LUCIANA REGINA MEIRELES

ESTUDO DAS FONTES DE INFECÇÃO DA
TOXOPLASMOSE HUMANA EM
DIFERENTES LOCALIDADES DO ESTADO
DE SÃO PAULO

Dissertação apresentada ao
Departamento de Parasitologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2001

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Meireles, Luciana Regina.

Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo / Luciana Regina Meireles. -- São Paulo, 2001.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Parasitologia.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Linha de pesquisa: Toxoplasmose.

Orientador: Andrade Júnior, Heitor Franco de.

Versão do título para o inglês Study of the sources of human toxoplasma infection in São Paulo state, Brazil.

Descritores: 1. Toxoplasmose 2. Prevalência sorológica 3. ELISA 4. Avidéz de anticorpos 5. Animais de produção 6. Gatos

ICB/SBIB013/2001

Candidata: LUCIANA REGINA MEIRELES
Título da Dissertação: Estudo das fontes de infecção da Toxoplasmose Humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo

À Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou a candidata:

() Aprovada () Reprovada

1) Examinador (a)_____

2) Examinador (a)_____

3) Presidente _____

Esta dissertação é dedicada aos meus afilhados, Caio e
Luiza

*"Se não houver frutos, valeu a
beleza das flores; se não houver
flores, valeu a sombra das folhas; se
não houver folhas, valeu a intenção
da semente"*

Henfil

Agradecimentos especiais

Aos meus pais, por tudo

À minha irmã Teresa, pela amizade

Ao Cláudio, pelo amor, carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, pela orientação, dedicação e atenção dispensada na execução deste trabalho.

Ao Prof. Adjunto Hélio Langoni, pela amizade, orientação na Residência Veterinária em Zoonoses e Saúde Pública, que muito contribui para minha formação científica, e pelas valiosas sugestões neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Denise Lopes, pelo carinho, amizade, e auxílio durante toda a minha formação acadêmica.

À Roselaine Pereira Alvim Cardoso e Isabel Cristina Alves, técnicas do Laboratório de Protozoologia, pelo auxílio técnico durante a realização deste trabalho.

A Andrés Jimenez Galisteo Jr, pelo auxílio durante todas as fases deste trabalho.

À Francisca Lúcio de Oliveira, pela atenção e auxílio na preparação dos materiais utilizados no laboratório, durante a realização deste trabalho.

Ao Cleiton Alves, técnico do Laboratório de Dermatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelas preparações histológicas.

À Lúcia Maria Almeida Braz, técnica do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela atenção e auxílio na pesquisa e identificação de oocistos.

Ao Médico Veterinário Eduardo Pompeu, pelo fornecimento e coleta das amostras de cães do biotério da Faculdade de Medicina da USP.

Ao Médico Veterinário Reinaldo V. Righeto, pelo fornecimento e coleta das amostras de bovinos de Taquarituba.

À Médica Veterinária Maria Cristina Casaqui Carollo, pela amizade, e pelo auxílio nas colheitas das amostras de gatos.

A todos os funcionários da UIPA (União Internacional de Proteção Animal) que auxiliaram na colheita das amostras de gatos.

À Profa. Dra. Eufrozina S. Umezawa pelo empréstimo de materiais utilizados neste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo) e ao laboratório de Investigação Médica (LIM 49) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Aos membros da banca do Exame de Qualificação, Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira, Prof. Dr. Igor Correia de Almeida e Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano pelas críticas e sugestões ao presente trabalho.

À todos do Laboratório de Protozoologia, em especial ao “Clube da Luluzinha”, pelo apoio e amizade durante toda a realização deste trabalho.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A toxoplasmose é uma protozoose de alta prevalência no Brasil, causada pelo *Toxoplasma gondii*, sendo transmitida pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos, excretados em fezes de felinos, ou cistos, em carnes cruas ou mal cozidas. A doença é usualmente assintomática, mas em fetos ou pacientes com imunodepressão, pode ser devastadora. Neste trabalho, estudamos a prevalência sorológica da infecção em animais de diferentes regiões do estado de São Paulo, tanto de vida livre, cães (200/ABC) como indicadores ambientais, e gatos (100/São Paulo) como hospedeiros definitivos, e em animais de produção, bovinos (200/Taquarituba), suínos (200/Osasco), caprinos (200/Botucatu), ovinos (200/São Manuel) e frangos de corte (185/Botucatu), além de estudos parasitológicos em gatos e águas sob suspeita. Foram padronizados ELISA para cada espécie animal, utilizando índices adequados e reprodutíveis, com confirmação por Western Blotting e determinação da avididade em amostras positivas. A prevalência da toxoplasmose animal foi determinada sendo crescente em suínos (8.5%), bovinos (11%), caprinos (17%), ovinos (31%), felinos (40%) e cães (50,5%), não sendo encontrada em frangos de corte. Em suínos, caprinos, cães e gatos, a frequência de anticorpos de baixa avididade sugere que a transmissão da infecção é constante durante a vida do animal, mas em bovinos e ovinos não foram encontrados anticorpos de baixa avididade, sugerindo infecção precoce ou sazonal na vida do animal. Pela alta taxa de infecção recente em felinos, é possível prever uma fração significativa de animais excretando oocistos, embora sem comprovação parasitológica. A avaliação da presença de anticorpos anti-*T.gondii* deve ser criteriosa, sendo que os reagentes de hemaglutinação para uso humano fornecem resultados erráticos nesta medida. A pesquisa de oocistos na água é de baixa sensibilidade, devendo ser feita em materiais colhidos no período de suspeita da transmissão. Em São Paulo, o risco de transmissão da toxoplasmose está relacionado a quase todas as fontes de infecção pesquisadas, tornando necessários estudos para o melhor manejo dos animais de consumo humano e tratamento de água, com eliminação de gatos errantes.

ABSTRACT

Toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii* and highly prevalent protozoan disease in Brazil, is mainly transmitted by ingestion of contaminated food and water, both by oocysts, excreted in cat feces, or cysts from undercooked meat from warm-blooded animals. Usually asymptomatic, it is extremely severe in the fetus or immunosuppressed patients. In this work, we studied the serological prevalence of toxoplasmosis in animals from several regions of the São Paulo State, both free living, as dogs (ABC) as environmental contamination index, and cats (São Paulo, as definitive hosts, or livestock as cattle (Taquarituba), swine (Osasco), goats (Botucatu), sheep (São Manuel) and fowls (São Paulo), with parasitological studies in cats and suspicious drinking water. We standardized ELISA for each species, using reproducible and adequate indexes, with Western blot confirmation and avidity assays in positive samples. Toxoplasmosis prevalence was increasing in swine (8.5%), cattle (11%), goats (17%), sheep (31%), cats (40%) and dogs (50.5%), without positive sample in fowls. Goats, pigs, dogs and cats presented 5-20% low avidity antibody samples, suggesting sustained transmission during animal life, but cattle and sheep presented only high avidity samples, suggesting an seasonal or early in life infection. Due to the high recent infection rate in cats, it is possible to preview a significant oocyst excreting cat frequency, despite parasitological evidence. Antibody determination must be carefully evaluated, as human hemagglutination reagents give erratic information. Oocyst detection in drinking water presented very low sensitivity and must be performed only in water collected at the period of the infection.

In São Paulo, almost all of tested sources are able of toxoplasmosis transmission, reinforcing the need of better management of livestock, adequate water treatment and elimination of free living cats.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Histórico.....	4
2.2. O Agente.....	5
2.2.1. Taxonomia.....	5
2.2.2. Ciclo de vida e características biológicas.....	5
2.2.3. Bioquímica do Parasita.....	8
2.2.4. Formação dos Vacúolos Parasitários.....	11
2.3. Resposta Imunológica ao <i>T.gondii</i>	12
2.4. Aspectos Epidemiológicos.....	15
2.4.1. Prevalência.....	15
2.4.2. Transmissão.....	17
2.5. Toxoplasmose Humana.....	18
2.6. Toxoplasmose Animal.....	20
2.7. Diagnóstico.....	29
2.8. Tratamento e Imunização.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Áreas de Estudo.....	40
4.2. Animais.....	44
4.2.1. Animais de Produção.....	44
4.2.2. Cães e Gatos Não Domiciliados.....	45
4.3. Parasitas.....	45
4.3.1. Obtenção da suspensão parasitária.....	45
4.3.2. Purificação dos parasitas.....	47
4.3.3. Preparo do extrato antigênico solúvel.....	48
4.3.4. Preparo do antígeno formolizado para reação de Imunofluorescência Indireta.....	50
4.4. Soros.....	51
4.5. Conjugados.....	52
4.6. Sorologia.....	52
4.6.1. Imunofluorescência Indireta.....	52
4.6.2. ELISA.....	53
4.6.3. Western Blotting.....	56
4.6.4. Hemaglutinação Indireta.....	57
4.7. Isolamento do Agente.....	57
4.8. Infecção Experimental em Frangos de corte.....	60
4.9. Análise dos dados.....	61
5. RESULTADOS.....	62
5.1. Parasitas.....	62

5.2. Conjugados.....	63
5.3. Sorologia.....	64
5.3.1. ELISA.....	64
5.3.1.1. Animais de Produção.....	64
5.3.1.2. Cães e Gatos Não Domiciliados.....	71
5.3.1.3. Reprodutibilidade do ELISA.....	74
5.3.1.4. Variabilidade Interplaca dos Controles Negativo, Positivo e Limiar.....	76
5.3.1.5. Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	77
5.3.1.5.1. Animais de Produção.....	77
5.3.1.5.2. Cães e Gatos Não Domiciliados.....	81
5.3.2. Hemaglutinação Indireta.....	84
5.3.2.1. Animais de Produção.....	84
5.3.2.2. Cães e Gatos Não Domiciliados.....	92
5.3.3. Western Blotting.....	96
5.4. Infecção Experimental em Frangos de corte.....	97
5.5. Isolamento do Agente.....	98
5.5.1. Detecção de oocistos de <i>T.gondii</i> em fezes de gato.....	98
5.5.2. Detecção de oocistos de <i>T.gondii</i> em água potável.....	99
6. DISCUSSÃO.....	100
7. CONCLUSÃO.....	111
7.1. Gerais.....	111
7.2. Específicas.....	111
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema do ciclo de vida do <i>T.gondii</i> com as várias fontes de infecção humana e animal.....	10
FIGURA 2: Localização das áreas de estudo no Estado de São Paulo.....	43
FIGURA 3: Perfil da mobilidade eletroforética e constituintes protéicos de <i>T.gondii</i> purificado. (A) Padrão de baixo peso molecular. (B) Amostra de <i>T.gondii</i>	62
FIGURA 4: Distribuição dos soros bovinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.....	65
FIGURA 5: Distribuição dos soros ovinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.....	66
FIGURA 6: Distribuição dos soros caprinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.....	68
FIGURA 7: Distribuição dos soros de frangos de corte de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança. As barras laterais, vermelha e azul, correspondem, respectivamente, aos resultados do ELISA analisado pelo IR e por U para as amostras dos animais infectados experimentalmente.....	69
FIGURA 8: Distribuição dos soros suínos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.....	70
FIGURA 9: Distribuição dos soros caninos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.....	72
FIGURA 10: Distribuição dos soros felinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.....	73
FIGURA 11: Reprodutibilidade intratestes do ELISA para amostras bovinas (A), ovinas (B), caprinas (C), suínas (D), frangos de corte (E), caninas (F), e felinas (G).....	74

