daqueles encontradas em outras partes do mundo (DUBEY et al., 2005b,c).

Recentemente, foi relatada a primeira descrição dos genótipos de *T. gondii* isolados de cães com sinais neurológicos no Brasil (da SILVA et al., 2005), com a identificação de 9 isolados de 34 amostras de cérebro (4 do tipo I e 5 do tipo III). Todos os isolados foram

virulentos para camundongos, com a mortalidade ocorrendo em menos de 20 dias. Assim, as características biológicas e moleculares destes genótipos tipo III isolados de animais da América do sul parecem ser diferentes daqueles de outras partes do mundo e necessita de maior avaliação em diferentes hospedeiros.

1.8 Isolados de *N. caninum*

Até o presente momento, 19 isolados de *N. caninum* foram obtidos de cães naturalmente infectados (Quadro 1), sendo a maioria proveniente de cistos teciduais (principalmente tecidos neurais). Um deles foi isolado no Brasil (NC-Bahia), a partir do cérebro de um cão naturalmente infectado com sinais neurológicos, apresentando encefalite não-supurativa e cistos cerebrais com parede espessa e fortemente corados por imunohistoquímica. O parasito foi isolado em gerbil (*Meriones unguiculatus*) e cultura celular, e posteriormente, confirmado por técnicas moleculares (GONDIM et al., 2001).

Entretanto, o papel dos cães como hospedeiro definitivo natural de *N. caninum* foi demonstrado, pela primeira vez, através do isolamento do parasito (NC-6-Argentina) a partir de oocistos encontrados nas fezes de um cão naturalmente infectado (BASSO et al., 2001a). Em seguida, outro isolado (CZ-4) foi obtido a partir de oocistos de um cão naturalmente infectado na República Tcheca (SLAPETA et al., 2002). Recentemente, 5 novos isolados (NC-GER2, NC-GER3, NC-GER4, NC-GER5, NC-GER6) foram obtidos a partir de oocistos de cães naturalmente infectados na Alemanha (SCHARES et al., 2005).

Pouco é conhecido sobre a diversidade genética e biológica de *N. caninum*, mas uma análise comparativa entre diferentes isolados mostrou que existe heterogeneidade dentro da espécie, particularmente com relação à taxa de crescimento *in vitro*, mas não em relação ao perfil antigênico (SCHOCK et al., 2001). Recentemente, Gondim e colaboradores (2004b) investigaram variações na sequência ITS1 de diferentes isolados de *N. caninum*, mostrando que variações dentro dos isolados podem ocorrer e que o isolado NC-Bahia apresenta diferenças em vários pares de bases em relação aos isolados da América do Norte e Europa. Comparativamente, duas linhagens de *T. gondii* (RH e ME49) não mostraram variações na sequência ITS1, confirmando que variações intra-linhagens não são comuns em *T. gondii*.

Quadro 1. Isolados reconhecidos de *Neospora caninum* em cães.

Designação	País	Fonte	Referência
NC-1	Estados Unidos	cistos (tecidos neurais)	Dubey et al., 1988b
NC-2	Estados Unidos	cistos teciduais	Hay et al., 1990
NC-3	Estados Unidos	cistos teciduais	Cuddon et al., 1992
NC-liv	Inglaterra	cistos teciduais	Barber et al., 1995
NC-4	Estados Unidos	cistos teciduais	Dubey et al., 1998
NC-5	Estados Unidos	cistos teciduais	Dubey et al., 1998
CN-1	Estados Unidos		Marsh et al., 1998
NC-GER1	Alemanha	cistos teciduais	Peters et al., 2000
NC-Bahia	Brasil	cistos teciduais	Gondim et al., 2001
NC-6-Argentina	Argentina	oocistos (fezes)	Basso et al., 2001a
CZ-4	República Tcheca	oocistos (fezes)	Slapeta et al., 2002
NC-6	Estados Unidos	cistos (cérebro)	Dubey et al., 2004a
NC-7	Estados Unidos	cistos (cérebro)	Dubey et al., 2004a
NC-8	Estados Unidos	cistos (cérebro)	Dubey et al., 2004a
NC-GER2	Alemanha	oocistos	Schares et al., 2005
NC-GER3	Alemanha	oocistos	Schares et al., 2005
NC-GER4	Alemanha	oocistos	Schares et al., 2005
NC-GER5	Alemanha	oocistos	Schares et al., 2005
NC-GER6	Alemanha	oocistos	Schares et al., 2005

Fonte: Modificado de Dubey, 2003.

1.9 Patogênese e interação célula-hospedeiro

Na patogênese de toxoplasmose e neosporose, a invasão celular é o principal evento de processos complexos e muito semelhantes entre os parasitos do filo Apicomplexa, envolvendo receptores de superfície da célula do hospedeiro e uma série de proteínas que são liberadas consecutivamente de micronemas, roptrias e grânulos densos (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002). Desta forma, a invasão celular pode ser resumida em três etapas:

- a) A adesão inicial dos parasitos à célula hospedeira ocorre sem qualquer orientação e envolve antígenos de superfície imunodominantes dos parasitos. Após a adesão inicial, os parasitos reorientam-se de modo que a extremidade anterior se posiciona para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula do hospedeiro para formar o vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas dos parasitos são secretadas. Entre elas,

as adesinas secretadas de micronemas são responsáveis pela espessa zona de adesão e formação da junção de movimento, que juntamente com o citoesqueleto do parasito, força-o para dentro do VP. A membrana plasmática do hospedeiro é também usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), resultando em um vacúolo que não se funde com lisossomos.

- b) Em sequência, proteínas de roptrias são liberadas dentro do VP e estendem a MVP para formar associação com organelas do hospedeiro, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao VP.
- c) Proteínas de grânulos densos modificam a MVP e contribuem para a remodelação e maturação do vacúolo parasitóforo com a formação de uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento do parasito.

Dois antígenos de superfície (SAG1 e SRS2) principais e várias proteínas secretórias têm sido identificados e associados com a invasão celular, e são considerados proteínas homólogas entre *T. gondii* e *N. caninum*. Assim, proteínas de micronemas (MIC), roptrias (ROP), grânulos densos (GRA) e antígenos de superfície (SAG ou SRS) são adicionadas de um prefixo Tg (para *T. gondii*) ou Nc (para *N. caninum*) e numeradas de acordo com a sua descrição (TgSAG1 e NcSAG1).

1.10 Resposta imune

A resposta imune a *T. gondii* já está bem estabelecida comparativamente a *N. caninum*. Como parasitos intracelulares obrigatórios, a resposta imune protetora é fundamentalmente mediada por células, mas a resposta imune humoral participa diretamente na neutralização e destruição de taquizoítas extracelulares e assim, controla a disseminação da infecção (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; INNES et al., 2002).

Anticorpos IgM específicos são indicativos de infecção recente e não de re-infecção, podendo ser detectados logo nos primeiros 7 dias após a infecção, alcançam títulos máximos entre 15 e 30 dias e gradualmente declinam, mas podem persistir por longos períodos (9-12 meses). A presença de anticorpos IgM em recém-nascidos é indicativa de infecção congênita (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Anticorpos IgG específicos aparecem dentro de 1 a 2 semanas após a infecção, atingindo títulos máximos em aproximadamente 6 semanas e declinando gradualmente, mas podem permanecer em baixos títulos indefinidamente. Em infecções recentes, anticorpos IgG estão presentes mas apresentam baixa avidéz para os antígenos correspondentes. Com o transcorrer da infecção e a maturação da resposta imune, anticorpos IgG vão apresentando avidéz crescente de modo que nas infecções de longa

duração encontra-se um predomínio marcante de anticorpos IgG de alta avidéz (CAMARGO et al., 1991). Assim, enquanto anticorpos IgG específicos de baixa avidéz nem sempre identificam uma infecção recente, anticorpos IgG de alta avidéz têm sido considerados úteis marcadores para excluir infecções primárias (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

A imunidade mediada por células é o mais importante mecanismo na regulação da infecção por *T. gondii*, com a participação das células T CD4⁺, T CD8⁺, macrófagos e células *natural killer* (NK). Durante a infecção aguda, IL-12 é produzida por macrófagos infectados e estimula células NK a produzirem IFN- γ , induzindo a diferenciação de células T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ , que são críticos para a sobrevivência do hospedeiro. Células T CD8⁺ contribuem para controlar as infecções agudas devido à produção de IFN- γ e ativação de macrófagos. Células infectadas são destruídas por células T CD8⁺ liberando taquizoítas, que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos (anticorpos, macrófagos ativados e células NK). Assim, a formação de cistos é dependente primariamente de mecanismos imunes mediados por IFN- γ (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

IFN- γ representa o principal mediador de resistência a *T. gondii* através da ativação de macrófagos, os quais inibem a replicação de parasitos pela produção de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio que promovem a inativação de enzimas críticas para replicação do parasito. Outra citocina importante na regulação da resposta imune celular a *T. gondii* é a IL-10, que tem efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- γ , a diferenciação de clones Th1, a produção de IFN- γ por células NK e células T CD4⁺ e CD8⁺ e a produção de IL-12 por células acessórias. Em modelos experimentais, Gazzinelli e colaboradores (1996) demonstraram que camundongos deficientes de IL-10 apresentaram lesões hepáticas exacerbadas e mortalidade acelerada em consequência de excessivas produções de IL-12 e IFN- γ resultando em imunopatologia. Assim, a regulação negativa induzida por IL-10 na infecção aguda por *T. gondii* é importante para a sobrevivência do hospedeiro.

Em relação a *N. caninum*, pouco se sabe sobre a cinética da resposta imune em animais naturalmente infectados. Há pouca informação sobre a produção de anticorpos IgM específicos tanto em animais com infecção congênita como em infecção pós-natal. Em infecção experimental com tecidos de bovinos infectados com *N. caninum*, os cães parecem não desenvolver respostas de anticorpo dentro das primeiras 3 a 4 semanas após infecção (GONDIM; GAO; McALLISTER, 2002). A imunidade resultante de uma única exposição pode durar mais que 8 meses, como demonstrada pela não eliminação de oocistos após re-

exposição. Entretanto, após 18 e 20 meses da infecção primária, a re-exposição induz nova eliminação de oocistos, mesmo na presença de um alto título de anticorpo (1:1600), indicando que a resposta imune humoral por si não assegura que um cão seja refratário à produção de oocistos (GONDIM; McALLISTER; GAO, 2005).

1.11 Sintomatologia

Infecções por *T. gondii* são primariamente assintomáticas e crônicas em cães adultos. Infecções mais graves podem ser vistas em fetos congenitamente infectados, cães jovens com sistema imune ainda imaturo ou ainda associada com infecções concomitantes como o vírus da cinomose canina (RHYAN; DUBEY, 1992).

Os sinais clínicos são variáveis e não-específicos, e dependem da idade, da presença de infecções concomitantes, da severidade da infecção e dos órgãos afetados. As manifestações clínicas mais freqüentes são caracterizadas por distúrbios respiratórios, gastrointestinais e neuromusculares, mas pode haver infecção generalizada, com o envolvimento de vários órgãos, principalmente fígado, baço, pulmão, coração, rins e cérebro. Sinais neurológicos variam de acordo com a localização das lesões e se caracterizam por ataxia, alterações do comportamento, convulsões, tremores, paresias e paralisias progressivas. Achados histopatológicos incluem áreas necróticas focais no pulmão, fígado e cérebro dos cães infectados (DUBEY, 1985). Toxoplasmose fatal e generalizada tem sido atribuída a fatores de imunossupressão como terapia com corticosteróides ou infecções com o vírus da cinomose canina. Recentemente, um caso de toxoplasmose disseminada com manifestações cutâneas foi relatado em um cão sob terapia imunossupressora (WEBB et al., 2005). Casos de toxoplasmose cutânea são raros e associados à imunossupressão, e devem ser submetidos ao diagnóstico diferencial com neosporose cutânea.

Infecções por *N. caninum* em cães também podem ser clínicas ou subclínicas, embora a proporção da doença clínica seja muito baixa e a maioria dos casos ocorre em animais jovens infectados congenitamente (DUBEY, 1999).

Neosporose clínica pode ser localizada ou generalizada, com o envolvimento de todos os órgãos, inclusive da pele causando a neosporose cutânea (PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002). Uma característica nestes casos é o intenso parasitismo com um grande número de taquizoítas nas lesões cutâneas, sugerindo uma falta de controle imune do hospedeiro sobre a multiplicação dos parasitos. Assim, algumas condições como terapia imunossupressora ou co-infecção com outros agentes infecciosos podem estar contribuindo para esta patogenia. Infecções mistas de *N. caninum* e *Leishmania* sp têm sido relatadas em um cão com dermatite

(TARANTINO et al., 2001) e alta co-soropositividade para ambos parasitos tem sido observada em algumas regiões da Itália (CRINGOLI et al., 2002) e Campo Grande, Brasil (ANDREOTTI et al., 2006).

Os casos mais graves da doença localizada ocorrem em cães jovens com infecção congênita, que apresentam um quadro de paresia inicial de membros posteriores que progride para a paralisia. Sinais neurológicos são dependentes do local parasitado no SNC e os membros posteriores são os mais afetados e ficam em hiperextensão rígida. Outras disfunções que podem ocorrer incluem dificuldade na deglutição, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular, paralisia de nervos faciais e até falência cardíaca. Sinais clínicos não-neurológicos estão relacionados às células parasitadas (endotélio vascular, células musculares e da derme) (DUBEY, 2003). Recentemente, Basso e colaboradores (2005) relataram um caso clínico confirmado de neosporose canina generalizada em um cão jovem na Argentina, apresentando quadro de paralisia progressiva, atrofia muscular e disfagia, com extensas lesões no esôfago associadas à presença de *N. caninum*, sugerindo que neosporose deva ser incluída no diagnóstico diferencial de megaesôfago em cães.

Neosporose canina ocorre geralmente como uma infecção subclínica persistente que pode sofrer reativação durante a gestação, resultando em parasitemia materna e transmissão transplacentária (endógena) do parasito para o feto. Quando a infecção primária ocorre durante a gestação, pode haver a transmissão transplacentária (exógena) e infecção do feto. Assim, ninhadas sucessivas podem estar infectadas (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002), embora em menor grau de transmissão vertical, sugerindo que a exposição pós-natal é necessária para manter o parasito na população canina (BARBER; TREES, 1998).

1.12 Diagnóstico

O diagnóstico das infecções por *T. gondii* e *N. caninum* pode ser realizado por métodos diretos (PCR, isolamento e imunohistoquímica) ou indiretos (sorologia).

1.12.1 Métodos diretos

Estes métodos se baseiam na demonstração direta do parasito em amostras biológicas (sangue, liquor, saliva, urina, humor aquoso, fragmentos de órgãos colhidos por biópsia ou necrópsia) através da reação em cadeia da polimerase (PCR) ou imunohistoquímica (IHC) ou ainda no isolamento dos parasitos mediante inoculação de materiais biológicos em animais de laboratório (bioensaio) ou em cultura celular.

1.12.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Na reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR), um fragmento específico do genoma do parasito é amplificado e o produto da amplificação é visualizado em gel de agarose ou de poliacrilamida após coloração específica ou diretamente através de PCR em tempo real (*real time* PCR). A sensibilidade e especificidade são geralmente altas, mas dependem de vários fatores, tais como, as técnicas para extração do material genético das amostras, as condições de manipulação e armazenamento das amostras, as características da sequência de DNA escolhidas para amplificação e os parâmetros da reação de amplificação (SWITAJ et al., 2005).

A primeira etapa envolve a hibridização de *primers* específicos a uma sequência do genoma que é escolhida, preferencialmente, com base na existência de várias cópias que são espécie-específicas. Para a detecção de *T. gondii*, a sequência mais utilizada com alta especificidade é o gene B1 que apresenta 35 cópias no genoma (BURG et al., 1989). Para a detecção de *N. caninum*, os *primers* espécie-específicos mais utilizados envolvem o par Np6 – Np21 que anelam na região Nc5, gerando um produto de ~ 350 bp, característico para a presença de DNA de *N. caninum* (MÜLLER et al., 1996).

Recentemente, a utilização combinada de *primers* específicos para *T. gondii* e *N. caninum* em um único PCR (*multiplex* PCR) mostrou ser uma técnica complementar para o diagnóstico ante-mortem de toxoplasmose e neosporose em cães e gatos com distúrbios do sistema nervoso central (SCHATZBERG et al., 2003). Devido à semelhança morfológica por microscopia óptica comum entre oocistos de *N. caninum* e *H. heydorni* que utilizam o cão como hospedeiros definitivos, a identificação dos oocistos isolados de fezes de cães deve obrigatoriamente ser feita por técnicas moleculares (PCR e sequenciamento de DNA).

A principal vantagem da PCR é a rapidez na obtenção dos resultados, principalmente para *real time* PCR (< 4 horas), pois combina as etapas de amplificação e detecção dos produtos de PCR em uma única fase. Contudo, tem a desvantagem de não estabelecer relação com a atividade da doença. Assim, um resultado positivo de tecido cerebral por PCR não pode diferenciar entre infecção aguda e crônica ou latente, e somente o isolamento do parasito a partir de sangue ou fluidos corporais pode provar que a infecção é aguda (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.12.1.2 Imunohistoquímica (IHC)

Técnicas de imunohistoquímica (*immunohistochemistry* – IHC) são particularmente utilizadas para a demonstração de taquizoítas em cortes de tecidos ou esfregaços de fluidos

corporais (liquor, lavado broncoalveolar), sendo mais sensíveis e específicas que as técnicas convencionais histológicas. Taquizoítas podem ser detectados tanto em infecção primária (aguda) como em casos de reativação de infecção latente, comprovando que o parasito é responsável pelas alterações patológicas ali encontradas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A técnica de imunoperoxidase é a mais empregada, utilizando antisoros específicos para *T. gondii* ou *N. caninum*. Anticorpos monoclonais anti-*T. gondii* ou anti-*N. caninum* devem ser preferíveis uma vez que anticorpos policlonais anti-*N. caninum* podem reagir cruzadamente com *T. gondii*, particularmente contra o antígeno BAG-1 de bradizoítas em cistos teciduais (DUBEY; LINDSAY, 1996). Entretanto, a sensibilidade de tais técnicas é geralmente muito baixa, pois é necessário um grande número de cortes histológicos para se detectar os parasitos (DUBEY, 1999).

1.12.1.3 Isolamento em animais ou cultura celular

Técnicas de isolamento necessitam de parasitos viáveis e, por isso, são geralmente menos sensíveis. Bioensaios geralmente utilizam camundongos (*Mus musculus*) alogênicos ou isogênicos para detecção de *T. gondii* e gerbil (*Meriones unguiculatus*) ou camundongos deficientes em IFN- γ para *N. caninum*. Os animais são submetidos à sangria antes da inoculação (controle negativo) e 21-30 dias após a inoculação, para verificar a soroconversão. Tecidos (cérebro, coração, fígado, pulmão, baço, rim e músculos esqueléticos) dos animais soropositivos são analisados para a presença de cistos, os quais são então usados para o isolamento do parasito em cultura celular (células VERO, fibroblastos e monócitos bovinos) (SCHARES et al., 2005).

1.12.2 Métodos indiretos

Os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados para o diagnóstico antemortem das infecções por *T. gondii* e *N. caninum* e são baseados na detecção de anticorpos do isotipo IgG. No entanto, a presença de anticorpos detectados por estes testes indica somente o contato prévio ou exposição ao parasito. Para definir uma infecção recente ou ativa por análises sorológicas, é necessária a demonstração de altos e crescentes títulos de anticorpos IgG específicos em amostras de soros pareadas com intervalos de 2 a 4 semanas (DUBEY, 1987) ou a demonstração de anticorpos IgM específicos em uma única amostra de soro (CAMARGO et al., 1978).

1.12.2.1 Teste do corante de Sabin-Feldman (SFDT)

O teste do corante de Sabin-Feldman (*Sabin-Feldman dye test* – SFDT) foi o primeiro teste a ser utilizado como referência para sorologia de *T. gondii* (SABIN; FELDMAN, 1948). Embora apresente boa reprodutibilidade e alta sensibilidade, alguns inconvenientes na sua execução o tornam pouco utilizado em vários laboratórios, como a necessidade de parasitos vivos e de soro fresco normal (frações do complemento) para que ocorra a lise do parasito. Contudo, este teste é ainda utilizado em inquéritos soroepidemiológicos em diversas espécies animais, inclusive silvestres, pois não necessita de anticorpos secundários ou conjugados espécie-específicos (CAMARGO, 1964).

1.12.2.2 Testes de aglutinação (DAT, MAT, IHAT)

Técnicas de aglutinação têm sido largamente desenvolvidas para sorologia de *T. gondii* e *N. caninum*, tais como o teste de aglutinação direta (*direct agglutination test* - DAT), teste de aglutinação direta modificada (*modified agglutination test* - MAT) e teste de hemaglutinação indireta (*indirect hemagglutination test* - IHAT), e são largamente utilizados em inquéritos soroepidemiológicos em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres, por não utilizarem anticorpos secundários espécie-específicos.

DAT utiliza taquizoítas tratados com formalina que aglutinam na presença de anticorpos específicos e foi primeiramente descrito por Fulton e Turk (1959) para *T. gondii* e posteriormente modificado (MAT) com a utilização de 2-mercaptoetanol que destrói anticorpos IgM específicos e não-específicos, detectando somente anticorpos IgG anti-*T. gondii* (DESMONTS; REMINGTON, 1980). Uma versão do MAT foi desenvolvida para *N. caninum* (*Neospora agglutination test* - NAT) (ROMAND; THULLIEZ; DUBEY, 1998), apresentando altas sensibilidade e especificidade, simplicidade e versatilidade, já que pode ser utilizado em várias espécies animais. IHAT se baseia na aglutinação passiva de hemácias sensibilizadas com antígenos solúveis de *T. gondii* na presença de anticorpos específicos (JACOBS; LUNDE, 1957). Pode ser realizado com amostras de soros tratadas e não tratadas com 2-mercaptoetanol, permitindo assim a detecção de anticorpos IgM específicos e o diagnóstico de infecção recente. Entretanto, apesar da simplicidade e versatilidade, apresenta baixa sensibilidade em relação aos outros testes.

1.12.2.3 Teste de imunofluorescência indireta (IFAT)

O teste de imunofluorescência indireta (*indirect fluorescent antibody test* – IFAT) é amplamente utilizado para o diagnóstico da toxoplasmose em humanos e animais

(CAMARGO, 1964) e foi o primeiro teste sorológico desenvolvido para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* (DUBEY et al., 1988b). O antígeno utilizado é constituído por taquizoítas intactos, formolizados e fixados em lâminas, que revelam uma fluorescência periférica e brilhante após incubação com amostras de soros (anticorpos primários) e anticorpos secundários espécie-específicos marcados com fluorocromos (conjugados fluorescentes). Fluorescência somente da extremidade apical (coloração polar) é considerada como reação não-específica devido às reações cruzadas com outros parasitos Apicomplexa. IFAT é considerado o teste de referência para sorologia de *N. caninum* devido à alta especificidade, pois detecta mais antígenos de superfície do que intracelulares do parasito, apresentando assim baixa reatividade cruzada com outros parasitos relacionados, particularmente *T. gondii*. As principais desvantagens deste teste são a necessidade de um microscópio de fluorescência, técnicos treinados e experientes, resultados relativamente subjetivos, e maiores dificuldades de aplicação em grandes inquéritos soroepidemiológicos (BJÖRKAMN; UGGLA, 1999).

1.12.2.4 Testes imunoenzimáticos (ELISA)

Os testes imunoenzimáticos (*enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA) são atualmente os mais utilizados em sorologia para vários agentes infecciosos, inclusive *T. gondii* e *N. caninum*. Foram introduzidos por Voller e colaboradores (1976) e são baseados na reação de soros testes com antígenos sensibilizados em microplacas. O anticorpo ligado é demonstrado pela adição de conjugados imunoenzimáticos (anti-imunoglobulina espécie-específica marcada com enzima) seguido pela reação da enzima com seu substrato e tampão cromógeno, que gera uma coloração que pode ser mensurada (densidade óptica) em espectrofotômetro de placas. As principais vantagens do ELISA são a obtenção de resultados mais objetivos, um custo relativamente baixo e a possibilidade de testar um grande número de amostras, tendo larga aplicação em inquéritos soroepidemiológicos. As desvantagens estão relacionadas principalmente à reprodutibilidade devido às variações inter- ou intra-ensaios.

A sensibilidade e especificidade do ELISA são altamente dependentes do tipo de antígeno e modalidade de testes utilizados. Assim, diferentes preparações de antígeno têm sido desenvolvidas: (1) antígenos solúveis e totais de taquizoítas contendo uma mistura de antígenos de membrana e intracelulares (a maioria de origem intracelular) obtidos por criólise, ultra-som ou solubilização em detergentes; (2) antígenos de taquizoítas fixados com formalina (a maioria de superfície); (3) antígenos incorporados em complexos imunoestimulantes (Iscom) constituídos por colesterol, fosfolipídeos e saponina (Quil A) que selecionam

proteínas de membrana; (4) proteínas recombinantes de antígenos imunodominantes dos parasitos (BJÖRKAMN; UGGLA, 1999). Desta forma, quanto maior o grau de purificação dos antígenos maior é a especificidade (ELISA-Iscom, ELISA-proteínas recombinantes) e, ao contrário, quanto menos purificada a preparação antigênica (ELISA-total) maior é a probabilidade de ocorrer reatividade cruzada com parasitos relacionados.

Diferentes modalidades de testes (ELISA-indireto, ELISA-competitivo, ELISA-captura e ELISA-avidez) têm também sido aplicadas com os diversos antígenos, utilizando uma variedade de anticorpos policlonais ou monoclonais específicos aos antígenos ou às imunoglobulinas de cada espécie. Análises da avidez de anticorpos IgG específicos são úteis para discriminar entre infecção recente e crônica, e são baseadas no fato que os primeiros anticorpos sintetizados logo após uma infecção primária têm uma menor avidez para os antígenos do que aqueles produzidos com o decorrer da resposta imune (infecção crônica). ELISA-avidez tem sido muito utilizado em investigações epidemiológicas da toxoplasmose humana e neosporose bovina (HOLLIMAN et al., 1994; BJÖRKAMN; UGGLA, 1999).

1.12.2. 5 Reações de *immunoblotting*

Vários antígenos de *T. gondii* e *N. caninum* têm sido definidos e caracterizados por anticorpos policlonais e monoclonais em reações de *immunoblotting*. A maioria destes antígenos está associada com estruturas na superfície do parasito formando os antígenos de superfície (SAG) ou dentro de organelas secretórias como as micronemas (MIC), roptrias (ROP) e grânulos densos (GRA ou GD).

Os antígenos de superfície de *T. gondii* pertencem a uma superfamília de proteínas estruturalmente relacionadas ao principal antígeno de superfície (SAG1) conhecida como proteínas SRS (sequências relacionadas a SAG1) que são ancoradas na membrana via glicosil-inositol-fosfolipídeos (GPI). SAG1 tem um peso molecular estimado de 30 kDa (p30) e está homoganeamente distribuído na superfície, mas é encontrada também no citoplasma e na rede tubular do vacúolo parasitóforo, constituindo de 3 a 5% do total das proteínas de taquizoítas. Outros antígenos de superfície incluem SAG-2 (22 kDa), SAG-3 (43 kDa), SAG-4 (23 kDa) e SAG-5 (35 kDa). Vários componentes de micronemas (MIC1 a MIC11), de roptrias (ROP1 a ROP9) e de grânulos densos (GRA1 a GRA8) têm sido reconhecidos e caracterizados em *T. gondii* (KASPER et al., 1983; CESBRON-DELAUW et al., 1994; JUNG; LEE; GRIGG, 2004).

Os principais antígenos imunodominantes de *N. caninum* já definidos e caracterizados são os antígenos de 29 (p29) e 35 kDa (p35) (HOWE et al., 1998) que mostraram ser

respectivamente idênticos aos antígenos Nc-p36 e Nc-p43, que foram independentemente caracterizados por Hemphill e colaboradores (1999). Diferenças nos pesos moleculares foram atribuídas às diferentes condições (redutoras e não-redutoras) por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Análises de similaridade com as proteínas de *T. gondii* revelaram que Nc-p36/p29 apresenta alta similaridade (76% de similaridade com 51% de identidade) com SAG1 (p30) e que Nc-p43/p35 mostra um alto grau de similaridade (44% de aminoácidos idênticos) com a proteína SRS2. Assim, em analogia com *T. gondii*, foi proposto os nomes NcSAG1 para Nc-p36/p29 e NcSRS2 para Nc-p43/935 (HOWE et al., 1998).