FIGURA 12: Reprodutibilidade interteste do ELISA para amostras bovinas (A), ovinas (B), caprinas (C), suínas (D), frangos de corte (E), caninas (F), e felinas (G).....	75
FIGURA 13: Variabilidade interplaca dos controles negativo, positivo e limiar.....	76
FIGURA 14: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros bovinos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz de anticorpos.....	78
FIGURA 15: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros ovinos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz de anticorpos.....	79
FIGURA 16: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros caprinos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz e os vermelhos, as amostras de baixa avidéz de anticorpos.....	80
FIGURA 17: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros suínos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz e os vermelhos, as amostras de baixa avidéz de anticorpos.....	81
FIGURA 18: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros caninos. O círculo azul representa a amostra de alta avidéz e os vermelhos, as amostras de baixa avidéz de anticorpos.....	82
FIGURA 19: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros felinos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz e os vermelhos, as amostras de baixa avidéz de anticorpos.....	83
FIGURA 20: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras bovinas. As barras representam intervalo de confiança de 95%.....	85
FIGURA 21: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras ovinas. As barras representam intervalo de confiança de 95%.....	87
FIGURA 22: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras caprinas. As barras representam intervalo de confiança de 95%.....	89
FIGURA 23: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de frangos de corte. As barras representam intervalo de confiança de 95%.....	90
FIGURA 24: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de suínos. As barras representam intervalo de confiança de 95%.....	92
FIGURA 25: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de cães. As barras representam intervalo de confiança de 95%.....	94
FIGURA 26: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de gatos. As barras representam intervalo de confiança de 95%.....	96

FIGURA 27: Prevalência de anticorpos anti-T.gondii, detectados pelo ELISA e confirmados para as diferentes espécies estudadas.....97

FIGURA 28: Resultados de infecção experimental de galinhas com a cepa RH de *Toxoplasma gondii*.....98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros bovinos.....	64
TABELA 2: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros ovinos.....	66
TABELA 3: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros caprinos.....	67
TABELA 4: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros de frangos de corte.....	68
TABELA 5: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros suínos.....	70
TABELA 6: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros de cães.....	71
TABELA 7: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros de gatos.....	73
TABELA 8: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros bovinos.....	77
TABELA 9: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros ovinos.....	78
TABELA 10: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros caprinos.....	79
TABELA 11: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros suínos.....	80
TABELA 12: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros de cães.....	82
TABELA 13: Avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros de gatos.....	83
TABELA 14: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de anti-IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros bovinos.....	84
TABELA 15: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação ao ELISA analisado pelo IR e por U para bovinos	85
TABELA 16: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de anti-IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros ovinos.....	86

TABELA 17: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação ao ELISA analisado pelo IR e por U para ovinos.....	86
TABELA 18: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de anti-IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros caprinos.....	87
TABELA 19: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação ao ELISA analisado pelo IR e por U para caprinos.....	88
TABELA 20: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de anti-IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros de frangos de corte.....	89
TABELA 21: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de anti-IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros suínos.....	91
TABELA 22: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação ao ELISA analisado pelo IR e por U para suínos.....	91
TABELA 23: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de anti-IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros caninos.....	93
TABELA 24: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação ao ELISA analisado pelo IR e por U para cães.....	93
TABELA 25: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de anti-IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros felinos.....	95
TABELA 26: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação ao ELISA analisado pelo IR e por U para felinos.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\geq$	Maior ou igual
μl	Microlitros
AIDS/SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do original em inglês: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
HI	Hemaglutinação Indireta
WB	Western Blotting
IA	Índice de avidéz
IR	Índice de reatividade
U	Unidades
DO	Densidade óptica
SLR	Soro Limiar de Reatividade
IFI	Imunofluorescência Indireta
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
Gy	Gray (dose de radiação)
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (do original em inglês: Polymerase Chain Reaction)
pH	Potencial hidrogeniônico
SDS	Sódio-duodecil-sulfato
SF	Sabin-Feldman
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano hidroclórico
v/v	Volume a volume
2-ME	2-mercaptoetanol
4-Cl-1-N	4-cloro-1-naftol
H_2O_2	Água oxigenada 30%
USP	Universidade de São Paulo
IFN_{γ}	Interferon-gama
PBS	Salina tamponada com fosfatos
UIPA	União Internacional de Proteção Animal
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
μg	Microgramas
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBST	Unidade Internacional
μm	Micrômetros

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma infecção humana discreta, que atinge mais de 60% da população adulta de São Paulo (GUIMARÃES et al, 1993). Causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário do filo Apicomplexa intracelular obrigatório (DUBEY & BEATTIE, 1988), é geralmente assintomática, mas causa doença ocular significativa em pelos menos 2-3% dos pacientes sintomáticos (ROBERTS & McLEOD, 1999) e, quando ocorre na ausência de resposta imune efetiva, causa doença devastadora do sistema nervoso central, como em fetos de mães com infecção aguda ou em pacientes com AIDS ou submetidos a transplantes, levando a morte ou seqüelas significantes (REMYINGTON et al, 1995; AMATO NETO et al, 1995). Além disso, a infecção assintomática foi associada a alterações de comportamento humano, em estudos controversos (FLEGR et al, 1996). Por se tratar de uma doença discreta, a grande maioria das infecções agudas passa despercebida pelo paciente e pelo médico. Excetuando-se grupos de risco, como gestantes ou imunossuprimidos, a maioria dos pacientes não recebe terapêutica específica.

A transmissão da infecção está relacionada a presença ambiental de felinos, hospedeiros definitivos de um ciclo vital complexo que envolve todos os animais de sangue quente como hospedeiros intermediários, de aves a golfinhos, passando por todos os animais de produção de carne (INSKEEP et al, 1990; DUBEY, 1994). Estes hospedeiros albergam cistos teciduais latentes por toda a vida, causando mínima patologia ao animal e completando o ciclo quando estes se tornam presas de felinos. Estes, após digerirem os cistos, são infectados e produzem formas ambientais resistentes, eliminadas nas fezes durante as primeiras semanas da infecção, os oocistos, que podem permanecer por meses ou anos no ambiente (DUBEY & FRENKEL, 1972) e ao se aderirem ao pasto, contaminarem a água ou vegetais, infectam os novos hospedeiros intermediários completando o ciclo. Isto explica porque populações vegetarianas estritas tem a mesma incidência de toxoplasmose que omnívoros e carnívoros da mesma região (RAWAL, 1959), enquanto que carnívoros de regiões sem felinos desconhecem a infecção (WALLACE, 1969).

A doença seria facilmente controlável se as fontes de infecção, tanto animais de produção como o ambiente, fossem adequadamente monitorados. Contudo, devido ao caráter discreto da doença, os estudos de monitorização contínua da transmissão da toxoplasmose são escassos mesmos em países de alta prevalência como a França (DESMONTS & COUVREUR, 1974).

Em nosso meio, os estudos de avaliação são geralmente restritos a uma espécie animal e ao impacto que a toxoplasmose causa naquela produção específica. Poucos estudos ambientais, se algum, são relatados, estes provavelmente devido a baixa prevalência ambiental, alta infectividade e disseminação do agente por grandes volumes na sua forma de resistência ambiental, o que leva a uma baixíssima sensibilidade. Basta um oocisto para infectar um animal pequeno, como um roedor ou uma criança, e isto pode estar suspenso em 200 ou mais litros de água de beber ou em uma área de 10 m² de terreno. As novas técnicas de biologia molecular, utilizando PCR podem ajudar no aumento da sensibilidade, mas o custo de monitoração é proibitivo.

Assim, na maioria dos poucos estudos existentes, a abordagem utilizada está voltada para a determinação sorológica da infecção pregressa do animal destinado ao consumo humano ou de parceiros ambientais, como o cão doméstico. Os estudos são geralmente transversais, em populações pequenas e utilizando técnicas sorológicas com comparação complexa, utilizando na maioria das vezes, apenas uma técnica e sem previsão da época de infecção do animal testado.

Recentemente, a avidéz de anticorpos do tipo IgG permitiu, em estudos humanos (CAMARGO et al, 1991; BERTOZZI et al, 1999), estimar indiretamente o tempo de infecção, utilizando o mesmo ensaio empregado para a determinação da presença de anticorpos, permitindo inclusive a avaliação de eficácia vacinal com uma única amostra.

Neste estudo, pretendemos avaliar as fontes de infecção para a toxoplasmose humana no Estado de São Paulo, através de estudo da prevalência sorológica e da avidéz de anticorpos em dois grupos de animais. O primeiro, relacionado a contaminação ambiental, será composto do estudo transversal de hospedeiros definitivos, os gatos, com estudos parasitológicos e sorológicos, com estimativa do período de infecção através da determinação de

avidez, associado a um outro grupo de animais, os cães errantes, que estão expostos a todos os riscos ambientais de aquisição da toxoplasmose. No segundo grupo de animais, incluímos os animais produtores de carne mais freqüentemente utilizados para consumo humano em São Paulo, como bois, suínos, ovinos, caprinos e frangos de corte, onde a prevalência da infecção sorológica associada a determinação da avidez para estimativa da época da infecção, e a participação de cada um deles na complexa transmissão da toxoplasmose. Finalmente, pretendemos tentar avaliar a contaminação de água em sítios sob suspeita desta via de transmissão da toxoplasmose.

Extrapolações de prevalência ou incidência da toxoplasmose e sua fontes de infecção em um único estudo transversal devem ser cautelosamente avaliadas, mas isso não interfere no valor da medida, principalmente quando existe uma carência enorme de estudos na área, que deveriam ser de responsabilidade de órgãos específicos governamentais de controle de alimentos, sendo que nosso estudo fornece dados transversais com o desenvolvimento de tecnologias que permitirão os estudos seqüenciais necessários para o controle desta importante protozoose humana.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

O *Toxoplasma* foi descoberto simultaneamente por SPLENDORE em 1908, num coelho de laboratório em São Paulo, no Brasil, e por NICOLLE & MANCEAUX, no *gondii*, roedor africano então usado na pesquisa da leishmaniose no Instituto Pasteur de Túnis. O parasita, inicialmente considerado por esses autores como pertencente ao gênero *Leishmania*, foi caracterizado em 1909 por NICOLLE & MANCEAUX como uma nova espécie, o *Toxoplasma gondii*.

As primeiras implicações de *Toxoplasma gondii* em afecções humanas datam de 1923, quando este parasita teria sido relacionado à ocorrência de cistos oculares em uma criança de 11 meses com hidrocefalia, por JANKU, em Praga. Pouco depois, em 1927, TORRES no Rio de Janeiro descrevia a presença do microorganismo em cortes histológicos de musculatura cardíaca e esquelética e de cérebro de recém-nascido falecido com 29 dias de vida, iniciando especulações acerca da possibilidade de ocorrência da doença congênita. Dez anos mais tarde, em 1937, WOLF & COWEN descreviam a doença congênita causada pelo *Toxoplasma* e, na década de 40, PINKERTON & WEINMAN (1940) e PINKERTON & HENDERSON (1941) relatavam a toxoplasmose aguda em adultos (AMATO NETO et al, 1995).

Entretanto, a frequência da infecção humana só foi conhecida a partir de 1948 com a introdução do clássico teste do corante de SABIN & FELDMAN. Tal reação contribuiu tanto para a realização de inquéritos epidemiológicos quanto para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose. Neste mesmo ano, FRENKEL inseriu a prova de sensibilidade cutânea à toxoplasmina no reconhecimento da parasitose. A partir de 1957 foi introduzida a reação de hemaglutinação por JACOBS & LUNDE e, em 1962, a imunofluorescência indireta por KELEN et al (AMATO NETO et al, 1995).

Em 1965, HUTCHISON observou uma forma infectante e resistente do *Toxoplasma* nas fezes do gato e estudos posteriores demonstraram o ciclo sexuado no intestino deste felídeo, indicando assim, o hospedeiro definitivo do *Toxoplasma gondii*.

2.2. O AGENTE

2.2.1. TAXONOMIA

O nome do gênero é derivado de *Toxon*, palavra grega que significa arco e se refere à forma que os taquizoítos apresentam *in vitro*. O nome da espécie deriva do roedor *Ctenodactylus gondii*, do qual o *T.gondii* foi isolado pela primeira vez. O *T.gondii* pertence ao REINO Protista, SUBREINO Protozoa, FILO Apicomplexa, CLASSE Sporozoea, SUBCLASSE Coccidia, ORDEM Eucoccidiida, SUBORDEM Eimeriina, FAMÍLIA Sarcocystidae, SUBFAMÍLIA Toxoplasmatinae, GÊNERO Toxoplasma, ESPÉCIE (única) gondii.

2.2.2. CICLO DE VIDA E CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

O *T. gondii*, eucarioto intracelular obrigatório, já foi isolado em vários tecidos vivos e células nucleadas e, em líquidos orgânicos, como sangue, linfa, saliva, leite (colostro), exsudatos, esperma e líquido peritoneal (NEVES, 1985; DINIZ et al, 1991; AMATO NETO et al, 1995). O parasita é capaz de invadir e se multiplicar, ainda, em eritrócitos imaturos de mamíferos, cultura de células de peixes e insetos (KASPER & MINEO, 1994), podendo ser facilmente mantido em diversas culturas celulares ou passagens em animais (PARK et al, 1993).

Estruturalmente, o agente apresenta anel polar, conóide, microtúbulos, micronemas, microporo, grânulos densos, roptrias e membrana tripla (uma externa contínua e duas internas descontínuas) características próprias que o

difere de outros protozoários. Cada uma destas estruturas é formada por proteínas relacionadas com a invasão, formação do vacúolo parasitóforo e manutenção do parasita no interior da célula hospedeira (DUBEY, 1993; SMITH, 1995).

O ciclo vital do *T. gondii* (Figura 1) compreende uma fase sexual, que se dá no tecido enteroepitelial dos felídeos e resulta na produção de oocistos, e uma assexual, que pode ocorrer tanto nos tecidos de felídeos como de outros hospedeiros considerados intermediários, como aves e mamíferos (inclusive o homem), resultando na produção de cistos teciduais (DUBEY, 1994). O parasita não apresenta especificidade por determinado órgão ou tecido, e multiplica-se por divisão binária simples e endodiogenia sob as formas de taquizoítos e bradizoítos, nos hospedeiros intermediários. Apresenta as mesmas formas evolutivas nos hospedeiros definitivos, observando-se ainda, a multiplicação sexuada, onde após cinco estágios entéricos (trofozoíto e esquizontes) há diferenciação de gametas, fecundação e formação de um oocisto que será eliminado não esporulado. A esporulação ocorrerá no meio externo dando origem, no interior do oocisto, a dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada um. Tanto os taquizoítos como os bradizoítos e esporozoítos são infectantes para os animais susceptíveis.

2.2.2.1. OOCISTOS

O oocisto, é a forma infectante proveniente da reprodução sexuada do parasita (gametogonia) no interior das células do epitélio intestinal dos felídeos. São esféricos com aproximadamente 12 μm de diâmetro, sendo a forma de resistência ambiental. Possui parede dupla e alberga, em seu interior, 8 esporozoítos infectantes (NEVES, 1985; DUBEY, 1993; AMATO NETO et al, 1995). Após processamento gástrico, os oocistos rompem-se no intestino, liberando os esporozoítos que dividem-se rapidamente nas células intestinais e nos linfonodos associados, gerando taquizoítos. Os taquizoítos, através da circulação sangüínea e linfática, atingem todos os tecidos do hospedeiro podendo eventualmente, gerar cistos no tecido cerebral, musculatura

esquelética e cardíaca, e no tecido hepático, persistindo nas células dos hospedeiros por longos períodos (WONG & REMINGTON, 1993).

Segundo DUBEY & FRENKEL (1972), bilhões de oocistos imaturos podem ser liberados por dia nas fezes do gato após 5 a 10 dias da infecção inicial, podendo esta fase de liberação durar semanas. Felinos jovens são mais susceptíveis à infecção toxoplásmica e também são os principais eliminadores de oocistos nas fezes.

Após a sua maturação entre 1 a 5 dias, o oocisto pode permanecer por meses e até anos viável no ambiente numa temperatura entre -20°C e $+37^{\circ}\text{C}$ (DUBEY & FRENKEL, 1972), desde que não exposto à luz solar direta e sob condições razoáveis de umidade relativa (YILMAZ & HOPKINS, 1972; AZEVEDO et al, 1983). Isolamentos ambientais de oocistos tem sido relatados principalmente em locais sombreados e/ou úmidos, não expostos ao sol (FLECK et al, 1972; RUIZ et al, 1973; RUIZ & FRENKEL, 1977; AMENDOEIRA & LOPES, 1980). Em 1983, AZEVEDO et al isolaram oocistos infectantes em duas amostras de solo úmido e sombreado, colhidas em dois bairros de Recife (PE) onde a presença simultânea de crianças e gatos foi citada como de importância epidemiológica pela susceptibilidade daquelas às infecções.

Quanto aos métodos de desinfecção convencional, pode-se afirmar que o oocisto é "... resistente por uma hora à tintura de iodo a 2%, solução sulfocrômica, etanol a 95%, amônia líquida, hidróxido de sódio e ácido hipocloroso a 10% ..." (AMATO NETO et al, 1995).

2.2.2.2. TAQUIZOÍTOS

O taquizoíto é a forma de multiplicação e metabolismo mais rápido produzida pelo ciclo assexuado do parasita em hospedeiros intermediários. Também conhecido como forma livre ou proliferativa, é encontrado na fase aguda da infecção no interior das células infectadas, sendo responsável pela sintomatologia. Apresenta forma de arco com uma extremidade afilada e outra arredondada, medindo aproximadamente, 4 a 9 μm de comprimento por 2 a 4 μm de diâmetro. Constitui a forma menos resistente do parasita, sendo

facilmente destruída pelas condições ambientais adversas, pelo suco gástrico, pela desidratação ou variações osmóticas (NEVES, 1985).

2.2.2.3. BRADIZOÍTOS

Os bradizoítas são formas assexuadas, com metabolismo lento, medindo, aproximadamente, 7 por 1,5 μm (MEHLHORN & FRENKEL, 1980). Estão presentes nos cistos teciduais principalmente, durante a fase crônica da infecção. Os cistos possuem membrana dupla sendo resistentes às enzimas proteolíticas e ao resfriamento à +4°C por 30 dias e, medem aproximadamente, de 10 a 100 μm de diâmetro, podendo chegar a 300 μm com centenas de bradizoítas no seu interior. Esta forma de apresentação do parasita é a principal responsável pela transmissão desta zoonose através do carnivorismo e ingestão de carne crua ou mal cozida (NEVES, 1985; DINIZ et al, 1991; DUBEY, 1993; AMATO NETO et al, 1995).

Entretanto, tais cistos são mortos após congelamento a - 20°C, ou aquecimento a + 65 °C e sob radiação ionizante com doses de 50 Gy de ^{137}Cs (DUBEY et al, 1986; KOTULA et al, 1991; AMATO NETO et al, 1995) constituindo assim, o congelamento e o cozimento completo da carne, algumas das formas de profilaxia da transmissão da toxoplasmose humana.

2.2.3. BIOQUÍMICA DO PARASITA

A superfície celular externa do taquizoíto é recoberta por proteínas, com peso molecular variando entre 22 a 43 kDa, todas ancoradas na membrana a partir de pontes de glicosilfosfatidilinositol (TOMAVO et al, 1993).

A p30, proteína de superfície mais abundante, representa até 5% do total de proteínas do taquizoíto e não é expressa em bradizoítos e esporozoítos. O sequenciamento dos genes de proteínas em três cepas diferentes do *T.gondii* mostra que ela é bastante conservada (BULOW et al, 1991). A p30 é um dos antígenos reconhecidos no soro humano e, por ser

muito imunogênica, induz a produção de anticorpos IgG, IgM e IgA, podendo ser usada no diagnóstico da infecção aguda em adultos ou, na forma congênita.

POTASMAN et al (1986) demonstraram que o soro de pessoas não infectadas reage com a banda 30kDa em “imunoblots”, sugerindo a presença de anticorpos naturais ou de reação cruzada, sendo que a intensidade desta banda aumenta após infecção com o *T.gondii*. Além disso, a p30 estimula as células mononucleadas do sangue periférico de indivíduos soropositivos a secretar IFN- γ (KHAN et al, 1988), um dos principais mediadores de resistência contra o *T.gondii*.

A p22, outra proteína de superfície dos taquizoítos, já foi clonada, expressa e usada para estimular a produção de anticorpos IgG. Sua menor capacidade de estimular a síntese de IgA e IgM sugere que ela possa ser usada como marcador de infecção tardia.

A p28 é um antígeno intracelular sintetizado pelos taquizoítos, e está presente nos grânulos densos sendo o menor componente da rede reticular secretada no vacúolo parasitário.