Outros antígenos de *N. caninum* que têm sido caracterizados incluem duas proteínas de grânulos densos (NcDG1 e NcDG2), os quais foram obtidas por subclonagem de cDNA e expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* (LALLY et al., 1997). NcDG1 (33 kDa) mostrou 31% de similaridade com TgGRA-7 enquanto NcDG2 (36-37 kDa) exibiu 47% de identidade com TgGRA-6.

Björkas, Jenkins e Dubey (1994) mostraram um padrão similar de reconhecimento de cinco antígenos imunodominantes de *N. caninum* (17, 27, 29, 30 e 46 kDa) por soro imune de várias espécies animais. Baszler et al. (1996) produziram um anticorpo monoclonal (4A4-2) que reconheceu um antígeno de superfície de *N. caninum* (65 kDa), sendo esta ligação consistentemente inibida por soros imunes de bovinos. Este anticorpo tem sido utilizado em ensaios de ELISA competitivo de inibição. Preparações de antígenos de *N. caninum* em complexos imunoestimulantes (iscom) analisadas por *immunoblotting* revelaram proteínas de 18, 30/32, 41 e 65 kDa, que foram demonstradas estar presentes tanto na superfície como em grânulos densos dos parasitos em imunolocalização por microscopia eletrônica (BJÖRKAMN; HEMPHILL, 1998). Um antígeno de 152 kDa tem sido reconhecido em *immunoblotting* por soros de cães que eliminam oocistos, sendo considerado um potencial marcador de infecção prévia (SCHARES et al., 2001b).

1.13 Epidemiologia e soroprevalência

A prevalência de toxoplasmose em áreas urbanas está geralmente relacionada à contaminação ambiental com oocistos eliminados nas fezes de gatos domésticos, que representam um importante papel na transmissão de *T. gondii* a humanos e outros animais. Os cães são altamente predispostos à infecção por *T. gondii* devido a sua estreita relação com gatos e ao contato com solo contendo oocistos esporulados, além de seu característico hábito alimentar (carnivorismo) que facilita a ingestão de tecidos contaminados com cistos do parasito.

A importância epidemiológica dos cães na transmissão da toxoplasmose para humanos, apesar do seu íntimo contato com o homem, ainda permanece questionável. Alguns autores acreditam que cães podem ter um papel na transmissão mecânica de *T. gondii*, pelo seu hábito de cheirar, ingerir e rolar em fezes de gatos, contaminando o seu pelo. Assim, cães podem atuar como carreadores mecânicos de oocistos de *T. gondii* (FRENKEL et al., 2003; SCHARES et al., 2005). Além disso, na fase aguda da infecção, os cães podem eliminar taquizoítas em suas secreções, especialmente saliva e urina e, desta forma, constituir em potencial fonte de transmissão para o homem (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Uma alternativa para avaliar a contaminação ambiental de *T. gondii* é determinar a soroprevalência em animais urbanos de vida livre (cães e gatos) que são considerados como sentinelas, já que estão expostos aos mesmos riscos da infecção para humanos. Assim, a soroprevalência de *T. gondii* em cães e gatos de rua pode ser um indicador indireto da disseminação do parasito em áreas urbanas (MEIRELES et al., 2004).

A infecção por *T. gondii* em cães é relativamente freqüente, como demonstrado por inquéritos soropidemiológicos realizados em várias partes do mundo, com taxas de soroprevalência variando de 8 to 76% (Quadro 2). Estas variações podem ser devido aos diferentes tipos de testes sorológicos usados, valores de corte (*cut off*) estabelecidos, tamanho da amostra, tipo de população canina e período de realização dos inquéritos. A distribuição geográfica e fatores climáticos podem também influenciar sobre a viabilidade de estágios infecciosos no ambiente tanto para hospedeiros intermediários como definitivos. Portanto, é praticamente impossível fazer comparações válidas entre os diversos estudos de soroprevalência (SILVA et al., 1997; AZEVEDO et al., 2005).

De acordo com os mais recentes inquéritos soropidemiológicos, os seguintes fatores de risco foram considerados para a infecção por *T. gondii* em cães:

- a) *Idade*: cães > 1-2 anos de idade apresentaram maior soroprevalência de *T. gondii* (40% a 86%) comparado a cães com < 1 ano (9% a 50%), sugerindo maior probabilidade de exposição pós-natal ao parasito com o tempo (BRITO et al., 2002; ALI et al., 2003; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2005; ASLANTAS et al., 2005).
- b) *Contato com gatos*: a presença de gatos no ambiente ou o contato com estes animais mostrou uma forte associação positiva com a soropositividade a *T. gondii* em cães (AZEVEDO et al., 2005).
- c) *Área de atividade*: cães que têm livre acesso à rua apresentaram maior soropositividade (51% a 85%) comparado aos que permanecem restritos ao ambiente

domiciliar (14% a 59%), indicando que o ambiente tem um importante papel como fonte de infecção (ALI et al., 2003; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004a)

- d) *Alimentação*: maior soroprevalência em cães que recebem exclusivamente alimentação caseira (33% a 79%) que aqueles com ração comercial (17%). Taxas intermediárias (21%) foram encontradas em cães que consomem alimentação mista (caseira e comercial) (BRITO et al., 2002; ALI et al., 2003; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004a).
- e) *Sexo e Raça*: parece não haver diferenças raciais e susceptibilidade quanto ao sexo, sugerindo que diferentes raças e ambos sexos estão expostos às mesmas condições de risco (ALI et al., 2003; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2005).

Quadro 2. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em cães.

País	Região	Origem	Nº de cães	Soropositivos (%)	Teste sorológico	Referência
Áustria	Viena	urbana e rural	242	26	IFAT	Wanha et al. 2005
Brasil	Belo Horizonte, MG	urbana	243	47	IFAT	Guimarães et al. 1992
	Jaboticabal, SP	urbana	276	63	ELISA	Domingues et al., 1998
	Uberlândia, MG	urbana	218	52,7	IHAT	Cabral et al. 1998a
	Uberlândia, MG	rural	327	55	IFAT	Cabral et al. 1998b
	Uberlândia, MG	urbana	163	36	IFAT ELISA	Mineo et al. 2001
	Botucatu, SP	urbana	80	32,5	IFAT	Brito et al. 2002
	Paraná e São Paulo	urbana e rural	1244	21,3	MAT	de Souza et al. 2003
	Monte Negro, RO	urbana	157	76,4	IFAT	Cañón-Franco et al. 2004a
	São Paulo, SP	de rua	200	50,5	ELISA	Meireles et al. 2004
	Uberlândia, MG	domiciliar de rua	62 94	17,7 46,8	IFAT ELISA	Mineo et al. 2004
	Campina Grande, PB	urbana	286	45,1	IFAT	Azevedo et al. 2005
EUA			229	25	DAT	Lindsay et al. 1990
Suécia			398	30	DAT	Björkman et al. 1994
Taiwan			658	8	ELISA	Lin, 1998
Trinidad e Tobago		domiciliar caça de rua	153 59 38	25,5 30,5 60,5	LAT	Ali et al. 2003
Turquia	Ankara	de rua	116	62,1	SFDT	Aslantas et al. 2005

Fonte: Modificado de Tenter, Heckeroth e Weiss (2000).

Infecções subclínicas por *N. caninum* em cães têm grande importância epidemiológica porque os cães domésticos são seus hospedeiros definitivos e podem eliminar oocistos nas fezes, contribuindo para a contaminação ambiental. A soroprevalência de *N. caninum* em cães tem sido extensivamente estudada nos últimos anos (DUBEY; LINDSAY, 1996) e os inquéritos mais recentes estão sumarizados no Quadro 3.

Quadro 3. Ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* em cães.

País	Região	Origem	Nº de cães	Soropositivos (%)	Teste sorológico	Referência
Argentina	Buenos Aires Province	rural	125	48	IFAT	Basso et al., 2001b
		rural	35	54,2		
		hospital vet.	160	26,2		
Áustria	Viena	urbana	381	2,1	IFAT	Wanha et al., 2005
		rural	433	5,3		
Bélgica		urbana	155	10,5	IFAT	Lasri et al., 2004
		rural	56	26,8		
Brasil	Uberlândia, MG	hospital vet.	163	6,7	IFAT	Mineo et al., 2001
	Paraná	rural	134	21,6	IFAT	de Souza et al., 2002
	São Paulo, SP	domiciliados errantes	500 611	10 25	NAT	Gennari et al., 2002
	Monte Negro, RO	urbana	157	8,3	IFAT	Cañón-Franco et al., 2003
	Uberlândia, MG	domiciliados	62	4,8	IFAT ELISA	Mineo et al., 2004
		hospital vet. errantes	213 94	8,9 12,8		
	Uberlândia, MG	urbana	300	10,7	IFAT	Fernandes et al., 2004
		peri-urbana	58	18,9		
		rural	92	21,7		
	Campina Grande, PB	urbana	286	8,4	IFAT	Azevedo et al., 2005
	Campo. Grande, MT	urbana	345	27,2	IFAT	Andreotti et al., 2006
Chile	IX	urbana	120	12,5	IFAT	Patitucci et al., 2001
		rural	81	26		
Itália	Sul		1058	6,4	IFAT	Cringoli et al., 2002
	Norte		707	10,9	ELISA	Capelli et al., 2004
México		urbana	27	51	ELISA	Sánchez et al., 2003
		rural	30	20		
Nova Zelândia		urbana	150	30,7	IFAT	Antony e Williamson, 2003
		rural	161	74,5		
		rural	154	96,8		
Turquia	Bursa e Adana		150	10	IFAT	Coskun et al., 2000

Fonte: Modificado de Moore (2005).

Barber e colaboradores (1997a) relataram a primeira evidência sorológica da infecção por *N. caninum* em 1554 soros de cães de três continentes (América do Sul, África e Oceânia): Uruguai (20% de 414), Ilhas Falkland (0,2% de 500), Tanzânia (22% de 49), Kênia (0% de 140) e Austrália (9% de 451). Desde então, inquéritos soroepidemiológicos têm sido realizados em várias partes do mundo, mostrando uma ampla variação nas taxas de soroprevalência, de 0% no Kênia (BARBER et al., 1997a) a 97% na Nova Zelândia (ANTONY; WILLIAMSON, 2003). Apesar da ampla variação nas taxas de soroprevalência, as seguintes características epidemiológicas sobre a infecção por *N. caninum* em cães têm sido destacadas:

- a) *Habitat*: maior soroprevalência em cães de área rural (20% a 97%) que de área urbana (7% a 26%), sugerindo uma maior exposição a *N. caninum* em cães de ambientes rurais e uma importante associação epidemiológica entre bovinos e cães, já que eles podem ter contato com placentas e fetos abortados de bovinos (BASSO et al., 2001b; PATITUCCI et al., 2001; ANTONY; WILLIAMSON, 2003; SÁNCHEZ et al., 2003; FERNANDES et al., 2004; LASRI et al., 2004).
- b) *Área de atividade*: maior soroprevalência em cães errantes ou com livre acesso à rua (11% a 25%) que em cães domiciliados (2% a 10%), sugerindo que cães com livre acesso às ruas ou contato com outras espécies de animais apresentam uma maior chance de exposição ao parasito devido aos seus hábitos de caça e carnivorismo bem como ao estreito contato com o solo (GENNARI et al., 2002; CAÑÓN-FRANCO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2005).
- c) *Alimentação*: maior soroprevalência em cães com dieta caseira (8,6%) que aqueles com ração comercial (0%) (CAÑÓN-FRANCO et al., 2003), como também em cães que consomem carne crua (29,5%) comparado ao não consumo de carne crua (7%) (PATITUCCI et al., 2001).
- d) *Idade*: maior soroprevalência em cães mais velhos (> 6 a 12 meses) *versus* mais jovens (< 6 a 12 meses): 47,7% vs 12,7% (BASSO et al., 2001b); 17-29% vs 9% (de SOUZA et al., 2002); 9,6% vs 0% (CAÑÓN-FRANCO et al., 2003); 31,4% vs 10,5% (ANDREOTTI et al., 2006). A soroprevalência crescente com a idade sugere exposição pós-natal a *N. caninum* e que o parasito é principalmente transmitido horizontalmente, ao contrário do que ocorre em bovinos, onde a maioria da infecção é congênita. Entretanto, alguns estudos não têm revelado níveis significativamente

crescentes de soropositividade com a idade (PATITUCCI et al., 2001; FERNANDES et al., 2004).

- e) *Raça e sexo*: parece não haver predisposição racial e de sexo, sugerindo que todas as raças e machos ou fêmeas podem ser igualmente infectados (BARBER et al., 1997b; BASSO et al., 2001b; PATITUCCI et al., 2001; de SOUZA et al., 2002; CAÑÓN-FRANCO et al., 2003; WANHA et al., 2005). Entretanto, uma maior soroprevalência em cães de raça pura (13,6%) *versus* mestiços (7,1%) foi observada na Itália (CAPELLI et al., 2004) corroborando os achados de casos descritos mais freqüentemente nas raças Labrador, Golden retriever, Boxer, Greyhound e Bassethound (DUBEY, 2003). Tais achados apontam para uma possível predisposição genética à infecção e/ou transmissão vertical mais eficiente.
- f) *Sinais clínicos*: parece não haver diferenças quanto à soropositividade em cães com e sem sinais clínicos (BASSO et al., 2001b; MINEO et al., 2001; LASRI et al., 2004). Entretanto, Klein e Muller (2001) apud DUBEY (2003) encontraram maior soroprevalência em cães com sinais clínicos (13%) comparado a cães sem sinais clínicos (4%).
- g) *Títulos de anticorpos*: cães com infecção subclínica apresentam geralmente baixos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* (< 800) comparado a altos títulos (> 800 até 51.200) em infecções clínicas (BARBER; TREES, 1996; BARBER et al., 1997b; COSKUN et al., 2000). Entretanto, falta de soroconversão já foi relatada em alguns cães que eliminaram oocistos (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999)
- h) *Co-infecção*: maior soroprevalência em cães soropositivos (42,4%) que em cães soronegativos (14,2%) a *Leishmania infantum* em certas regiões da Itália, sugerindo que a imunossupressão causada por *Leishmania* pode ter aumentado a susceptibilidade a *N. caninum* (CRINGOLI et al., 2002). Em outras regiões (Campo Grande, MS), a co-infecção parece ser comum em cães, mas a leishmaniose visceral não parece aumentar a susceptibilidade a *N. caninum* (ANDREOTTI et al., 2006). A co-infecção com *T. gondii* é geralmente baixa, com taxas de soroprevalência variando de 1% (LINDSAY et al., 1990), 1,7% (WANHA et al., 2005), 3% (MINEO et al., 2001) a 4,9% (AZEVEDO et al., 2005).