A p23, presente nos grânulos densos dos taquizoítos e bradizoítos, é secretada pelo parasita na rede reticular dos vacúolos parasitários e facilmente detectada no soro de pacientes com infecção crônica, o que não acontece na infecção aguda (WONG & REMINGTON, 1993).

Taquizoítos em cultura de células secretam ou excretam até 90% dos tipos de antígenos do *Toxoplasma* que circulam no hospedeiro. Além disso, são altamente imunogênicos, desencadeando uma resposta tanto celular como humoral.

Evidências sobre diferentes cepas de *T.gondii* são baseadas na diferença de virulência em animais de laboratório. O aumento da virulência de uma determinada cepa ocorre após passagens sucessivas em camundongos (JACOBS et al, 1974). Os esforços iniciais para se mostrar diferenças de virulência, concentraram-se nas estruturas antigênicas das diversas cepas.

FIGURA 1: Esquema do ciclo de vida do *T.gondii* com as várias fontes de infecção humana e animal.

A primeira evidência da existência de diferenças antigênicas foi apresentada por SUGGS et al (1968) que demonstraram que soro de coelhos sensibilizados com diferentes cepas do *T.gondii* tiveram reações cruzadas diferentes com *Besnoitia* spp. KASPER et al (1985) demonstraram que oito proteínas principais eram compartilhadas pelas três cepas estudadas, mas que também existiam antígenos menos específicos para cada cepa. GROSS et al (1991) descreveram um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer um antígeno de membrana de 23 kDa presente em cepas virulentas e aparentemente ausente nas inócuas.

SIBLEY & BOOTHROYD (1992), estudando 28 cepas que variavam na virulência em infecção experimental em murinos, através da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), demonstraram que as cepas mais agressivas apresentavam mesmo padrão de RFLP, enquanto as inócuas mostraram padrão de RFLP heterogêneo, contrastando com os resultados de CRISTINA et al (1991) que analisaram seis cepas e não encontraram diferenças quanto ao padrão de RFLP.

O genoma do esporozoítio contém aproximadamente 0,1 pg de DNA. Conteúdo semelhante é encontrado em todas as outras formas, exceto o zigoto que é diplóide. O genoma do parasita possui aproximadamente 8×10^7 pares de base, 50% do tipo GC.

2.2.4. FORMAÇÃO DOS VACÚOLOS PARASITÁRIOS

O fato do *T.gondii* invadir diferentes tipos celulares sugere a existência de um receptor específico universalmente distribuído, ou então, a participação de vários receptores diferentes. FURTADO et al (1992) demonstraram que a laminina, uma importante proteína encontrada nas membranas basais, aumenta a adesão dos taquizoítos à célula hospedeira e que estes podem reconhecer e se ligar a múltiplos receptores da laminina.

A penetração do parasita requer que seu pólo anterior (conóide) entre em contato com a célula hospedeira para desencadear a invaginação da membrana celular. A invasão (15-17 segundos) acontece de uma maneira muito mais rápida que a fagocitose (120 segundos), o que sugere participação ativa do parasita no processo (NICHOLS et al, 1981). No ponto de contato, o conóide se protrunde e as roptrias se fundem para secretar alguns fatores ativadores que alteram as propriedades da membrana da célula hospedeira (LYCKE et al, 1975). Pseudópodes são formados em torno do parasita até que ele esteja dentro das células e dos vacúolos. Já foi demonstrado que a incubação de taquizoítos com anticorpo monoclonal contra a proteína de superfície p30, inibe a adesão e conseqüentemente, a penetração do mesmo na célula. DUBREMETZ et al (1985) mostraram que esta cobertura de anticorpos se encontra na junção entre as duas membranas, local que governa a entrada do parasita na célula. Essas observações sugerem a forte aposição das células parasitária e hospedeira e o compartilhamento de alguns antígenos. Após a entrada na célula hospedeira, o *T.gondii* secreta proteínas, principalmente a p30, que depois são organizadas no espaço vacuolar. Esta rede formada permite que os taquizoítos escapem das ações microbidas e que haja uma comunicação bioquímica entre o agente e a célula hospedeira.

O sucesso do *T.gondii* como patógeno é atribuído à sua capacidade de invadir, residir e multiplicar-se dentro da célula hospedeira. No interior das células, a formação dos vacúolos o protege contra radicais livres, variações de pH, flutuações osmóticas e contato com anticorpos, evitando assim, os mecanismos de defesa do hospedeiro.

2.3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO *T.gondii*

A resposta imunológica do hospedeiro imunocompetente contra o *Toxoplasma gondii* no curso da infecção aguda adquirida é a responsável pelo encistamento do parasita na musculatura esquelética, no cérebro e nos demais órgãos. Neste aspecto, taquizoítos assumem a forma bradizoítica, a qual pode permanecer latente por toda a vida do indivíduo sem causar-lhe dano ou morte.

Esta fase crônica e assintomática da toxoplasmose adquirida pode assumir uma forma de reagudização ou recidiva, com consequências desastrosas para o hospedeiro, nos casos em que este apresentar algum problema na imunidade celular permitindo a transformação dos bradizoítos encistados em taquizoítos passíveis de proliferação e disseminação, ou algum momento de deficiência imunológica, como por exemplo, nos casos de imunossupressão induzida por drogas, de quimioterapia, de transplantes de órgão ou da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA /AIDS) (SHARMA, 1990).

Estudos em modelos animais têm demonstrado o envolvimento genético do hospedeiro na susceptibilidade e resistência à infecção por *Toxoplasma* (BROWN & McLEOD, 1994), visto que mutações resultam em prejuízo da apresentação do antígeno, imprescindível na indução de resposta imune efetora mediada por células T, necessária ao controle da disseminação do parasita no tecido cerebral e no organismo como um todo (SHARMA, 1990).

Não obstante a imunidade mediada por células tenha sido apontada como principal fator de defesa na infecção pelo *Toxoplasma* (McKERRROW & HEYNEMAN, 1994), a imunidade humoral dependente de células T acompanha o curso da infecção crônica, com títulos baixos de anticorpos, por toda a vida do indivíduo. Além disso, indivíduos cronicamente infectados pelo parasita são aparentemente resistentes à reinfeção (SHARMA, 1990).

GAZZINELLI et al (1991, 1992, 1993, 1994) têm estudo o papel dos diferentes clones celulares (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, macrófagos, células “natural killer” NK, etc) na resposta celular contra a infecção toxoplásmica em suas fases aguda e crônica. Utilizando citocinas recombinantes e anticorpos monoclonais dirigidos contra citocinas endógenas e células, estes pesquisadores têm delineado, em modelo murino, o papel desempenhado por estas células no curso da infecção. Assim, sabe-se que as células T CD8⁺ agem como efetoras, tanto pela sua ação citotóxica *in vivo* quando pela produção de interferon-gama (IFN- γ), sendo requeridas ao lado das células T CD4⁺ na indução da resistência à infecção. Estas últimas, por sua vez, exercem função auxiliadora na ativação daquelas, além de serem a principal fonte de IFN- γ durante a fase crônica da infecção. Ao lado das células NK, respondem também pela produção precoce de IFN- γ , o qual, suprimindo a

atividade de clones $CD4^+$ “Th2”, age selecionando a produção de citocinas do tipo “Th1” (o próprio $IFN-\gamma$ e citocina IL-2), responsáveis pela resistência à reinfecção e pelo controle da infecção crônica. A IL-2, juntamente à citocina IL-12 produzida por macrófagos, estimulam a ação citotóxica de células NK e linfócitos T $CD8^+$ e o padrão “Th1” de resposta. O $IFN-\gamma$, assim formado, atua mediando a destruição intracelular de parasitas por ativar células fagocíticas a produzir óxidos nitrogenados reativos e por causar redução no aporte nutricional de triptofano, inibindo a replicação intracelular do *Toxoplasma*.

BROWN & McLEOD (1990), concluíram que as células T $CD8^+$ atuam de forma crucial na restrição da disseminação da parasitemia por *T.gondii*. Estas células, reguladas pelo complexo principal de histocompatibilidade MHC classe I, agem lisando células infectadas e expondo, extracelularmente, parasitas (antes protegidos no interior de vacúolos parasitóforos) a outras células efetoras como macrófagos ativados e células T citotóxicas, além de permitir a opsonização dos parasitas por anticorpos, com conseqüente fagocitose e lise pelas proteínas do complemento. Adicionalmente, há evidências de que as células T $CD8^+$ estimuladas *in vitro* podem agir lisando parasitas extracelulares independentemente do MHC. Deste modo, a ação conjunta de células T $CD8^+$, do MHC classe I e de $IFN-\gamma$ produzido durante o processo, contribui na proteção contra a formação de cistos teciduais. Segundo SHARMA (1990), a opsonização dos parasitas por anticorpos permite a fusão de lisossomos aos vacúolos parasitóforos onde estão contidos, reduzindo sua inacessibilidade dentro dos macrófagos infectados.

DEROUIN et al (1989), demonstraram uma associação entre as contagens aumentadas de células T $CD8^+$ e a ocorrência dos sintomas clínicos no curso da infecção toxoplásmica adquirida.

Adicionalmente, GAZZINELLI et al (1991, 1992) têm sugerido que as manifestações da infecção em indivíduos acometidos pela AIDS sejam devidas à redução do número de células T $CD8^+$ em estágios avançados da doença, ao lado da redução das $CD4^+$, visto que em seus experimentos, somente deficiências em clones T $CD4^+$ não têm determinado a reativação de toxoplasmose latente, como a que ocorre na deficiência de T $CD8^+$ e/ou $IFN-\gamma$.

A resposta humoral é mediada por linfócitos T, na medida em que a produção de células de memória e a ativação e diferenciação de linfócitos B dependem da interação conjunta destas células B com antígenos apresentados na superfície de células apresentadoras e citocinas produzidas por linfócitos T CD4⁺. Mesmo com a produção de imunoglobulinas pertencentes aos isotipos G, M, A e E, a resposta humoral por si só não exerce um papel protetor no curso da toxoplasmose, atuando unicamente na opsonização de parasitas (SHARMA, 1990). Tem sido relatada a presença de IgG2 na resposta murina ao *Toxoplasma gondii* indicando uma estimulação seletiva deste isotipo pelas citocinas produzidas pelo clone de células T CD4⁺ “Th1” (GAZZINELLI et al, 1991).

2.4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

2.4.1. PREVALÊNCIA

Em relação ao hospedeiro humano, o *Toxoplasma* apresenta alta infecciosidade, demonstrada pelos dados epidemiológicos de prevalência da infecção, e baixa patogenicidade, se considerarmos a abrangência cosmopolita da infecção em relação, à baixa ocorrência de casos clínicos graves, não obstante a existência de numerosas cepas de diferentes graus de virulência isoladas de seres humanos e animais infectados (AMATO NETO et al, 1995).

No mundo, estima-se que meio bilhão de pessoas tenham anticorpos contra *Toxoplasma gondii* (SHARMA, 1990; KEAN, 1972). As diferentes taxas de infecção humana e animal obtidas nos diversos países do mundo devem-se a diferentes fatores como localização geográfica, condições ambientais, hábitos culturais dos povos principalmente no tocante à alimentação, tipo de fauna, grau de desenvolvimento do país e infra-estrutura hídrica e sanitária (REMYINGTON et al, 1995) e a própria metodologia utilizada nos levantamentos epidemiológicos. Climas quentes e úmidos demonstram maiores prevalências da infecção do que climas frios e secos (DUBEY, 1993; AMATO NETO et al, 1995). Epidemiologicamente, os fatores concernentes à cor, idade, sexo ou

raça não conferem maior ou menor susceptibilidade do hospedeiro humano à infecção, pois a distribuição cosmopolita do parasita não tem demonstrado a ocorrência de resistência ao parasita por parte de nenhum grupo populacional em especial. Entretanto, dados epidemiológicos demonstram que as taxas de soroconversão aumentam em função do grupo etário estudado (AMATO NETO et al, 1995). JAMRA & GUIMARÃES (1981), em estudo com criança de 0 a 15 anos, demonstraram que o grupo etário de 0 - 1 apresentava taxas de 50% de positividade relacionada com a presença de anticorpos passivamente herdados das mães, os quais refletiam a prevalência materna; no grupo de 1 a 3 anos as taxas eram nulas, embora se apresentassem em níveis crescentes após esta idade, devido à conversão sorológica. Estes dados brasileiros viriam a concordar mais tarde, com dados cubanos determinados por GASCON et al (1989).

Tem-se associado altas taxas de prevalência com a presença de gatos no domicílio ou peridomicílio e, muito embora a infecção demonstre natureza cosmopolita, alguns autores têm encontrado diferenças estatisticamente significantes entre populações provenientes de zonas urbanas e rurais, havendo nestas, maior prevalência (SANCHEZ et al, 1994).

As prevalências européias são de 84% em Paris, 22% em Londres e 12,5% em Oslo. As africanas são de 29,2% no Egito e 50% em Rwanda. As asiáticas de 22% na Arábia Saudita e 37,1% na Jordânia. As americanas são de 32% na cidade de Nova York e 71% na cidade de Havana em Cuba (SHOURA et al, 1973; DESMONTS & COUVREUR, 1974; MORSY et al, 1977; RIFAAT et al, 1978; AHLFORS et al, 1989; GASCON et al, 1989; SANCHEZ et al, 1994).

No Brasil, cerca de 70% da população foi infectada em algum momento da vida (Vergara *et al*, 1985). Na região Norte, tem-se prevalência de 56,2% a 73,9% na Amazônia Brasileira. Na região Nordeste, 74,7% em Recife (PE). Na região centro oeste, 51,6% nos índios do alto Xingu (Mato Grosso). Na região Sudeste, 78,7% no Rio de Janeiro, 50,3% em Minas Gerais, e na Grande São Paulo, aproximadamente 69% (ARAÚJO, 1970; BARUZZI, 1970; AZEVEDO et al, 1983; COUTINHO et al., 1981; JAMRA & GUIMARÃES, 1981; FERRARONI & LACAZ, 1982; AMATO NETO et al, 1984; GUIMARÃES et al, 1993).

2.4.2. TRANSMISSÃO

O interesse pelo levantamento das formas de transmissão do *Toxoplasma gondii* aumentou quando prevalências elevadas da ordem de 60% de positividade em populações humanas não eram explicadas apenas pela reduzida frequência associada à transmissão congênita. Além disso, a alta prevalência também foi constatada em populações animais, denotando a distribuição cosmopolita do parasita (AMATO NETO et al, 1995).

Basicamente, a transmissão da infecção toxoplásmica na espécie humana, dá-se pela ingestão de oocistos contaminantes do domicílio e peridomicílio, das frutas e verduras mal lavadas (SANCHEZ et al, 1994) e, pela ingestão de cistos presentes na carne crua ou mal cozida. Entretanto, têm sido relatadas transmissões pela amamentação durante a fase aguda materna da infecção, por transplantes de órgãos, em especial o de coração, medula óssea, rins e fígado, por transfusões de sangue e derivados, entre outras (AMATO NETO et al, 1995). Merece aqui grande destaque, a transmissão transplacentária que ocorre durante a primoinfecção aguda materna, responsável pela gama de problemas físicos, psico-motores e seqüelas, característicos da toxoplasmose congênita que atinge fetos e neonatos (DINIZ et al, 1991; AMATO NETO et al, 1995).

Muitos casos de toxoplasmose são explicados através da ingestão de carne contaminada com cistos (REMINGTON, 1970; DURFFE & CHIEN, 1971), principal mecanismo de transmissão quando ocorre canibalismo. A importância relativa destas fontes de infecção continua sendo objeto de discussão e parece estar diretamente ligada aos hábitos da população. O risco de aquisição da toxoplasmose seria muito maior entre as pessoas ou animais que ingerem carne mal cozida, leite cru e entre os profissionais que tem contato estreito com os animais (RIEMANN et al, 1975).

Em levantamentos epidemiológicos da toxoplasmose humana a existência de uma associação positiva ou negativa entre a ocorrência de

sorologia positiva e contatos com gatos, tem sido freqüentemente demonstrada (GANLEY & COMSTOCK, 1980).

A presença de oocistos em amostras de terra de hortas (AMENDOEIRA & LOPES, 1980) explica a ocorrência de infecção toxoplásmica entre herbívoros e vegetarianos. Entre os animais domésticos principalmente os ruminantes, a ingestão de oocistos constitui um dos meios naturais de contaminação. A infecção dos rebanhos pode estar associada à ingestão de grãos contaminados por oocistos (PLANT et al, 1974) e a estabulação de animais junto a locais contaminados com dejetos de felídeos pode aumentar o risco de infecção.

Deve ser considerada ainda, a possibilidade de disseminação de oocistos não esporulados através de águas correntes como foi descrito por ISAAC-RENTON et al (1998) num surto da doença no Canadá.

2.5. TOXOPLASMOSE HUMANA

A toxoplasmose humana, enquanto doença, pode ser dividida em quatro formas clínicas: a adquirida em indivíduos imunocompetentes, onde usualmente se estabelece como síndrome semelhante à mononucleose; doença adquirida ou reativada em indivíduos imunodeprimidos; a doença ocular que parece ser conseqüência da coriorretinite adquirida por via congênita, excepcionalmente sendo adquirida no período pós-natal, e a forma congênita (AMATO NETO et al, 1995; REMINGTON et al, 1995).

2.5.1. TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA EM IMUNOCOMPETENTES

A toxoplasmose adquirida em indivíduos imunocompetentes geralmente, tem curso benigno e auto limitado podendo apresentar-se assintomática ou oligossintomática. Os sintomas, presentes em cerca de 10% dos casos, não são patognomônicos e consistem em mal estar, dor de garganta, mialgia, astenia e cefaléia. Desta forma, a doença passa muitas vezes despercebida

não sendo necessária terapêutica específica (AMATO NETO et al, 1995; REMINGTON et al, 1995).

Apesar de geralmente assintomática, estudos recentes têm demonstrado que a infecção crônica pode causar alterações de comportamento, como foi demonstrado em ratos (WEBSTER, 1994; WEBSTER et al, 1994) e humanos (FLEGR et al, 1996).

2.5.2. TOXOPLASMOSE OCULAR

A retinocoroidite pode ser de natureza adquirida ou congênita, apresentando-se como focal, granulomatosa e necrosante. O acometimento ocular, em vários graus, é grave, podendo ser bilateral em 60 a 80% dos casos, sendo patognomônico o encontro de lesão satélite a outras cicatrizes mais antigas hiperpigmentadas e atróficas. Os sintomas residem na diminuição da visão, opacidades no campo visual, hiperemia conjuntival, dor e fotofobia. (DINIZ et al, 1991.; AMATO NETO et al, 1995; REMINGTON et al, 1995).

2.5.3. TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A infecção transplacentária pode ocorrer quando hospedeiros não expostos previamente são infectados durante a gravidez ou prenhez. O parasita multiplica-se então na placenta e atinge os tecidos fetais, resultando freqüentemente, em aborto ou lesões congênitas irreversíveis denominada téttrade de Sabin, cujas manifestações são: hidrocefalia ou microcefalia, coriorretinite, calcificações intracranianas e retardamento mental (SABIN, 1941).

Cerca de uma criança em mil, nascidas nos EUA todo ano, apresentam infecção congênita, sendo que a maioria não mostram sinais clínicos ao nascer, mas apresentam alguma seqüela no decorrer da vida (REMINGTON et al, 1995). Muitas destas crianças podem desenvolver coriorretinite durante a adolescência ou na fase adulta (FRENKEL, 1990). Na região metropolitana de

São Paulo, Brasil, estima-se que devam nascer cerca de 230 a 300 crianças infectadas por ano (GUIMARÃES et al, 1993).

2.5.4. TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA OU REATIVADA EM INDIVÍDUOS IMUNODEPRIMIDOS

Outros grupos afetados pela toxoplasmose são pacientes imunodeprimidos, como aqueles portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), neoplasias ou em transplantados. A toxoplasmose em pacientes com AIDS é, na maioria das vezes, causada pela recrudescência dos cistos latentes, causando muitas vezes, lesões no SNC; nos transplantados, devido a imunossupressão, também pode ocorrer a reativação dos cistos ou infecção primária nos órgãos transplantados (THOMAS & PELLOUX, 1993). Nos Estados Unidos na primeira década da epidemia de AIDS, 20.000 a 40.000 pacientes infectados com HIV apresentaram as formas clínicas da toxoplasmose (GELLIN & SOAVE, 1992).

A encefalite por *Toxoplasma gondii* é a lesão do SNC mais freqüente (40 a 60%) em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA/AIDS (WAINSTEIN et al, 1992; PASSOS et al, 2000), sendo sua incidência diretamente proporcional à prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em determinada população. No Brasil, a toxoplasmose cerebral é a terceira doença associada mais prevalente quando da notificação dos casos de AIDS em pacientes com mais de 12 anos, representando 11.809 (3,75%) dos 314.582 casos notificados no período de 1980 a junho de 1996 (BRASIL, 1996).

2.6. TOXOPLASMOSE ANIMAL

Com relação à toxoplasmose animal, nem sempre a protozoose causa sintomatologia evidente ou morte, mas muitas vezes ocorre de forma inaparente, dependendo essas situações de muitos fatores, como a idade do

animal, a via de inoculação, a espécie considerada e a virulência intrínseca da cepa.

2.6.1. TOXOPLASMOSE EM BOVINOS

Infecção natural por *T.gondii* em bovinos, foi primeiramente reportada em Ohio, USA, por SANGER et al (1953). Os mesmos autores também relataram a primeira infecção experimental pelo protozoário em bovinos. Aspectos referentes à toxoplasmose bovina abordados por SANGER et al (1953) foram também relatados por COLE et al (1954), KOESTNER & COLE (1962) e PIPER et al (1970). No entanto, os achados clínicos descritos por estes autores, não foram reproduzidos experimentalmente (DUBEY, 1986).