Apesar do importante papel dos cães como animais de companhia para humanos e como hospedeiros definitivos de *N. caninum*, a sua importância epidemiológica na transmissão da neosporose para humanos ainda não tem sido demonstrada e merece maiores investigações.

1.14 *T. gondii* e *N. caninum* em canídeos silvestres

Infecção por *T. gondii* é muito comum em animais silvestres, especialmente canídeos, como demonstrado pela alta frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em diferentes espécies em várias regiões do mundo (Quadro 4). Os canídeos silvestres são essencialmente carnívoros e predadores, com grande parte de sua cadeia alimentar sendo constituída por pequenos ruminantes, coelhos e roedores. Assim, a fonte potencial de infecção é a carne contaminada com cistos de *T. gondii*, embora o estreito contato com solo contaminado por oocistos esporulados também represente uma importante via de transmissão (LINDSAY et al., 1996). Toxoplasmose clínica tem sido relatada em raposas, que podem desenvolver a doença como infecção primária e não somente associada a condições imunossupressoras como co-infecção com o vírus da cinomose canina (DUBEY; LIN, 1994). Assim, distúrbios neurológicos e respiratórios nestas espécies devem ser investigados para um diagnóstico diferencial entre toxoplasmose, cinomose e neosporose.

Até o momento, não há relatos de neosporose clínica em outros canídeos naturalmente infectados, além do cão. Entretanto, um caso de co-infecção por *N. caninum* e vírus da cinomose canina foi recentemente relatado no carnívoro silvestre guaxinim (*Procyon lotor*) de Illinois, EUA, que apresentou um quadro de convulsões, pneumonia e encefalite, demonstrando que esta espécie também é um hospedeiro intermediário natural para *N. caninum* (LEMBERGER et al., 2005).

Infecções por *N. caninum*, evidenciadas pela presença de anticorpos específicos, têm sido demonstradas em várias espécies de canídeos silvestres (Quadro 4): coiotes americanos (*Canis latrans*), dingos australianos (*Canis lupus dingo*), raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) e cinzas (*Urocyon cinereoargenteus*), lobos (*Canis lupus*), lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), graxaim do mato (*C. thous*) e do campo (*Lycalopex gymnocercus*), sugerindo que eles podem servir como hospedeiros intermediários naturais. Como os coiotes foram recentemente considerados hospedeiros definitivos de *N. caninum* e devido à baixa eliminação de oocistos quando comparado a outros coccídeos, outros canídeos silvestres poderiam ser potenciais hospedeiros definitivos.

Quadro 4. Ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* e *N. caninum* em canídeos silvestres.

Espécie animal	Origem	Nº de animais	<i>T. gondii</i> (%)	<i>N. caninum</i> (%)	Teste sorológico	Referência
Raposa vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)	Reino Unido	54		2	IFAT	Barber et al., 1997a
	Bélgica	123	98,4	17	IFAT	Buxton et al., 1997
	EUA	283	85,9		MAT	Dubey et al., 1999
	Irlanda	51 70	47	1,4	LAT IFAT	Wolfe et al., 2001
	Suécia	221	38	0	DAT ELISA	Jakubek et al., 2001
	Áustria	94	35	0	IFAT	Wanha et al., 2005
	Israel	24		4,2	IFAT	Steinman et al., 2006
Raposa cinza (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	EUA	97	75,3		MAT	Dubey et al., 1999
	EUA	26	61,5	15,4	DAT	Lindsay et al., 2001
Dingo (<i>Canis dingo</i>)	Austrália	169		9	IFAT	Barber et al., 1997a
Coioate (<i>Canis latrans</i>)	EUA	52	62	10	IFAT	Lindsay et al., 1996
	EUA	222	59		MAT	Dubey et al., 1999
	EUA	113	31	10,6	IFAT	Gondim et al., 2004c
Lobo-guará (<i>C. brachyurus</i>)	Brasil (MG, RJ, PR)	48		0	IFAT	Melo et al., 2002
	Brasil (MG, SP, DF)	59	74,6	8,5	ELISA IFAT	Vitaliano et al., 2004
	Rep. Theca	6	100	16,7	IFAT	Sedlák e Bártoová, 2006
Lobo (<i>Canis lupus</i>)	Alaska	125 122	9	3,3	MAT NAT	Zarnke et al., 2000 Dubey e Thulliez, 2005
	EUA	164	28,7	39	IFAT	Gondim et al., 2004c
	Israel	9		11,1	IFAT	Steinman et al., 2006
	Rep. Theca	10	100	20	IFAT	Sedlák e Bártoová, 2006
Jackal dourado (<i>Canis aureus</i>)	Israel	114		1,8	IFAT	Steinman et al., 2006
Graxaim do mato (<i>C. thous</i>)	Brasil (SP, PR, RS, PB)	15	60	26,7	IFAT NAT	Cañón-Franco et al., 2004b Gennari et al., 2004
Graxaim do campo (<i>L. gymnocercus</i>)		12	91,7	41,7		
Raposa (<i>D. vetulus</i>)		30	0	0		

Recentemente, a existência de um ciclo silvestre para *N. caninum* foi relatada na América do Norte, com o isolamento do parasito (NC-deer1) de cervídeos (*Odocoileus virginianus*) que atuariam como hospedeiros intermediários naturais (GONDIM et al., 2004c). Assim, além do ciclo doméstico (entre cães e bovinos), um ciclo silvestre (entre coiotes e cervos) bem como ciclos cruzados (entre coiotes e bovinos e entre cães e cervos) podem existir, embora a transmissão tenha sido demonstrada somente para o ciclo doméstico, de bovinos a coiotes e de cervídeos para cães (Figura 4).

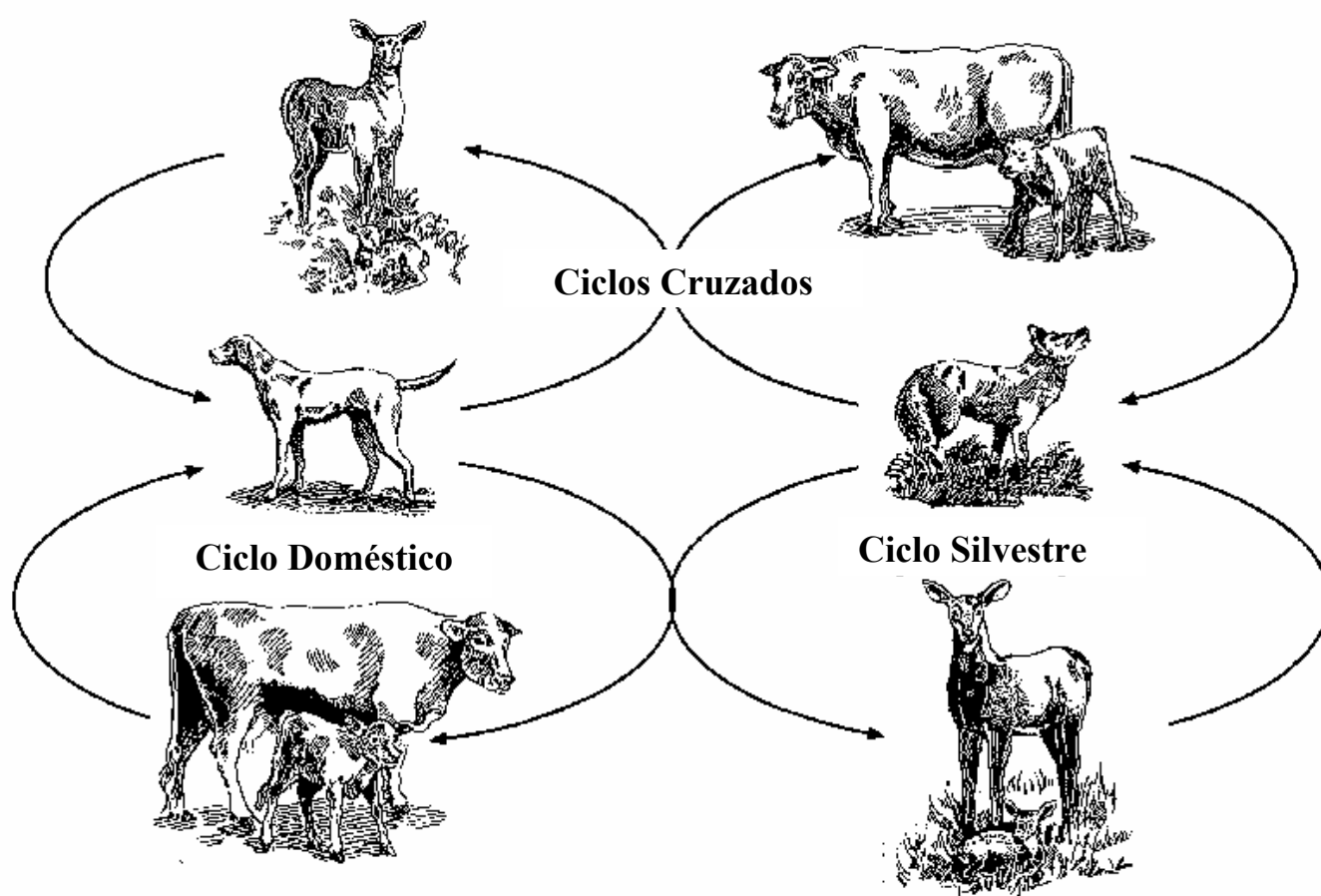


Figura 4. Ciclos de transmissão de *Neospora caninum* entre animais domésticos e silvestres. Fonte: Gondim e colaboradores (2004c).

Vários estudos soroepidemiológicos têm demonstrado que a soroprevalência de *T. gondii* é maior que a de *N. caninum* em canídeos silvestres, sugerindo uma maior exposição a *T. gondii* e representando um bom indicador da contaminação ambiental com estágios infecciosos do parasito (LINDSAY; WESTON; LITTLE, 2001). Por outro lado, a grande variação entre as soroprevalências de *N. caninum* em canídeos de diferentes regiões pode ter influência de vários fatores, tais como distribuição geográfica, clima, idade dos animais, hábitos alimentares e condições de manejo em animais de cativeiro bem como dos diferentes testes sorológicos empregados. Vale ressaltar a alta soroprevalência de *N. caninum* em lobos da América do Norte e graxaim do Brasil, quando comparada a outras regiões, reforçando a existência de um ciclo silvestre. É possível que outros ciclos silvestres existam em outras regiões do mundo devido ao grande número de evidências sorológicas ou histológicas de infecção por *N. caninum* em uma ampla faixa de animais silvestres (ROSYPAL; LINDSAY, 2005).

Exposição a canídeos silvestres, principalmente coiotes e raposas, tem sido identificada como um fator de risco para infecção por *N. caninum* em bovinos (BARLING et al., 2000). Assim, a prevalência de anticorpos a *N. caninum* em canídeos silvestres pode possivelmente refletir sua importância na transmissão do parasito aos bovinos. Além disso, com a identificação do ciclo silvestre, além da predação natural de cervídeos por canídeos silvestres, cães de caça podem eventualmente tornar-se infectados no campo pela ingestão de carcaças de cervídeos e assim aumentar o risco de transmissão do parasito aos bovinos (GONDIM et al., 2004c; ROSYPAL; LINDSAY, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral desta tese foi analisar cinco estudos referentes à infecção por *T. gondii* e *N. caninum* em cães (*Canis familiaris*) e lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) realizados no Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Para tanto, várias modalidades de testes sorológicos foram padronizadas visando a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em soros de cães e lobos-guará, com enfoque em aspectos soroepidemiológicos e no imunodiagnóstico destas parasitoses.

2.2 Específicos

- Determinar os títulos ótimos de *cut off* para IFAT e ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soros de cães, considerando a reatividade ao antígeno de superfície de *T. gondii* (SAG-1) em *immunoblotting* como um marcador da infecção (estudo I).
- Padronizar a técnica ELISA de captura IgM (McELISA) utilizando anticorpos heterólogos (anti-IgG humana) ou homólogos (anti-IgM canina) para determinar a cinética da resposta de IgM anti-*T. gondii* em cães experimentalmente infectados com a cepa RH do parasito (estudo II).
- Avaliar a cinética da resposta de IgG anti-*T. gondii* por três testes sorológicos (IHAT, IFAT e ELISA) em cães experimentalmente infectados com *T. gondii* e investigar a detecção do parasito em tecidos dos cães inoculados, por bioensaio em camundongos e imunohistoquímica (estudo II).
- Investigar a ocorrência de anticorpos IgG anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em cães com distúrbios neuromusculares, respiratórios e/ou gastrointestinais, atendidos no Hospital Veterinário/UFU (estudo III).
- Avaliar testes sorológicos (IFAT e ELISA) para o diagnóstico de *N. caninum* em cães visando a otimização de títulos de *cut off* pela curva TG-ROC e estudos de reatividade cruzada com *T. gondii* por ELISA e *immunoblotting* de inibição (estudo IV).
- Avaliar a utilização de conjugados homólogos, heterólogos e de afinidade em IFAT e ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) de cativeiros das regiões sudeste e centro-oeste do Brasil (estudo V).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e amostras de soros

Diferentes populações de cães e lobos-guará foram analisadas nos vários estudos em diferentes períodos.

No estudo I, um total de 212 amostras de soros foi obtido de cães atendidos no HV/UFU e de cães errantes capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Uberlândia, entre 1998 e 1999. As amostras de soros foram analisadas por ELISA e IFAT para *T. gondii* para determinar seus títulos ótimos de *cut off* em relação à reatividade ao antígeno SAG1 (p30) por *immunoblotting*.