No Brasil, COSTA et al (1978) realizaram os primeiros estudos imanes à infecção de bovinos por *T. gondii*, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Tais estudos verificaram que oocistos infectam bezerros sem causar sintomatologia específica, e que o parasita pode ser isolado nos tecidos destes animais. Verificaram também, que provas sorológicas são importantes para diagnóstico e que níveis ascendentes de positividade indicam infecção recente (AMATO NETO et al, 1995).

Vários autores descreveram a doença em animais experimentalmente inoculados com taquizoítos (GUILLO & DESMONTS, 1960; NOBUTO et al, 1960; MUNDAY, 1978; STALHEIN et al, 1980) com cistos tissulares (BEVERLEY et al, 1977; COSTA et al, 1978; MUNDAY, 1978) e com oocistos de *T. gondii* (TIMOFEEV & AKULOV, 1975; COSTA et al, 1978; MUNDAY, 1978; FAYER & FRENKEL, 1979; STALHEIM et al, 1980; DUBEY, 1983; DUBEY et al, 1985).

Vários estudos de infecção experimental em bezerros, descreveram como sintomas principais da infecção, febre, perda de apetite, diarreia e alterações respiratórias (FAYER & FRENKEL, 1979; COSTA et al, 1978; DUBEY, 1983).

Pode-se dizer que os bovinos são relativamente resistente à infecção. Os cistos presentes na musculatura destes animais, são menos freqüentes, e persistem por menos tempo, quando comparados ao de outras espécies animais (DUBEY, 1994). Apesar do isolamento ser mais difícil, ele já foi obtido da retina e diafragma de bovinos, e evidências de transmissão congênita foram comprovadas pela presença do parasita em fetos de vacas gestantes (AMATO NETO et al, 1995), no entanto, aborto e mortalidade perinatal não tem sido descritos (ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1997). O protozoário parece ser menos infectante para vacas em gestação do que para ovelhas, porcas e cadelas gestantes (STALHEIM et al, 1980). A infecção natural em bovinos é pouco relatada, mas em estudos experimentais, utilizando novilhos inoculados com oocistos de *T.gondii*, os cistos permaneceram viáveis, na musculatura dos animais, até 1191 dias pós-infecção e o título de anticorpos permaneceu alto somente durante dois anos. Passado este período, o animal permaneceu sorologicamente negativo (DUBEY & THULLIEZ, 1993).

2.6.2. TOXOPLASMOSE EM OVINOS

UNDERWOOD & ROOK (1992) descreveram o *Toxoplasma gondii* como principal responsável por problemas reprodutivos em rebanhos ovinos da Austrália, Canadá e Reino Unido.

De acordo com BLEWETT & WATSON (1984), a toxoplasmose é a causa primária de perdas em 10 a 20% dos rebanhos com problemas de aborto e natimortos, com perdas médias em torno de 10%, com uma incidência anual de 1 a 2%, taxa baixa quando comparado com a alta prevalência de ovinos soropositivos

Quando a ovelha se infecta no terço final da prenhez, esta é levada a termo, entretanto, o cordeiro mantém bradizoítos encistados em seus tecidos, apresentando títulos sorológicos desde o nascimento (BLEWETT & WATSON, 1983; BUXTON, 1990), o que pode representar perdas significantes na produção destes animais. FREYRE et al (1997), acompanhando rebanhos ovinos no Uruguai, registraram uma taxa inicial de 28,7% de soropositivos entre

as 1613 ovelhas estudadas que elevou-se para 38,5% após 2,5 anos, indicando uma taxa de incidência de 9,8% no período, com perdas reprodutivas variando de 1,4 a 3,9%, o que representaria um prejuízo anual para o rebanho uruguaio de US\$ 1,4 a 4,7 milhões.

Segundo BUXTON (1998), as pastagens adubadas com esterco e restos de cama freqüentados por felídeos, são as principais fontes de infecção dos rebanhos ovinos criados em sistema semi-extensivo, juntamente com o feno e grãos contaminados por oocistos.

A análise multivariada da relação entre soro-reação e diversas variantes epidemiológicas, conduzida por MAINAR et al (1996) em rebanhos ovinos da região de Madri, na Espanha, apontou forte associação entre soro-reação, presença de gatos e ocorrência de abortos.

A prevalência da toxoplasmose entre os ovinos, é avaliada principalmente, por inquéritos soropidemiológicos, e as taxas de infecção variam principalmente de acordo com o teste sorológico utilizado, a região e a idade dos animais estudados (DUBEY, 1990). A prevalência de anticorpos entre os ovinos é geralmente maior que em outros herbívoros domésticos, a despeito de muitas vezes, as outras espécies estarem submetidas as mesmas taxas de infecção. Esta diferença deve estar relacionada à susceptibilidade das diferentes espécies à infecção. Os ovinos são altamente susceptíveis à infecção pelo *Toxoplasma gondii* e como tendem a manter títulos de anticorpos por período prolongado, a detecção destes no soro dos animais são indicadores válidos das taxas de infecção (BLEWETT, 1983). Estudos sorológicos e histológicos de abortos em ovelhas, no estado de Oregon (EUA), mostram que 12,6% foram devido ao *T. gondii* (DUBEY et al, 1990).

MARQUES et al (1985) inocularam ovinos adultos com oocistos de *T.gondii*, observando títulos sorológicos detectáveis já aos dez dias após a infecção, com pico aos 30 dias, mantendo títulos altos até os 90 dias, quando foi encerrado o experimento. UGGLA (1987), mensurando a curva de anticorpos em ovelhas experimentalmente infectadas, determinaram pico com altos títulos à IFI (≥ 2569) quatro semanas após a inoculação, com títulos elevados (≥ 640) persistindo por até 18 semanas após a inoculação.

Em 1990, DUBEY et al descreveram infecção congênita em um rebanho, encontrando cistos viáveis do parasita em diafragma, músculos e cérebro dos animais examinados. Estes cistos permaneceram viáveis, sob refrigeração, por até 15 dias, representando fonte de infecção para o homem. Vários autores têm atribuído a ingestão de carne de cordeiro mal cozida como fator responsável pela ocorrência de toxoplasmose humana (MAGALDI et al, 1968; MASUR et al, 1978; DUBEY & BEATTIE, 1988; DUBEY & KIRKBRIDGE, 1989; SMITH, 1993; BONAMETTI, et al, 1996; COOK et al, 2000).

2.6.3. TOXOPLASMOSE EM CAPRINOS

A principal forma clínica da toxoplasmose nos caprinos, naturalmente infectados, está relacionada a distúrbios na esfera reprodutiva, como abortos, fetos mumificados e natimortalidade (DUBEY, 1988). Encefalite, miocardite e pneumonia são as lesões mais frequentemente encontradas nos fetos (DUBEY, 1988). Embora pouco frequente, a morte por toxoplasmose aguda disseminada é relatada em caprinos adultos, sendo descritas encefalite, edema e congestão pulmonar, infarto renal, inúmeros focos necróticos no fígado e baço, enterite, cistite e abomasite (MEHDI et al, 1983; DUBEY, 1987).

Através de levantamentos sorológicos observou-se que a prevalência da toxoplasmose na população caprina é maior entre os animais mais velhos (DUBEY, 1987; 1990; OPEL et al, 1991; PANDEY & van KNAPEN, 1992), atingindo igualmente machos e fêmeas (DUBEY, 1987; 1990; DORNY & VAN AKEN, 1992), com maior frequência nos rebanhos leiteiros em relação aos de exploração mista (OPEL et al, 1991).

O isolamento do agente a partir de diferentes tecidos de caprinos, aparentemente saudáveis, foi descrito por vários autores (HAGIWARA et al, 1978; DUBEY, 1988). Cistos tissulares permanecem viáveis por longos períodos, provavelmente, durante toda a vida do hospedeiro, e se distribuem por toda a economia animal, atingindo inclusive os fetos nos animais gestantes (DUBEY, 1980; 1987; 1989).

Através de infecções experimentais, já foi demonstrada a eliminação do agente através do leite, saliva, urina (VITOR et al, 1991) e sêmen (DUBEY & SHARMA, 1980). Os sinais clínicos mais frequentemente observados são febre ($\geq 40^{\circ}\text{C}$), hiporexia, diarreia, dispnéia e apatia entre o quinto e décimo dias após inoculação de oocistos, por via oral. A morte dos animais está associada a lesões fibro-necróticas, congestão e edema em tecido intestinal e pulmonar, enfartamento e necrose focal de linfonodos mesentéricos, encefalite, hepatite e comprometimento renal, sendo a severidade do quadro é diretamente proporcional à dose do inóculo utilizado (DUBEY et al, 1980; DUBEY, 1989).

A viabilidade dos cistos tissulares é comprovada através de inoculações intraperitoneais em camundongos, já tendo sido isolados em tecido hepático (DUBEY, 1987; CHHABRA et al, 1981), muscular (DUBEY, 1987), renal (CHHARA et al, 1981) e cerebral (SHARMA & DUBEY, 1981). Em termos quantitativos, DUBEY, (1980) obteve maior número de isolamentos de cistos provenientes de fígado, musculatura esquelética e rins do que de cérebro, em caprinos natural e experimentalmente infectados.

Cabras gestantes desenvolvem quadro clínico inespecífico (hipertemia, hiporexia, apatia), e recuperam-se, em torno de 2 semanas após administração oral de oocistos (CHHARA et al, 1981; DUBEY, 1988). A inoculação intravenosa de taquizoítos produz infecção aguda com sintomas mais severos e morte (CHHARA et al, 1981). Independentemente da dose infectante, ocorre morte fetal com subsequente reabsorção, mumificação, natimortalidade ou então, recém-nascidos fracos. A infecção, na primeira metade da gestação, causa maiores prejuízos, porém, ainda, há risco de transmissão transplacentária em fases mais tardias causando menor acometimento do feto (DUBEY, 1988; VITOR et al, 1991). Além da necrose placentária, encefalomielite, lesões em fígado e miocárdio fetal, são as alterações mais comumente encontradas. Apesar de não observado nos cortes histológicos, o agente foi isolado através de inoculações de cérebro, coração, pulmões, musculatura, medula espinhal, fígado, baço e rins fetais, em camundongos (DUBEY, 1988).

A eliminação do *T. gondii* pelo leite (RIEMANN et al, 1975; DUBEY et al, 1980; VITOR et al, 1991) e a persistência de cistos na musculatura dos

caprinos (DUBEY, 1980) revelam a importância desta espécie na transmissão da toxoplasmose ao homem (SACKS et al, 1982; PEPIN et al, 1997).