O estudo II utilizou 4 cães (sexo, raça e idade variados) sorologicamente negativos para *T. gondii* por IHAT e IFAT-IgG, os quais foram inoculados por via intraperitoneal com 10⁴ taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. Os animais foram observados diariamente para sinais clínicos ou mortalidade até 62 dias pós-inoculação (p.i.). Os cães sobreviventes foram sacrificados, necropsiados e órgãos (baço, pulmão, cérebro, coração, rim, músculo esquelético, olho e língua) foram coletados para bioensaio em camundongos e análise imunohistoquímica. Amostras de soros foram obtidas antes (sangria prévia) e após a inoculação em intervalos de 3-4 dias durante as primeiras três semanas e então semanalmente até 62 dias pós-inoculação para determinar a cinética da resposta de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* por IHAT, IFAT e ELISA. Grupos controles foram incluídos e constituídos por: (1) 35 soros de cães com infecção aguda (IgG e IgM anti-*T. gondii*); (2) 35 soros de cães com infecção crônica (IgG anti-*T. gondii*); (3) 35 soros de cães negativos para *T. gondii* e *N. caninum*; (4) 35 soros de cães naturalmente infectados com *N. caninum* (IgG anti-*N. caninum*). As amostras de soros foram obtidas de cães capturados pelo CCZ de Uberlândia (grupos 1, 2, 3 e 4) e de cães atendidos no HV/UFU (grupos 2, 3 e 4) entre 2000 e 2001.

No estudo III, um total de 163 amostras de soros foi obtido de cães com sintomas neuromusculares (ataxia e convulsões) associados a distúrbios respiratórios (dispnéia, pneumonia) e gastrointestinais (vômito e diarreia), atendidos no HV/UFU entre 1999 e 2000. As amostras de soros foram submetidas à sorologia para *T. gondii* (IHAT, IFAT, ELISA e *immunoblotting*) e *N. caninum* (IFAT e imunoprecipitação).

No estudo IV, um total de 300 amostras de soros foi obtido de cães (sexo, raça e idade variados) atendidos no HV/UFU e capturados pelo CCZ de Uberlândia, MG de 2000 a 2004. As amostras de soros foram submetidas a uma análise comparativa entre os testes IFAT e ELISA para *N. caninum* e determinação dos seus títulos ótimos de *cut off* com base na

reatividade aos antígenos imunodominantes de *N. caninum* por *immunoblotting*. Os soros foram também analisados em estudos de reatividade cruzada com *T. gondii* por ELISA e *immunoblotting* de inibição. Soros controles positivos foram obtidos de cães experimentalmente infectados com *N. caninum* ou *T. gondii*. Soros controles negativos foram coletados de cães saudáveis com sorologia negativa para ambos parasitos por dois testes sorológicos (IFAT e ELISA).

O estudo V analisou amostras de soros de 59 lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) procedentes de 6 zoológicos (Uberlândia-MG, Belo Horizonte-MG, Uberaba-MG, Brasília-DF, São Paulo-SP, Bauru-SP) e de uma reserva ecológica (Araxá-MG) das regiões sudeste e centro-oeste do Brasil, entre 1992 e 2002. As amostras de soros foram submetidas à sorologia para *T. gondii* (ELISA) e *N. caninum* (IFAT) para investigar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* e avaliar conjugados homólogos, heterólogos e de afinidade em ELISA e IFAT para o sorodiagnóstico de ambas parasitoses.

Volumes de aproximadamente 5 mL de sangue sem anticoagulante foram coletados de todos os animais por punção das veias cefálica ou jugular, e centrifugados a 300-500 x g por 10 minutos. Os soros obtidos foram armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos. Todos os métodos utilizados para contenção e sangria dos animais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991).

3.2 Manutenção e obtenção de parasitos

Toxoplasma gondii – Parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss, através de passagens seriadas a intervalos de 48-72 horas de um inóculo de aproximadamente 10^6 taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO et al., 1980). Os exsudatos peritoneais foram obtidos por lavagem da cavidade abdominal com solução salina estéril tamponada com fosfatos a 10 mM (PBS, pH 7,2) e, em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover debris celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com PBS. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuscitado em 10 mL de PBS e os parasitos contados em câmara hemocitométrica. Após nova lavagem com PBS, o sedimento foi armazenado a -20°C para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii*.

Neospora caninum – Parasitos da linhagem Nc-1 (DUBEY et al., 1988b) foram mantidos em cultura celular usando uma linhagem de monócitos bovinos (M617) como descrito por Speer e colaboradores (1985). Monócitos bovinos foram cultivados em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com HEPES a 25 mM, penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-Glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM) e soro fetal bovino (SFB) a 10% em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C até atingirem a confluência. As células hospedeiras foram infectadas com taquizoítas de *N. caninum* (1 x 10⁵ taquizoítas/mL) que foram mantidos por passagens seriadas em meio RPMI com SFB a 3%, a cada 48-72 horas. Parasitos foram coletados por descamação da monocamada celular (*cell scraper*) e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 25 x 7 mm e centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover debris celulares. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com PBS. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspensionado em 10 mL de PBS e os parasitos contados em câmara hemocitométrica. Após nova lavagem com PBS, o sedimento foi armazenado a -20°C para posterior preparação de antígenos solúveis de *N. caninum* ou imediatamente ressuspensionado em soluções apropriadas para preparação de antígenos totais ou intactos de *N. caninum*.

3.3 Preparação de antígenos dos parasitos

3.3.1 Taquizoítas intactos (formolizados)

Taquizoítas intactos de *T. gondii* e *N. caninum* foram preparados como previamente descrito (CAMARGO, 1964). Suspensões parasitárias foram ajustadas a uma concentração de 1 x 10⁶ taquizoítas/mL e tratadas com formaldeído a 1% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação lenta. Após uma centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover parasitos aglomerados, o sobrenadante foi lavado com PBS por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C). O sedimento final foi ressuspensionado em água destilada estéril até obter uma concentração de 20-30 parasitos por campo microscópico (aumento 400X). Um volume de 10 µL da suspensão parasitária foi adicionado em áreas demarcadas de lâminas microscópicas para imunofluorescência (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e incubadas por 3-4 horas à temperatura ambiente. As lâminas com taquizoítas intactos de *T. gondii* e *N. caninum* formolizados foram individualmente embaladas e armazenadas a -20°C até serem usadas em IFAT.

3.3.2 Antígenos solúveis (sonicados)

Antígenos solúveis de *T. gondii* e *N. caninum* foram preparados como descrito por Scott e colaboradores (1987), com algumas modificações. Suspensões parasitárias (1×10^8 taquizoítas/mL) foram tratadas com inibidores de proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto [PMSF] a 1,6 mM; leupeptina a 50 µg/mL e aprotinina a 10 µg/mL; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e então submetidas a seis ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C seguido por seis ciclos de ultra-som (Thorton – INPEC Eletrônica S/A, Santo Amaro, SP, Brasil) durante 1 minuto a 60 Hz em banho de gelo. Após centrifugação ($10.000 \times g$, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado, a concentração protéica foi determinada (LOWRY et al., 1951) e alíquotas dos antígenos solúveis foram armazenadas a -20°C, até serem utilizados em ELISA.

3.3.3 Antígenos totais (SDS)

Taquizoítas de *T. gondii* e *N. caninum* (1×10^8 taquizoítas/mL) foram lisados em tampão de amostra (Tris-HCl a 100 mM pH 6,8; dodecil sulfato de sódio [SDS] a 4%; glicerol a 20%; azul de bromofenol a 0,2%), incubados por 5 minutos a 100°C e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% ou 15% sob condições não-redutoras (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, CA, EUA). Um volume de 150 µL ($1,5 \times 10^7$ taquizoítas) foi aplicado em cada corrida eletroforética e, em paralelo, padrões de pesos moleculares (Sigma Chemical Co., EUA; Amersham Life Science, EUA) foram também incluídos. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (poros de 0,22 µm; Sigma Chemical Co.) de acordo com o método anteriormente descrito (TOWBIN; STAEBELIN, GORDON, 1979), utilizando um sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Suécia) por 2 horas a uma corrente de 0,8 mA/cm² do gel. O sucesso da transferência foi confirmado pela visualização das frações protéicas e padrões de pesos moleculares coradas com solução de Ponceau a 0,5%. As membranas de nitrocelulose foram armazenadas a 4°C até serem usadas em análises de *immunoblotting*.

3.3.4 Antígenos excretados-secretados (ESA)

Antígeno secretado-excretado (ESA) de *T. gondii* foi obtido como anteriormente descrito (DECOSTER; DARCY; CAPRON, 1988), com algumas modificações. Taquizoítas

de *T. gondii* foram ajustados para aproximadamente 1×10^8 taquizoítas/mL em solução salina de Hanks e incubados por 45 minutos a 37°C. Após centrifugação (10.000 x g, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado, filtrado em membranas de 0,22 µm (Filtros Millex, Millipore, EUA) e armazenado em alíquotas a -20°C até ser utilizado como antígeno em ELISA de captura IgM.

3.4 Testes sorológicos

3.4.1 Hemaglutinação indireta (IHAT)

IHAT foi realizado utilizando o reagente comercialmente disponível HAP-Toxoplasmose (Salck Ind. e Com. Prod. Biológicos Ltda – São Paulo, SP), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante.

Todas as amostras de soros foram previamente inativadas a 56°C por 30 minutos e testadas inicialmente em diluições de 1:32 e 1:64 (teste qualitativo). Amostras positivas foram submetidas a diluições duplas seriadas de 1:64 a 1:2048 (teste semi-quantitativo) para determinar o título final de anticorpos. Soros positivos com títulos ≥ 64 foram re-testados após tratamento com 2-mercaptoetanol (2ME) para identificar anticorpos da classe IgM. Uma queda de dois títulos ou mais no nível de anticorpos das amostras tratadas com 2ME em relação às não tratadas foi indicativa da presença de anticorpos IgM específicos. Soros com títulos ≥ 64 foram considerados positivos.

3.4.2 Imunofluorescência indireta (IFAT)

IFAT foi realizado para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em amostras de soros de cães e lobos-guará, segundo o protocolo utilizado para toxoplasmose humana (CAMARGO, 1964), com algumas modificações.

Lâminas contendo taquizoítas formolizados de *T. gondii* ou *N. caninum* foram incubadas com amostras de soros em diluições duplas seriadas a partir de 1:16 (*T. gondii*) ou 1:25 (*N. caninum*) até a obtenção do título final de anticorpos. Após incubação durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas com PBS por três vezes durante 5 minutos e incubadas com diferentes conjugados fluorescentes marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma Chemical Co.) e diluídos em PBS contendo azul de Evans a 0,01%:

- (1) IgG de coelho anti-IgG de cão-FITC (diluição de 1:50);

(2) IgG de cobaia anti-IgG de lobo-FITC (diluição de 1:100);

(3) Proteína A-FITC (diluições 1:10 e 1:100).

O conjugado anti-IgG de cão-FITC foi fornecido (Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, SP) ou obtido comercialmente (Biolab Diagnóstica S.A., RJ; Fiocruz/Bio-Manguinhos, RJ) enquanto o conjugado anti-IgG de lobo-FITC foi preparado de acordo com o método de Clark e Shepard (1963). O conjugado de afinidade proteína A/FITC foi obtido comercialmente (Sigma Chemical Co.). As diluições ótimas dos conjugados foram previamente determinadas por titulação em bloco dos reagentes usando amostras de soros controles positivos e negativos.

Após nova incubação por 30 minutos a 37°C, as lâminas foram lavadas como anteriormente descrito, montadas com lamínulas e glicerina tamponada (pH 9,5) e examinadas em microscópio epifluorescente (Olympus Mod. BH2, Tokyo, Japão). As reações foram consideradas positivas somente quando os taquizoítas apresentaram uma completa fluorescência periférica, brilhante e uniforme. Uma coloração polar ou apical foi considerada reação não-específica.

3.4.3 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

3.4.3.1 ELISA indireto

O método ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em amostras de soros de cães e lobos-guará, segundo o protocolo anteriormente descrito (MINEO et al., 1980), com algumas modificações.

Placas de microtitulação de poliestireno foram sensibilizadas com antígenos solúveis (sonicados) de *T. gondii* ou *N. caninum* em concentração protéica variando de 5-20 µg/mL e diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 60 mM (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Alternativamente, placas foram sensibilizadas com 10⁵ taquizoítas de *T. gondii* por poço, diluídos em PBS contendo gelatina a 2% e incubadas por 18 horas a 37°C.

Após três lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram incubadas com amostras de soros em diluições duplas seriadas a partir de 1:32 ou diluições únicas de 1:64, em duplicata, para *T. gondii* e diluições de 1:25 a 1:100 para *N. caninum* em PBS-T contendo diferentes soluções bloqueadoras: 1% de soroalbumina bovina (BSA, Sigma Chemical Co.) ou 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP). Após incubação por 45 minutos a 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas por seis vezes com PBS-T e incubadas com diferentes conjugados enzimáticos:

- (1) IgG de coelho anti-IgG de cão-peroxidase (diluições de 1:3.000 e 1:8.000);
- (2) IgG de cobaia anti-IgG de lobo-peroxidase (diluição de 1:50);
- (3) Proteína A-peroxidase (diluição de 1:25.000).

Os conjugados anti-IgG de cão-peroxidase e anti-IgG de lobo-peroxidase foram preparados de acordo com o método de Wilson e Nakane (1978) enquanto o conjugado de afinidade proteína A/peroxidase foi obtido comercialmente (Sigma Chemical Co.). As diluições ótimas dos conjugados foram previamente determinadas por titulação em bloco dos reagentes usando amostras de soros controles positivos e negativos.

Após incubação por 45 minutos a 1 hora a 37°C e um novo ciclo de lavagens, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático que consistiu de ortofenilenodiamina (OPD; Merck, Alemanha) a 1 mg/mL em tampão citrato-fosfato 100 mM (pH 5,5) contendo H₂O₂ a 0,03%. Após incubação por 10-15 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2 N e a densidade óptica (DO) determinada a 492 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA).

Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O limite de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média da DO dos soros controles negativos acrescida de 2 a 5 desvios padrões. Os resultados foram expressos em títulos de anticorpos quando diluições duplas seriadas das amostras de soros foram realizadas, sendo o título definido pela recíproca da maior diluição do soro que apresentou um valor de DO acima do *cut-off*. Alternativamente, os resultados foram expressos em índices de reatividade ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$, onde valores de $IE > 1,0$ (ou $IE\% > 100$) foram considerados positivos. Para aumentar a especificidade dos testes e excluir os valores no limiar da positividade (zona cinza ou *borderline*), um limite adicional de 20% foi estabelecido para o estudo IV, onde somente valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos.

3.4.3.2 ELISA de captura IgM

A técnica ELISA de captura IgM (McELISA) foi desenvolvida para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* em amostras de soros de cães, segundo o protocolo anteriormente descrito (MINEO et al., 1986), com algumas modificações.

Microplacas de poliestireno (Immulon 2, Dynex Technologies, EUA) foram sensibilizadas com diferentes anticorpos de captura: anti-IgM de cão (The Binding Site Limited, Birmingham, Reino Unido) e anti-IgM humana (Kirkegaard & Perry Laboratories, EUA) a 5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 60 mM (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C.

Etapas subseqüentes foram realizadas utilizando PBS-T contendo 5% de leite desnatado como diluente e lavagens com PBS-T foram feitas entre cada etapa da reação.

As placas foram incubadas com amostras de soros de cães na diluição de 1:16 por 2 horas a 37°C. Subseqüentemente, antígeno ESA de *T. gondii* (5 µg de proteína/poço) foi adicionado e incubado por 2 horas a 37°C. O antígeno ligado foi detectado com F(ab')₂ de coelho anti-*T. gondii* marcado com peroxidase (preparado segundo Wilson e Nakane, 1978) diluído a 1:50 e incubado por 1 hora a 37°C. A reação foi desenvolvida pela adição do substrato enzimático que consistiu de H₂O₂ a 0,03% e 2,2'-azino-di-etilbenztiazoline-6-ácido sulfônico (ABTS) em tampão citrato-fosfato 100 mM (pH 5,5). A leitura (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de ELISA. Resultados foram expressos em índice ELISA (IE) como descrito para o método ELISA indireto.

3.4.3.3 ELISA de inibição

ELISA de inibição foi desenvolvido para avaliar o grau de reatividade cruzada entre *T. gondii* e *N. caninum* como anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005). Soros de cães positivos a ambos parasitos foram utilizados e diluições ótimas do soro foram previamente estabelecidas a 1:200 (*T. gondii*) e 1: 50 (*N. caninum*). Diluições decimais seriadas de 200 a 0,0002 µg/mL dos antígenos solúveis de *T. gondii* e *N. caninum* foram realizadas em PBS-T contendo 5% de leite desnatado para as curvas de inibição. Soros foram pré-absorvidos (v/v) durante 18 horas a 4°C com cada diluição dos antígenos inibidores. Soros incubados somente com o diluente sem inibidores foram usados como controle positivo da reação. Em seguida, as misturas soro-antígeno inibidor foram analisadas em ELISA indireto para *T. gondii* e *N. caninum* como descrito acima. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição, calculada segundo a fórmula: Inibição (%) = (DO sem inibidor – DO com inibidor / DO sem inibidor) x 100 como descrito anteriormente (PUERTA et al., 2005).

3.4.4. Immunoblotting

Análises de *immunoblotting* foram realizadas para verificar a reatividade a antígenos imunodominantes de *T. gondii* e *N. caninum* como previamente descrito (MARCOLINO et al., 2000), com algumas modificações.

Membranas de nitrocelulose com antígenos já transferidos por eletroforese foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm de largura e colocadas em canaletas apropriadas para a reação. As tiras foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite desnatado por 2 horas à temperatura ambiente e subseqüentemente incubadas por 18 horas a 4°C com amostras

de soros de cães nas diluições de 1:50 ou 1:100 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado (PBS-TM). Após seis lavagens de 5 minutos com PBS-T, as tiras foram incubadas com os conjugados enzimáticos anti-IgG de cão-peroxidase (diluição de 1:6.000) ou proteína A-peroxidase (diluição de 1:5.000).

Soros controles positivos de cães e camundongos experimentalmente infectados com *T. gondii* ou *N. caninum* foram também incluídos, com seus respectivos soros controles negativos. Um anticorpo monoclonal de camundongo anti-SAG1 de *T. gondii* (clone 6E9) e soro de camundongo normal foram também utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente, para este marcador de superfície. Estes anticorpos foram revelados com anti-IgG de camundongo-peroxidase (diluição de 1:1.000).

Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente e novo ciclo de lavagens como anteriormente descrito, as tiras foram reveladas pela adição do substrato enzimático que consistiu de 3,3'-tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB; Sigma Chemical Co.) a 1 mg/mL em PBS e H₂O₂ a 1% ou com tabletes comerciais (Sigma Fast DAB, Sigma Chemical Co.). A reação foi interrompida com água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas. As massas moleculares aparentes das bandas antigênicas foram estimadas a partir dos cálculos da mobilidade relativa (Rf), segundo a curva do padrão de peso molecular de referência, usando o programa de análise de imagens Kodak Digital Science 1D (Kodak, EUA). Amostras de soros que apresentaram reatividade ao antígeno SAG1 (p30) de *T. gondii* e a pelo menos dois de três (17, 29-32, 35-37 kDa) antígenos imunodominantes de *N. caninum* foram consideradas positivas por *immunoblotting*.

3.4.4.1 *Immunoblotting* de inibição

Análises de *immunoblotting* de inibição foram realizadas para identificar os antígenos de reatividade cruzada entre *T. gondii* e *N. caninum* reconhecidos por soros de cães, como anteriormente descrito (PUERTA et al., 2005), com algumas modificações.

Soros de cães positivos a ambos parasitos foram diluídos a 1:50 em PBS-T contendo 5% de leite desnatado e pré-incubados (v/v) com 200 µg/mL de cada antígeno inibidor (*T. gondii* e *N. caninum*) por 2 horas a 37°C. Soros incubados somente com o diluente foram usados como controle positivo da reação. Soros pré-absorvidos foram centrifugados (10.000 x g, 10 minutos, 4°C) e os sobrenadantes foram incubados com membranas de nitrocelulose contendo antígenos já transferidos de *T. gondii* e *N. caninum*, seguindo o mesmo protocolo descrito para *immunoblotting*. Bandas antigênicas foram analisadas com o programa de análise de imagens Kodak Digital Science 1D, calculando a intensidade de cada banda (Int Band)

expressa in pixels. A porcentagem de inibição foi calculada segundo a fórmula: Inibição (%) = (Int Band sem inibidor – Int Band com inibidor / Int Band sem inibidor) x 100.

3.4.4.2 Imunoprecipitação

Imunoprecipitação foi realizada usando antígeno de *N. caninum* marcado com biotina (fornecido por L.H. Kasper, Dartmouth Medical School, Hanover, NH, EUA), conforme descrito anteriormente (PEARCE; SHER, 1989), com algumas modificações.

Amostras de soros (diluição de 1:50) de cães positivos para *N. caninum* foram pré-incubadas com o antígeno marcado com biotina durante 18 horas a 4°C e então precipitadas com proteína A-sepharose-4B (Sigma Chemical Co.) por 2 horas a 4°C. O material imunoprecipitado foi submetido a duas lavagens com PBS (300 x g, 10 minutos, 4°C), solubilizado em tampão de amostra durante 5 minutos a 100°C e separado em SDS-PAGE a 12%. Após a separação eletroforética, os antígenos foram transferidos para membranas de nitrocelulose e a reação desenvolvida como descrito para *immunoblotting*. Os antígenos foram detectados usando estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluída a 1:1000 em PBS-TM e revelados com tabletes de DAB (Sigma FAST, Sigma Chemical Co.).

3.5. Detecção de parasitos

A detecção de *T. gondii* foi realizada em tecidos de cães experimentalmente infectados com a cepa RH através da inoculação do material em camundongos (bioensaio) e técnicas imunohistoquímicas.

3.5.1 Bioensaio em camundongos

Amostras de tecidos (baço, pulmão, cérebro, coração, rim, músculo esquelético, olho e língua) foram coletadas, homogeneizadas separadamente em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e inoculadas por via intraperitoneal (volume de 0,5 mL) em cinco camundongos para cada tecido, como anteriormente descrito (JACOBS; REMINGTON; MELTON, 1960). Camundongos foram observados diariamente e esfregaços dos exsudatos peritoneais dos animais que morreram foram examinados em microscopia óptica para a presença de taquizoítas livres. Camundongos sobreviventes foram examinados 15 e 30 dias após a infecção para análise da soroconversão por ELISA indireto, como acima descrito, usando anti-IgG de camundongo-peroxidase (Sigma Chemical Co.).

3.5.2 Imunohistoquímica

Amostras de tecidos foram fixadas em 10% de formalina tamponada com fosfatos 10 mM (pH 7,2) durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi rotineiramente incluído em parafina e cortes de 3 µm de espessura foram obtidos e colhidos em lâminas microscópicas de vidro. Após os processos de desparafinização (xilol) e hidratação (concentrações decrescentes de álcool) convencionais, os cortes foram incubados com ácido acético a 5% para bloqueio da fosfatase alcalina endógena por 10 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com solução salina tamponada com Tris 50 mM (TBS, pH 7,4) por 5 minutos, o material foi incubado com soro normal de cabra a 2,5% por 1 hora a 37°C para bloqueio de sítios não-específicos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário (soro de coelho anti-*T. gondii*) diluído 1:100 em TBS por 18 horas a 4°C. Em paralelo, cortes foram incubados com soro de coelho normal (controle negativo da reação). Após duas lavagens por 5 minutos em TBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG coelho marcada com biotina) diluído a 1:250 em TBS por 1 hora a 37°C.

Após novas lavagens como anteriormente descrito, a reação foi amplificada pela incubação com o complexo estreptavidina-fosfatase alcalina-biotina (Dako A/S, Dinamarca) diluído a 1:200 em TBS por 30 minutos a 37°C. A revelação foi realizada com o substrato Fast Red/Naphthol (Sigma Chemical Co.) e a contracoloração foi feita com hematoxilina de Meyer por 10 minutos. Após secagem ao ar, as lâminas foram montadas com glicerina e lamínula, e o material examinado em microscopia óptica comum (aumento de 200X).

3.6 Análise estatística

A análise estatística consistiu na utilização de programas computadorizados (*Statistic for Windows* – versão 4.5 A - *Statesoft, Inc.* 1993; *GraphPad Prism* versão 3.0 – *GraphPad Software, Inc*) para cálculos de frequência, média, desvio padrão, correlações e associações. Testes paramétricos foram empregados quando os dados apresentaram distribuição normal ou Gaussiana. Caso contrário, os dados foram analisados por testes não-paramétricos. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de significância de $p < 0,05$.

Porcentagens de soropositividade para *T. gondii* e *N. caninum* foram analisadas em diferentes grupos pelo método do qui-quadrado (estudos IV e V).

Médias geométricas com intervalos de confiança de 95% foram determinadas para os níveis de anticorpos expressos em índice ELISA e diferenças entre médias foram analisadas

pelo teste t de Student (estudo II) ou por ANOVA usando o teste de comparação múltipla de Tukey (estudo V).

A correlação entre os anticorpos de captura anti-IgM humana e anti-IgM canina em McELISA (estudo II) e entre os níveis de anticorpos obtidos pelos diferentes conjugados enzimáticos (estudo V) foi calculada pelo teste de correlação de Pearson.

Para determinar os títulos ótimos de *cut off* em IFAT e ELISA para *T. gondii* (estudo I) e *N. caninum* (estudo IV), os parâmetros de sensibilidade e especificidade dos testes foram avaliados considerando a reatividade aos antígenos imunodominantes de cada parasito em *immunoblotting*, que foi usado como teste de referência. Desta forma, a sensibilidade e especificidade foram determinadas em diferentes títulos de *cut off* para cada teste usando a curva TG-ROC (*two-graph receiver-operating characteristic*) como anteriormente proposto (GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à ausência de dados da infecção por *T. gondii* na população canina de Uberlândia, MG até 1994, nós inicialmente determinamos a frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães amostrados durante a campanha de vacinação anti-rábica canina realizada pelo Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia (CABRAL et al., 1998a). Analisando 218 amostras de soros por IHAT e considerando títulos ≥ 64 como positivos, a frequência de anticorpos anti-*T. gondii* foi 52,7% em cães da área urbana, com títulos de anticorpos mais frequentes entre 128 e 512. Foi observada uma soropositividade significativamente maior (59,6%) para cães mestiços (sem raça definida) quando comparado aos cães com raça definida (33,3%). Estes resultados podem refletir a influência de diferentes condições de manejo as quais os animais poderiam estar sendo submetidos, particularmente relacionados ao tipo de alimentação e cuidados sanitários, do que propriamente à predisposição genética. Um aumento significativo na soropositividade foi observado com o avançar da idade (38,9% para cães de 0-2 anos e 78,5% para animais com mais de 10 anos), indicando um crescente risco de exposição pós-natal ao parasito com o tempo. Vários inquéritos soroepidemiológicos mais recentes têm consistentemente confirmado estes achados (BRITO et al., 2002; ALI et al., 2003; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2005; ASLANTAS et al., 2005).

Em seqüência, um novo inquérito soroepidemiológico (CABRAL et al., 1998b) foi realizado em cães da área rural do município de Uberlândia, MG, sendo amostrados 327 cães em postos móveis de vacinação anti-rábica canina realizada pelo Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia, em 1995. Amostras de sangue foram obtidas através de eluatos sanguíneos em papel de filtro e analisadas por IFAT, com triagem sorológica nas diluições de 1:20 e 1:40. A frequência da infecção por *T. gondii* na população canina da área rural foi 55%, com títulos mais frequentes entre 20 e 40 (74% das amostras), sugerindo um provável caráter crônico da infecção nesta população canina rural.

Vários estudos têm sido realizados sobre a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães. Entretanto, a maioria deles não tem estabelecido um estudo comparativo entre os diversos testes sorológicos e sua possível relação com a infecção ativa por *T. gondii*. Assim, em nosso estudo prévio (SILVA et al., 1997), uma comparação foi realizada entre os títulos de anticorpos obtidos em três testes sorológicos (IHAT, IFAT e ELISA) conduzidos com 40 amostras de soros de cães com sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose. Títulos ≥ 64 foram considerados positivos para todos os testes. Os resultados mostraram que, embora todas as

amostras fossem oriundas de cães com sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose, 57% foram negativas em todos os testes e 43% foram positivas em pelo menos um teste. A alta porcentagem de animais soronegativos reflete a variedade e sobreposição de sinais clínicos não específicos entre toxoplasmose e outras doenças infecciosas, e portanto, um resultado sorológico negativo para *T. gondii* torna-se importante para o clínico na busca de outros diagnósticos. Dos animais soropositivos, foi possível identificar dois grupos distintos: (1) 20% de amostras positivas em todos três testes com altos títulos de anticorpos, variando de 128 a 8192; e (2) 23% de amostras positivas em somente um ou dois testes, principalmente IFAT e ELISA, com baixos títulos de anticorpos, variando de 64 a 128. Além disso, as amostras IgM reativas detectadas por IHAT usando 2-ME e por M-Toxo (teste de IHAT modificado por Yamamoto; Shimizu; Camargo, 1991) estavam predominantemente incluídas no primeiro grupo (soros positivos em todos três testes com altos títulos de anticorpos), sugerindo que estes animais poderiam estar apresentando infecção ativa. Por outro lado, amostras do segundo grupo (soros positivos em um ou dois testes com baixos títulos de anticorpos) poderiam pertencer a animais com infecção crônica. Domingues e colaboradores (1998) também realizaram uma avaliação comparativa entre IFAT e ELISA para o sorodiagnóstico da toxoplasmose canina, mostrando maior sensibilidade do ELISA indireto (62,5% de amostras soropositivas) comparado ao IFAT (46% de amostras soropositivas), inclusive na detecção de casos clínicos de toxoplasmose aguda.

Os resultados deste estudo (SILVA et al., 1997) permitiram concluir que dos testes sorológicos utilizados, IFAT e ELISA foram os métodos mais indicados enquanto IHAT foi o menos sensível e, portanto, um resultado negativo por IHAT deve ser cuidadosamente interpretado, já que a possibilidade da infecção por *T. gondii* não pode ser excluída. Assim, o diagnóstico da toxoplasmose em cães deve ser baseado em uma combinação de testes sorológicos, particularmente IFAT e ELISA, com ênfase na determinação dos títulos e classes de anticorpos específicos.

A seguir, uma síntese dos resultados e discussão dos estudos abordados nesta tese (estudos I a V) será apresentada e, maiores detalhes, incluindo tabelas e figuras, poderão ser visualizados nos respectivos artigos em Apêndices.

4.1 Estudo I

Optimisation of cut-off titres in *Toxoplasma gondii* specific ELISA and IFAT in dog sera using immunoreactivity to SAG-1 antigen as a molecular marker of infection

Há uma grande variação nas frequências de anticorpos anti-*T. gondii* em cães em todo o mundo, refletindo a diversidade de métodos sorológicos empregados, tamanho das amostras, bem como o tipo e período da população estudada. Ainda usando o mesmo teste sorológico, variações podem ocorrer devido aos diferentes valores de *cut off* estabelecidos e qualidade ou grau de purificação dos reagentes. Portanto, as diferenças em sensibilidade e especificidade dos diversos testes sorológicos empregados em diferentes laboratórios tornam difícil efetuar comparações entre soroprevalências de diferentes estudos.

Variações na prevalência da infecção por *T. gondii* em cães podem estar relacionadas a diferentes taxas reais de infecção ou a diferentes sensibilidades dos diversos testes utilizados e são estreitamente dependentes do título considerado como positivo nos testes sorológicos. Em nosso estudo prévio (SILVA et al., 1997), nós consideramos como critério de positividade para IHAT, IFAT e ELISA, o título ≥ 64 , com base em estudos soroepidemiológicos da infecção por *T. gondii* em cães. Entretanto, os critérios adotados para amostras de soro ser consideradas positivas diferem entre os diferentes estudos e testes sorológicos empregados. Além disso, é possível o isolamento de *T. gondii* em camundongos inoculados com tecidos de animais com baixos títulos de anticorpos (< 16) detectados por MAT e Sabin Feldman (DUBEY et al., 1989). Além disso, baixos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* podem refletir reatividade cruzada com outros parasitos Apicomplexa (GANLEY; COMSTOCK, 1980).

No estudo I, nós determinamos os títulos de *cut-off* ótimos para IFAT e ELISA na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de cães, considerando a reatividade a SAG1 (antígeno de superfície de *T. gondii*) em *immunoblotting* como marcador molecular da infecção. A proteína SAG1 (p30) é expressa especificamente por taquizoítas de *T. gondii* e é considerada como antígeno imunodominante do parasito (RODRIGUEZ et al., 1985). Das 212 amostras de soros de cães analisadas por IFAT e ELISA em diluições duplas seriadas a partir de 1:16 (IFAT) e 1:32 (ELISA), 117 (55,2%) foram concordantes reativas em ambos testes, 65 (30,7%) foram concordantes não-reativas e 30 (14,1%) tiveram resultados discordantes (reatividade somente em ELISA).

A sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) de IFAT e ELISA foram então determinadas para diferentes títulos de *cut-off* para cada teste usando a curva TG-ROC (GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995) e considerando a reatividade para SAG1 (p30) de *T. gondii* em

immunoblotting como marcador molecular da infecção. O ponto de intersecção das duas curvas (Se e Sp) indica o título de *cut off* no qual sensibilidade e especificidade se equivalem. Assim, títulos ótimos de *cut-off* foram obtidos para IFAT (16) e ELISA (64) (Fig. 1).

Amostras de soros concordantes reativas em ambos IFAT e ELISA sempre reconheceram o antígeno SAG1, e aquelas com baixos títulos de anticorpos (16 a 64) mostraram fraca reatividade. As amostras com maiores títulos (≥ 128) revelaram forte e consistente reatividade para SAG1 além do reconhecimento de outros antígenos (Tabela 1, Fig. 2). Soros de cães experimentalmente infectados com *T. gondii* também reconheceram consistentemente SAG1 enquanto soros controles negativos não reconheceram este antígeno (dados não mostrados). Nenhuma reatividade para SAG1 foi encontrada em amostras de soros concordantes não-reativas, embora algumas amostras reconheceram fracamente outros antígenos (Fig. 3), indicando uma provável reatividade cruzada com outros parasitos Apicomplexa devido a antígenos comuns, especialmente de micronemas e roptrias. Amostras com resultados discordantes incluíram soros com baixos títulos (16 a 64) que mostraram nenhuma ou fraca reatividade para SAG1, sugerindo reatividade cruzada com outros coccídeos.

A comparação entre os títulos de IFAT e a reatividade para SAG1 em *immunoblotting* revelou 84,4% de resultados concordantes (positivos e negativos), com apenas 5,2% de soros positivos em IFAT que não reconheceram SAG1 e, ao contrário, 10,4% de soros negativos em IFAT que mostraram fraca reatividade para SAG1. Resultados similares foram obtidos na comparação entre ELISA e *immunoblotting*, com 84% de resultados concordantes, somente 7,1% de soros positivos em ELISA sem reatividade para SAG1 e 8,9% de soros negativos em ELISA mostrando reatividade para SAG1.

Estes resultados permitiram concluir que a reatividade para SAG1 (p30) em *immunoblotting* mostrou ser uma poderosa ferramenta para determinar os títulos ótimos de *cut-off* em IFAT e ELISA e reforçam a combinação de testes sorológicos com ênfase na determinação dos títulos de anticorpos para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* em cães. Além disso, os dados apontam para estudos sobre a utilização de SAG1 purificada substituindo o antígeno total de *T. gondii* em testes sorológicos para um diagnóstico mais acurado da toxoplasmose canina. Neste contexto, Kimbita e colaboradores (2001) relataram a utilização de SAG1 recombinante purificada em ELISA para o sorodiagnóstico da infecção por *T. gondii* em gatos, mostrando claramente que o teste foi capaz de diferenciar entre soros de animais experimentalmente infectados e controles.



Short Communication

Optimisation of Cut-off Titres in *Toxoplasma gondii* Specific ELISA and IFAT in Dog Sera Using Immunoreactivity to SAG-1 Antigen as a Molecular Marker of Infection

N. M. SILVA, E. V. LOURENÇO, D. A. O. SILVA and J. R. MINEO

Laboratory of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, 38401-306, MG, Brazil

KEYWORDS: *Toxoplasma gondii*; dog; SAG-1 (p30); ELISA; IFAT.

Toxoplasma gondii is an Apicomplexan parasite that infects a broad range of hosts, including man and domestic animals. *T. gondii* infection in dogs is distributed worldwide, with prevalence rates ranging from 20% to 91% in the different countries (Dubey, 1985; Uggla *et al.*, 1990; Guimarães *et al.*, 1992). Clinical toxoplasmosis is less common, occurring usually in young dogs, and associated with immunosuppressive conditions or concomitant canine distemper virus (CDV) infection (Dubey *et al.*, 1989). Clinical signs can vary considerably and include neuromuscular, respiratory or gastrointestinal disorders and, the diagnosis of toxoplasmosis in dogs commonly needs to be supported by serological methods. However, the criteria adopted for serum samples to be considered positive differ between the different studies. Dilutions of 1:16, 1:20 or 1:64 have been used as cut off titres in the indirect fluorescence antibody test (IFAT) (Ahmed *et al.*, 1983; Maldonado *et al.*, 1986; Guimarães *et al.*, 1992) and 1:100 in the ELISA (Uggla *et al.*, 1990). Recently, we considered a titre of 1/64 to be positive in the IFAT, indirect haemagglutination (IHA) and ELISA (Silva *et al.*, 1997), but we did not know whether titres lower than this are specific for *T. gondii*.

SAG-1 protein (p30) is expressed specifically by the tachyzoite stage of *T. gondii* (Manger *et al.*, 1998) and is the immunodominant antigen of the parasite (Rodríguez *et al.*, 1985). The aim of the present study was to determine the optimal cut-off titres in *T. gondii*-specific ELISA and IFAT in dog sera by using reactivity to SAG-1 (p30) in Western blots as a molecular marker of infection.

A total of 212 serum samples, obtained from dogs admitted at the Veterinary Hospital, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Brazil, and from dogs captured by the Zoonosis Control Centre (ZCC), Uberlândia, Brazil, from January 1998 to January 1999 were analysed.

An indirect fluorescence antibody test (IFAT) was performed as described by Camargo (1964), with modifications. Slides with formalized tachyzoites attached were incubated with dog sera, diluted from 1:16 to 1:4096, and with a fluorescein isothiocyanate-labelled rabbit anti-dog IgG. Positive control sera were obtained from dogs experimentally infected with *T. gondii* (unpublished data), and negative control sera from healthy dogs previously tested by conventional serological assays (IHA, IFAT and ELISA).

An ELISA was carried out to detect IgG antibodies to *T. gondii* as described (Mineo *et al.*, 1980). Microtitre plates, coated with 10^5 tachyzoites/well, were incubated with dog sera, diluted from 1:32 to 1:32,768, and protein A-peroxidase. Enzymatic

Correspondence to: J. R. Mineo, Laboratory of Immunology, Campus Umuarama, Bl. 4C, Uberlândia-MG, 38401-306, Brazil; Phone: 55-34-3218-2195; Fax: 55-34-3218-2333; E-mail: jrmineo@ufu.br

activity was measured at 492 nm and samples showing absorbance values exceeding the mean absorbance of the negative controls plus two standard deviations were considered positive.

Western blots (WB) were performed to detect antigenic proteins of *T. gondii* recognized by dog sera, by using a soluble extract as antigen (Camargo *et al.*, 1989). Antigen preparations were homogenized in 4% sodium dodecyl sulphate and submitted to electrophoresis in a 15% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) as described (Laemmli, 1970), in parallel with molecular weight standards (Sigma), and transferred to nitrocellulose (Towbin *et al.*, 1979). Membrane strips were treated with 5% nonfat milk in PBS plus 0.05% Tween 20 to reduce non-specific labelling, followed by subsequent incubations with dog sera (1:100) and protein A-peroxidase (1:5,000). Positive and negative controls consisted of

mouse IgG1 monoclonal antibody to SAG-1 (clone 6E9), and normal mouse serum, respectively. The membranes were then treated with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.4% H₂O₂. Samples showing a detectable reactivity to SAG-1 (p30) were considered as positive by WB. The parameters of sensitivity and specificity were determined by using the two-graph ROC analysis (Greiner *et al.*, 1995).

The results of the initial screening for *T. gondii*-specific antibodies by IFAT and ELISA in 212 dog sera demonstrated that 117 were considered concordant reactive in both IFAT (titre $\geq 1/16$) and ELISA (titre $\geq 1/32$), 65 were concordant non-reactive, and 30 had discordant results (reactivity only in ELISA).