2.6.4. TOXOPLASMOSE EM AVES

Dentre as aves domésticas, a galinha, o peru, o pato e o canário podem ser acometidas pela toxoplasmose, o que confirma o caráter eurixeno do *T. gondii*, capaz de infectar representantes de grupos bem distintos. A resistência à infecção parece estar relacionada à idade dos animais, sendo os jovens mais susceptíveis. A galinha adulta é bastante resistente à parasitose experimental (AMATO NETO et al, 1995).

Inquéritos sorológicos realizados em frangos na Índia, mostraram que 39,5% dos animais apresentaram anticorpos contra *T. gondii* (DEVADA et al, 1998) e infecções experimentais nestes animais, mostraram o parasita em diversos órgãos como cérebro, pâncreas, baço, retina, fígado e coração (KANETO et al, 1997).

Toxoplasmose infecção, foi diagnosticada em perus selvagens de diversas regiões dos Estados Unidos, mostrando que a prevalência de anticorpos foi da ordem de 10% (QUIST et al, 1995) e, quando, esta pesquisa foi realizada em corujas e pombos os índices de infecção foram de 27,3% e 5,9% respectivamente (KIRKPATRICK et al, 1990). O parasita foi também, isolado de diversas aves de rapina, sendo o índice de infecção de 20 a 66,7%. Cegueira em diversos canários da Nova Zelândia foi atribuída ao *T. gondii*, sendo que o parasita foi encontrado no olho e cérebro dos animais através de imunohistoquímica (VICKERS et al, 1992). Outros grupos de aves como pombos (BIANCIFIORI et al, 1986), codornas do Japão (DUBEY et al, 1994a) e faisões (DUBEY et al, 1994b) também demonstraram ser susceptíveis à infecção quando experimentalmente inoculados.

2.6.5. TOXOPLASMOSE EM SUÍNOS

Em vários países foram descritos surtos de toxoplasmose referentes aos suínos que quando acometidos, desenvolvem encefalite, pneumonia, miocardite e necrose da placenta (DUBEY, 1986). A ocorrência da transmissão transplacentária de *T. gondii* ao feto, e aborto de fêmeas infectadas foram descritos por DUBEY et al (1990). Do ponto de vista epidemiológico, o consumo da carne suína infectada com cistos de *T. gondii* representa uma fonte importante de infecção para o homem (DUBEY et al, 1986; DUBEY, 1988; POP et al, 1989; DUBEY et al, 1990).

Levantamentos sorológicos mostraram que a prevalência, nos Estados Unidos, de animais com anticorpos contra *T. gondii* foi de 23,9% (DUBEY et al, 1991), no Canadá de 8,5% (GAJADHAR et al 1998), na Finlândia de 2,5% (HIRVELÄ-KOSKI, 1992) e na Tailândia de 47,11% (CHANG et al, 1991). Acredita-se, que na Europa, a taxa de parasitismo exceda a 50% em carcaças obtidas de matadouros (AMATO NETO et al, 1995).

2.6.6. TOXOPLASMOSE EM CÃES

Nos últimos anos, tem-se dado maior ênfase ao estudo da infecção toxoplásmica de animais domésticos, mormente o cão e o gato, devido ao contato estreito e freqüente destes com o homem. Para CARMONA (1960), este fato teria importância na cadeia epidemiológica da infecção humana.

A infecção canina por *T. gondii* foi descrita pela primeira vez por MELLO (1910), em Turim, na Itália, em uma cadela que apresentava febre, anorexia, emagrecimento, anemia, vômito, diarreia e que ao exame “post –mortem” revelou edema disseminado e pequenos nódulos com parasitas nos pulmões, exsudato sero-sanguinolento no tórax, úlceras intestinais e ligeira hipertrofia de fígado, baço e gânglios mesentéricos. No Brasil, a infecção foi descrita logo a seguir por CARINI (1911). Os animais jovens são mais susceptíveis à infecção

do que os adultos (DUBEY & BEATTIE, 1988). A toxoplasmose clínica, em cães, é usualmente encontrada em animais com viroses ou imunossuprimidos. A ocorrência de toxoplasmose primária em cães adultos, é raramente encontrada. PIMENTA et al (1993), descreveram infecção em cães isolando o parasita em intestino, estômago, fígado, pâncreas e pulmão dos animais. A ocorrência de infecção congênita e aborto em fêmeas gestantes, infectadas experimentalmente com *T. gondii*, foi relatada por BRESCIANI et al (1999).

LINDSAY et al (1997) demonstraram que cães infectados com oocistos esporulados, foram soropositivos para *T. gondii*, e eliminaram oocistos viáveis, nas fezes, dois dias após a infecção, sem apresentarem sinais clínicos da doença. Desta forma, os cães estariam envolvidos com a transmissão mecânica de *T. gondii* ao homem. O mesmo trabalho relata que oocistos não-esporulados quando colocados sobre a pele de cães, não chegam a esporular, sendo portanto, não-infectantes.

2.6.7. TOXOPLASMOSE EM GATOS

A infecção de gatos domésticos por *T. gondii* foi assinalada pela primeira vez por OLAFSON & MONLUX (1942), em um gato que apresentava aumento dos nódulos linfáticos mesentéricos, pequenas ulcerações intestinais e nódulos múltiplos nos pulmões. As formas sexuadas ou oocistos, resultantes do ciclo gametogênico que ocorre no epitélio intestinal dos felídeos, tem sido descritas por vários autores (HUTCHISON, 1965; HUTCHISON et al, 1970; FRENKEL et al, 1970; DUBEY, 1998). No Brasil, o ciclo gametogênico foi primeiramente estudado por DEANE et al (1971).

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar a soroprevalência da toxoplasmose no gato, mostrando taxas variáveis mas significativas de infecção (RIEMANN et al, 1978; DUBEY & THULLIEZ, 1989; LAPPIN et al, 1989; LAPPIN & POWELL, 1991; LAPPIN et al, 1992; TENTER et al, 1994; STILES et al, 1996). Em São Paulo, SOGORB et al, em 1972, encontraram 45% de animais positivos ao teste de Sabin-Feldman. LARSSON et al, em 1982, detectaram 40,8% de gatos positivos utilizando a reação de

Sabin-Feldman. SANTOS et al, em 1983, utilizando o teste de aglutinação passiva detectaram 59% de animais positivos. Estudo recente, mostra que a frequência de anticorpos anti-*T.gondii* foi significativamente maior, em animais alimentados com carne crua e com livre acesso à rua. Desta forma, o tipo de alimentação bem como, a manutenção do animal em ambiente exclusivamente domiciliar, ou com livre acesso à rua são fatores de risco igualmente importantes na ocorrência da infecção toxoplásmica em gatos (LUCAS et al, 1999).

A taxa de soropositividade em gatos domésticos varia entre 25 a 45%, embora possam existir gatos soronegativos que liberem oocistos pelas fezes (AMATO NETO et al, 1995). Além disso, gatos adultos soropositivos não mais eliminam oocistos pelas fezes embora, já, o tenham feito na fase aguda da doença. No caso de re-infecção, o parasita pode persistir no intestino do gato por mais 6 meses e ocorrer liberação ocasional de oocistos (DUBEY, 1993). O tempo para eliminação de oocistos, nas fezes de gatos infectados com *T.gondii*, parece estar associado à forma infectante do parasita. Quando a infecção é decorrente da ingestão de oocistos, os gatos eliminam oocistos viáveis nas fezes, de 3 a 10 dias pós-infecção. No entanto, quando ocorre ingestão de taquizoítos, a excreção inicia-se num período maior ou igual a 15 dias, e no caso de ingestão de bradizoítos, o início da excreção ocorre num período maior ou igual a 18 dias (DUBEY, 1996).

2.7. DIAGNÓSTICO

2.7.1. MÉTODOS DIRETOS

Existem casos em que se faz necessária a pesquisa direta de antígenos de *T.gondii* no material clínico, a fim de se fazer o diagnóstico diferencial entre os vários estágios da toxoplasmose. Nestes casos, nem sempre a pesquisa de imunoglobulinas IgG e IgM são capazes de dar ao clínico uma idéia exata da parasitemia que porventura esteja ocorrendo devido à infecção primária ou reativação de cistos latentes.

Os principais casos em que a pesquisa direta de antígenos e de DNA de *Toxoplasma* se faz necessário incluem:

- 1) Evidenciação de taquizoítos durante a parasitemia da fase aguda de adultos imunocompetentes, em material de biópsia de gânglios (GUIMARÃES et al, 1996), de cistos no SNC e, após centrifugação, em leite, sangue, saliva, medula óssea e exsudatos (AMATO NETO et al, 1995).
- 2) Retinocoroidite toxoplásmica em indivíduos imunocompetentes mediante PCR, como auxiliar no diagnóstico etiológico (AOUZERATE et al, 1993).
- 3) Indivíduos imunocomprometidos soroconvertidos que sofreram reagutização, ou soronegativos que sofreram infecção primária sintomática (DUPOUY-CAMET et al, 1993).
- 4) Mulheres gestantes sem sorologia pré-natal inicial ou com sorologia anterior negativa para *T.gondii*, que apresentem IgG e IgM positivos durante a gravidez, sendo necessário o diagnóstico pré-natal precoce da toxoplasmose congênita no feto. A determinação da presença do parasita na placenta, líquido amniótico e/ou sangue do cordão umbilical caracteriza parasitemia fetal e perfil agudo da infecção, sendo que o diagnóstico precoce permite a instituição rápida de terapêutica adequada nestes casos (DINIZ et al, 1991; HOHLFELD et al, 1994).

Com os materiais obtidos e concentrados por centrifugação, pode-se preparar esfregaços a serem corados pelo Giemsa e com materiais de biópsia, fazem-se cortes histológicos e coloração com hematoxilina-eosina (NEVES, 1985).

Os modelos experimentais citados na literatura para isolamento do parasita incluem as culturas celulares com células de mamíferos (*T.gondii* não cresce em meios de cultura livres de células), embrião de galinha e o método clássico de inoculação em animais. Dentre os animais sensíveis à inoculação, citam-se hamsters, cobaias, camundongos e coelhos. Destes, os camundongos são os de escolha por serem os mais susceptíveis à infecção por inoculação peritoneal, chegando a fornecer cifras de milhões de taquizoítos por mililitro no

curto espaço de tempo de 3 dias (PFEFFERKORN, 1990; DUBEY, 1993; AMATO NETO et al, 1995).

A sobrevida do camundongo infectado é curta, entre 4 a 6 dias, eventualmente chegando a 15 dias, ocorrendo acometimento visceral incluindo lesões necróticas no fígado, no baço e nos rins. Durante este período de infecção experimental, o camundongo infectado desenvolve cistos teciduais na musculatura e no cérebro (DUBEY, 1993; AMATO NETO et al, 1995).