The reactivity to SAG-1 (p30) of *T. gondii*, determined by WB, was considered to be a molecular

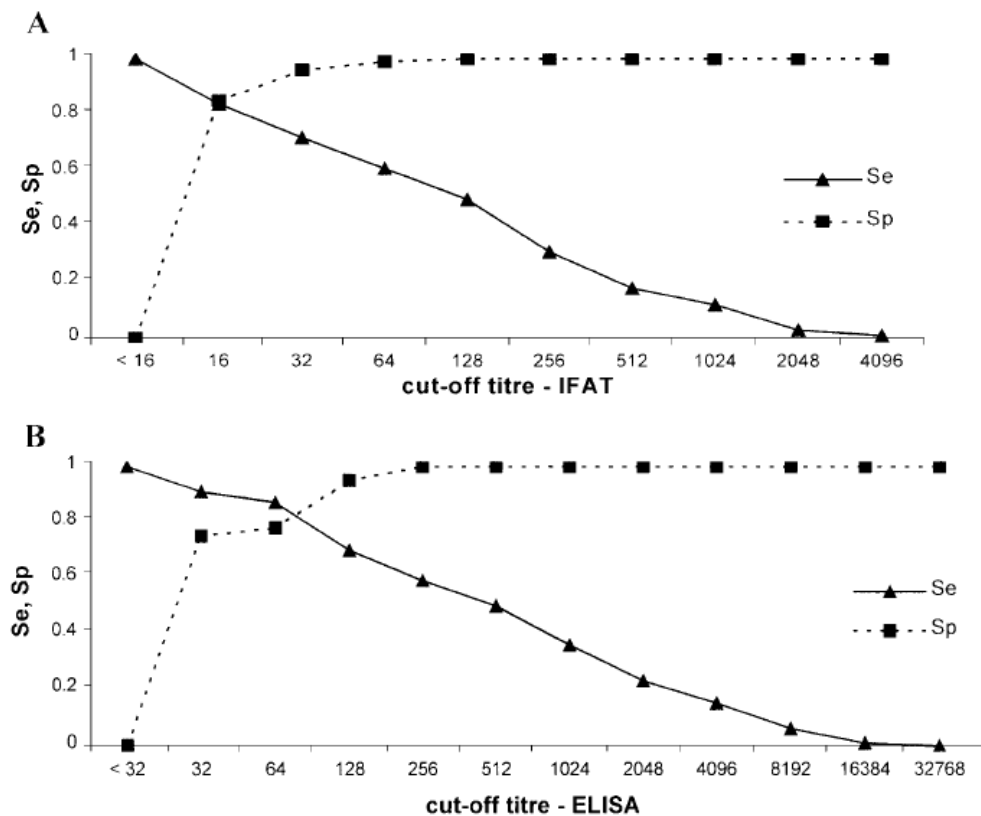


Fig. 1. TG-ROC analysis of the *Toxoplasma gondii* specific antibody ELISA and IFAT. Sensitivity (Se) and specificity (Sp) of IFAT (A) and ELISA (B) were determined for each cut-off titre, considering reactivity to SAG-1 (p30) in the Western blot to be a molecular marker of infection. The intersection point of the two curves (Se, Sp) of each test indicates the cut-off point at which equivalent sensitivity and specificity can be achieved.

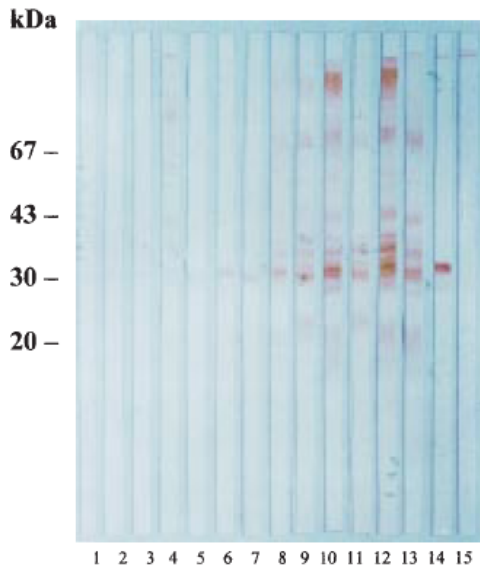


Fig. 2. Western blot of *T. gondii* antigens recognised by dog concordant reactive sera in both the IFAT and ELISA: lanes 1 to 3 (titres 1:16 to 1:64; weak SAG-1 reactivity); lane 4 (titre 1:64; weak reactivity to SAG-1 and other antigens); lanes 5 to 7 (titres 1:16 to 1:64; strong SAG-1 reactivity); lanes 8 to 13 (titres $\geq$ 1:128; strong reactivity to SAG-1 and other antigens); lane 14: monoclonal antibody anti-SAG-1 (positive control); lane 15: non-immune mouse serum (negative control).

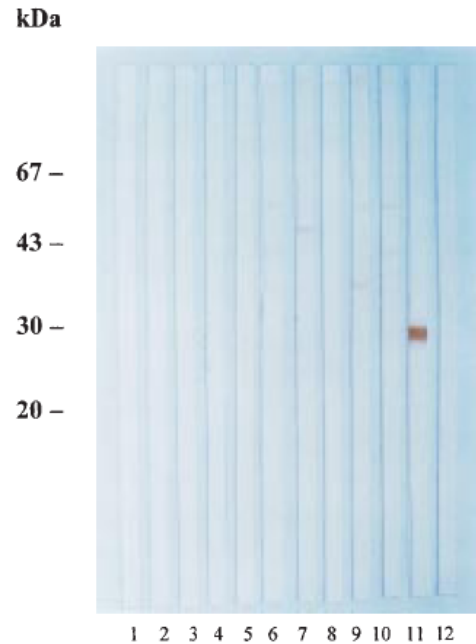


Fig. 3. Western blot of *T. gondii* antigens recognised by dog concordant non-reactive sera in both the IFAT and ELISA: lanes 1 to 5 (no SAG-1 reactivity); lanes 6 to 10 (no SAG-1 reactivity but weak reactivity to other antigens); lane 11: monoclonal antibody anti-SAG-1 (positive control); lane 12: non-immune mouse serum (negative control).

marker of infection and to provide a reference for evaluating the sensitivity and specificity of the IFAT and ELISA by determining the cut-off titres of these assays. At first, sensitivity and specificity were determined for different cut-off titres for each test using the two-graph ROC analysis (TG-ROC). The intersection point of the two curves of IFAT (Fig. 1A) and ELISA (Fig. 1B) indicates the cut-off point at which equivalent sensitivity and specificity can be achieved. Thus, an optimisation of cut-off titres was obtained with a titre of 1/16 in the IFAT and 1/64 in the ELISA.

Concordant reactive samples in both IFAT and ELISA, with low titres (1/16 to 1/64), always recognised the 30 kDa band. Some samples also detected other *T. gondii* antigens (Fig. 2, lanes 1 to 7). All samples with high titres ($\geq$ 1/128) exhibited consistent and strong reactivity to SAG-1, in addition to other epitopes (Fig. 2, lanes 8 to 13). All concordant non-reactive sera showed no reactivity to SAG-1 (Fig. 3, lanes 1 to 10), although some of them weakly recognised other epitopes (Fig. 3, lanes 6 to 10). These findings could be illustrating cross-reactivity

to other Apicomplexan parasites due to common microneme and rhoptry antigens (Ganley & Comstock, 1980). Thus, it is concluded that these animals were probably not infected by *T. gondii*.

Samples with discordant results included sera with low titres (1/16 to 1/64) that showed either no reactivity to SAG-1 with weak recognition of other *T. gondii* epitopes, or weak reactivity to SAG-1 and other proteins (data not shown). Low titres of antibodies against *T. gondii* can be present either in a latent infection or may represent cross-reactivity to other coccidian parasites (Ganley & Comstock, 1980).

As shown in Table I, sera that recognised SAG-1 antigen either weakly or not at all were those that had the lowest titres ($\leq$ 1/32 in the IFAT and $\leq$ 1/64 in the ELISA). In contrast, the number of samples strongly reactive to SAG-1 increased when the titres also increased ($\geq$ 1/64 in the IFAT and $\geq$ 1/128 in the ELISA).

Once the cut-off titres were optimised, the comparison between IFAT titres and SAG-1 reactivity demonstrated that 179 out of 212 sera (84.4%)

Table I
Reactivity to the SAG-1 (p30) antigen of *Toxoplasma gondii* by Western blot
according to the antibody titres obtained by the IFAT and ELISA in
212 dog sera

Antibody titre	Number of samples	SAG-1 (p30) reactivity		
		None	Weak	Strong
IFAT				
<16	85	63 (74.1%)	16 (18.8%)	6 (7.1%)
16	25	8 (32.0%)	5 (20.0%)	12 (48.0%)
32	17	2 (11.8%)	4 (23.5%)	11 (64.7%)
64	16	1 (6.3%)	0	15 (93.7%)
128	26	0	1 (3.8%)	25 (96.2%)
256	18	0	0	18 (100.0%)
512	9	0	0	9 (100.0%)
1024	12	0	0	12 (100.0%)
2048	3	0	0	3 (100.0%)
4096	1	0	0	1 (100.0%)
ELISA				
<32	63	50 (79.4%)	12 (19.0%)	1 (1.6%)
32	8	2 (25.0%)	2 (25.0%)	4 (50.0%)
64	37	12 (32.4%)	16 (43.2%)	9 (24.3%)
128	18	3 (16.7%)	4 (22.2%)	11 (61.1%)
256	14	0	1 (7.1%)	13 (92.9%)
512	19	0	0	19 (100.0%)
1024	20	0	0	20 (100.0%)
2048	11	0	0	11 (100.0%)
4096	14	0	0	14 (100.0%)
8192	6	0	0	6 (100.0%)
16384	1	0	0	1 (100.0%)
32768	1	0	0	1 (100.0%)

showed concordant positive and negative results in both tests (WB and IFAT) (Table I). Only 11 (5.2%) of the positive IFAT sera ($\geq 1/16$) did not recognise SAG-1, and 22 (10.4%) of the negative IFAT sera ($< 1/16$) showed reactivity to SAG-1 (Table I). Similarly, when comparing ELISA titres and SAG-1 reactivity, 178 out of 212 sera (84.0%) presented concordant positive and negative results in both tests (WB and ELISA). Only 15 (7.1%) of positive ELISA sera ($\geq 1/64$) did not react to SAG-1, and 19 (8.9%) of negative ELISA sera ($< 1/64$) showed reactivity to SAG-1.

Comparisons with seroprevalence rates of canine toxoplasmosis obtained from various studies have not proved reliable, due to differences in sensitivity and specificity of different serologic tests (Dubey, 1985). It has been reported that it is possible to isolate *T. gondii* in mice inoculated with tissues from dogs in spite of a low antibody titre ($< 1/16$) with the

modified agglutination test (MAT) and the dye test to the parasite (Dubey *et al.*, 1995). Therefore, caution is necessary when interpreting results of serological assays, if seeking to establish a confident diagnosis of *Toxoplasma* infection. Anti-SAG-1 (p30) antibody is a powerful tool for detecting a specific reactivity to *T. gondii* (Cole *et al.*, 1994). Reactivity to SAG-1 in the WB could help to clarify doubtful results. Accordingly, we observed that sera from dogs experimentally infected with *T. gondii* showed a consistent reactivity to SAG-1 (p30) in the WB, and no reactivity to this protein was found in serologically non-reactive control dogs (unpublished data). In addition, our previous studies on molecular markers in human toxoplasmosis showed that SAG-1 was always recognised by sera of both chronically and acutely infected subjects (Marcolino *et al.*, 2000).

In conclusion, all positive samples in both the IFAT and ELISA, even with low antibody titres,

showed reactivity to SAG-1 in the WB and samples with higher titres exhibited a consistent and strong reactivity to this antigen. Additionally, no reactivity to SAG-1 was found in samples negative in both tests (IFAT and ELISA). Some samples that were positive in either IFAT or ELISA had low antibody titres and showed either no or a weak reactivity to SAG-1, suggesting cross-reactivity with other coccidia or reflecting that, at low titres there are serological tests unable to detect infection in dogs.

Our results suggest that the reactivity to SAG-1 (p30) antigen in the WB proved to be a useful tool for optimising the setting of cut off titres in the IFAT and ELISA. Thus, further studies are needed in order to evaluate the performance of other serological tests using purified SAG-1 rather than total antigen of *T. gondii* to diagnose with more accuracy the canine toxoplasmosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Fernando Antônio Ferreira from Veterinary Hospital, UFU, and Dr. Adalberto de Albuquerque Pajuaba Neto from Zoonosis Control Center, Uberlândia, Brazil by the aid in sera collection. This work was supported by grants from Brazilian Research Councils (CNPq, CAPES and FAPEMIG).

REFERENCES

- AHMED, B. A., GAAFA, S. M., WEIRICH, W. E. & KANITZ, C. L. (1983). Relationship of *Toxoplasma* infections to other diseases. *Veterinary Parasitology* **12**, 199–203.
- CAMARGO, M. E. (1964). Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **6**, 117–8.
- CAMARGO, M. E., MOURA, M. E. & LESER, P. G. (1989). Toxoplasmosis serology: an efficient haemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **31**, 279–85.
- COLE, R. A., LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P., TOIVIO-KINNUNAN, M. A. & BLAGBURN, B. L. (1994). Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* tachyzoites by use of Western blot analysis and immunoelectron microscopy. *American Journal of Veterinary Research* **55**, 1717–22.
- DUBEY, J. P. (1985). Toxoplasmosis in dogs. *Canine Practice* **12**, 7–28.
- DUBEY, J. P., CARPENTER, J. L., TOPPER, M. J. & UGGLA, A. (1989). Fatal toxoplasmosis in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* **25**, 659–64.
- DUBEY, J. P., METZGER, F. L. JR., HATTEL, A. L., LINDSAY, D. S. & FRITZ, D. L. (1995). Case report. Canine cutaneous neosporosis: clinical improvement with clindamycin. *Veterinary Dermatology* **6**, 37–43.
- GANLEY, J. P. & COMSTOCK, G. W. (1980). Association of cats and toxoplasmosis. *American Journal of Epidemiology* **111**, 238–46.
- GREINER, M., SOHR, D. & GÖBEL, P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *Journal of Immunological Methods* **185**, 123–32.
- GUIMARÃES, A. M., RIBEIRO, M. F. B., LIMA, J. D., CURY, M. C. & SPIEWAK, G. (1992). Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* **44**, 67–8.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
- MALDONADO, J. L., CAMPOS-BUENO, M., MAÑAS-ALMENDROS, I. & REYES-MAGAÑA, A. (1986). Estudio seroepidemiológico de la toxoplasmosis canina en la provincia de Granada. *Revista Iberoamericana de Parasitología* **46**, 185–8.
- MANGER, I. D., HEHL, A. B. & BOOTHROYD, J. C. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infection and Immunity* **66**, 2237–44.
- MARCOLINO, P. T., SILVA, D. A. O., LESER, P. G., CAMARGO, M. E. & MINEO, J. R. (2000). Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blot. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **7**, 384–9.
- MINEO, J. R., CAMARGO, M. E. & FERREIRA, A. W. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. *Infection and Immunity* **27**, 283–7.
- RODRIGUEZ, C., AFCHAIN, D., CAPRON, A., DISSOUS, C. & SANTORO, F. (1985). Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *European Journal of Immunology* **15**, 747–9.
- SILVA, D. A. O., CABRAL, D. D., BERNARDINA, B. L. D., SOUZA, M. A. & MINEO, J. R. (1997). Detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in dogs. A comparative study of immunoenzymatic, immunofluorescent and haemagglutination titers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **92**, 785–9.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **76**, 4350–6.
- UGGLA, A., MATTSO, S. & JUNTIL, N. (1990). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats, dogs and horses in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* **31**, 219–22.

(Accepted for publication 7 July 2001)