Uma vez isolada, a cepa de *T.gondii* pode ser mantida para fins experimentais mediante reinoculação em camundongos ou em culturas celulares. Entretanto, a criopreservação *in vitro* tem sido um método prático para se evitar tanto a perda inesperada de camundongos infectados e da cepa, quanto a necessidade constante de inoculações que despendem tempo, material e pessoal tecnicamente treinado. Assim, taquizoítos podem ser mantidos, sem perda de viabilidade e virulência, entre - 20°C e - 60°C no máximo por oito semanas, a - 70 °C por pelo menos 200 dias e, em nitrogênio líquido (- 196 °C), por pelo menos 450 dias até um prazo de 8 anos, após terem sido submetidos a congelamento gradual (KOZOJED et al, 1985; LIN et al, 1995).

Em 1996, GUIMARÃES et al descreveram a realização de biópsia de linfonodo de adulto imunocompetente no diagnóstico da fase aguda da toxoplasmose adquirida após ingestão de carne de tatu. Técnicas imunohistoquímicas e histopatológicas, realização de exames sorológicos e imunofluorescência direta, ultrassonografia, raio X, tomografia computadorizada, além de cultivo celulares e inoculação em camundongo acompanharam a identificação do *Toxoplasma gondii*.

ARAÚJO & REMINGTON (1980) e BROOKS et al (1985) descreveram testes imunoenzimáticos de captura tipo ELISA em placa e em “dot-ELISA” para detecção de antígenos parasitários durante parasitemia da fase aguda da toxoplasmose adquirida. Com estes métodos pode-se detectar antigenemia em até 63,6% e 20% dos casos de linfadenopatia toxoplásmica aguda, respectivamente, por ELISA e “dot-ELISA”, sendo que a positividade é maior em amostras que apresentam perfil I de infecção. Entretanto, resultados discordantes podem ocorrer em função da transitoriedade e intermitência da

antigenemia (CAMARGO, 1996), e somente ensaios com vários soros coletados em diferentes intervalos durante a fase aguda ao lado de uma análise criteriosa dos resultados, poderá ajudar na interpretação e no diagnóstico da infecção.

Amostras de líquido amniótico e líquido de neonatos congenitamente infectados também são testadas por estes métodos incrementando, desta forma, o diagnóstico pré-natal do envolvimento fetal no decurso da infecção materna (ARAÚJO & REMINGTON, 1980; BROOKS et al, 1985).

A parasitemia tem sido detectada com maior sensibilidade através dos métodos de biologia molecular, em especial pela reação em cadeia de polimerase (PCR), com a vantagem de demonstrar maior sensibilidade quando comparado com o isolamento do parasita em culturas de tecidos. Contudo, como limitação da técnica, temos que a reação em si não discrimina se o material amplificado provém de parasitas viáveis ou de fragmentos do parasita.

Em indivíduos imunocompetentes com toxoplasmose aguda, PCR tem detectado a presença do parasita em tecidos de biópsia de linfonodo e amostras de sangue periférico (HOLLIMAN, 1994).

Em pacientes HIV positivos, a detecção do parasita por PCR em amostras de sangue periférico, material de biópsia, fluído de lavagem broncoalveolar e líquido apresenta a vantagem de não ser um método tão invasivo quanto a biópsia cerebral. Adicionalmente, PCR ainda tem sido utilizado em condições de imunocomprometimento derivado de transplantes e doenças malignas, em biópsia cardíaca, medula óssea e sangue (HOLLIMAN, 1994).

Na toxoplasmose ocular, PCR tem sido empregado em amostras de humor aquoso e tecidos oculares e muito embora apresente alta especificidade, baixa sensibilidade tem sido relatada dado muito mais à presença de inibidores do que ao volume de amostra disponível. Neste aspecto, vários autores têm sugerido o uso do coeficiente de WITMER-DESMONTS, que detecta a produção local de anticorpos pela relação entre as suas quantidades no humor aquoso e no soro do paciente, associado à

detecção do parasita no intuito de aumentar a probabilidade de se consumir o diagnóstico (AOUIZERATE et al, 1993; HOLLIMAN, 1994).

O diagnóstico do possível envolvimento fetal na primoinfecção materna reside na detecção do parasita em amostras de líquido amniótico e em sangue de cordão umbilical, por técnicas de aminocentese e cordocentese. Tais técnicas associadas a PCR vieram incrementar o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita demonstrando maior sensibilidade que o método de isolamento do parasita em culturas e em camundongo. Em neonatos, amostras de sangue e líquido podem ser utilizadas para demonstrar a presença do parasita decorrente de infecção fetal (HOHLFELD et al, 1994).

Recentemente, a PCR tem sido utilizada na pesquisa de cistos de *T.gondii* em carnes destinadas ao consumo humano como demonstrado por WARNEKULASURIYA et al (1998) que trabalharam com amostras de salsicha e presunto defumados e SILVA (1999) que trabalhou, em Botucatu (SP), com amostras de cérebro e diafragma de cordeiros sorologicamente positivos.

2.7.2. MÉTODOS INDIRETOS

O diagnóstico da infecção toxoplásmica reside na resposta humoral do indivíduo através da pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

A primeira reação desenvolvida para diagnóstico sorológico da infecção foi a de Sabin & Feldman, ou o clássico teste do corante, mundialmente conhecido pelo nome de “dye-test” (SABIN & FELDMAN, 1948). Por muito tempo, esta reação, foi utilizada tanto em diagnóstico quanto em inquéritos soroepidemiológicos, sendo considerada até hoje como teste de referência para a toxoplasmose, pois detecta anticorpos neutralizantes. Apesar de suas altas sensibilidade e especificidade, fatores como a necessidade de parasitas viáveis, a constante manipulação de camundongos infectados consistindo risco para os laboratoristas, entre outros, levaram o teste do corante a ceder lugar a outras técnicas mais fáceis e de aplicabilidade mais generalizada.

Com o intuito de aumentar a aplicabilidade das reações no diagnóstico da infecção toxoplásmica, em 1957, JACOBS & LUNDE preconizaram a reação de hemaglutinação passiva (HA). Esta reação, realizada em placas plásticas escavadas, baseia-se na aglutinação de eritrócitos sensibilizados com antígenos, por anticorpos aglutinantes. Demonstrando boa eficiência com baixo custo, HA tem sido utilizada, tanto no diagnóstico quanto na triagem, e em estudos soroepidemiológicos. O uso de 2-mercaptoetanol (2-ME) em paralelo ao teste em salina veio proporcionar a pesquisa de anticorpos IgM por HA em separado da pesquisa dos IgG. Isto se dá porque moléculas de IgM são quebradas pelo 2-ME, em condições de infecção aguda, o padrão de aglutinação cai vários títulos, denotando a presença destes anticorpos de fase aguda e propiciando a distinção de infecções agudas, das latentes e pregressas (CAMARGO et al, 1986). Incremento na sensibilidade do teste de HA foi conseguido com relação ao anticorpo M através da retirada de altas quantidades de IgG pelo tratamento prévio do soro com proteína A de *Staphylococcus aureus* (CAMARGO et al, 1983, 1989b).

Estudando diversas preparações antigênicas do parasita, YAMAMOTO (1987) desenvolveu um reagente para hemaglutinação passiva com boa estabilidade capaz de seletivamente reagir com anticorpos M de fase aguda de infecção toxoplásmica.

Hoje em dia, tem sido relatados novos tipos de reações de aglutinação utilizando-se parasitas tratados com formaldeído ou acetona e, partículas de látex recobertas com antígenos do parasita (CAMARGO, 1996).

Com o advento das técnicas de marcação de antígenos e anticorpos, as reações de imunofluorescência indireta (IFI) e imunoenzimática ELISA assumiram importante papel no diagnóstico da toxoplasmose, principalmente com a possibilidade de se determinar anticorpos de vários isotipos diferentes em função do conjugado utilizado (CAMARGO et al, 1978).

Devido a possibilidade de ocorrência de reações falso-positivas em IFI anti- IgM por conta de fator reumatóide, modificações objetivando a retirada deste fator pelo tratamento do soro com γ -globulina agregada, veio validar o

encontro de resultados positivos para IgM em IFI anti -IgM (CAMARGO et al, 1972).

De fato, em nosso meio durante as décadas de 70 e 80, CAMARGO et al estudaram exaustivamente a IFI em comparação à HA, ao ELISA e à reação de fixação do complemento. Com estes estudos puderam definir três perfis característicos de infecção toxoplásmica (CAMARGO & LESER, 1976b; CAMARGO et al, 1976a; 1977b; 1978a, 1978b, 1986; CAMARGO, 1989a), a saber:

- 1) Perfil I ou de fase aguda da primoinfecção: caracterizado por parasitemia e pelo encontro de anticorpos IgM, IgG de baixa avidéz, e mais recentemente descobertos, IgA e IgE. Títulos de HA tendem a ser menores que os de IFI anti-IgG e ELISA anti-IgG. Característico marcador desta fase de infecção é o encontro de IFI anti-IgM positiva de 3 a 6 meses após a infecção inicial. Os ensaios de ELISA de captura M também encontram-se positivos nesta fase.
- 2) Perfil II ou fase latente ou de transição: nesta fase o marcador IFI anti-IgM desaparece na maioria dos pacientes, muito embora, devido à alta sensibilidade, ELISA de captura M tende a manter-se positivo por muitos meses e até anos, perdendo desta forma, o sentido de marcador de fase aguda. Nesta fase, os títulos HA, IFI anti-IgG e ELISA anti-IgG apresentam-se mais altos, no caso de HA em função da presença de anticorpos com maior avidéz. Os anticorpos IgA e IgE, os quais têm sido associados à fase aguda da infecção desaparecem nesta fase.
- 3) Perfil III ou fase crônica: este perfil costuma se manter por toda a vida do indivíduo imunocompetente desde que não há relatos sobre o desaparecimento total de anticorpos IgG anti-*T.gondii* e negatificação completa das reações sorológicas nos indivíduos soropositivos. Os anticorpos IgG são de alta avidéz e mantem-se em títulos baixos revelados por IFI anti-IgG, HA e ELISA anti-IgG. Os anticorpos M revelados por ELISA já se encontram negativados e não se evidencia parasitemia nem detecção de parasitas por PCR.

Além disso, na tentativa de uniformizar os resultados qualitativos e quantitativos das reações sorológicas em todos os laboratórios, estes pesquisadores publicaram artigo abordando o uso rotineiro de soros controles padrão primário, secundário e terciário em todas as rotinas laboratoriais, além da padronização de procedimentos, aparelhagem e liberação de resultados em Unidades Internacionais (CAMARGO et al, 1977a).

Estudos mostram que anticorpos IgG de baixa avidéz têm baixo poder aglutinante e são os responsáveis pelos baixos títulos demonstrados pela HA na fase aguda da infecção, sendo esta característica aglutinante irrelevante para IFI e técnicas imunoenzimáticas. Por este motivo vários autores citam que o teste de avidéz realizado em placa de ELISA com o uso de uréia 6M, pode ser encarado como um marcador adicional de fase aguda da infecção (HEDMAN et al, 1989; CAMARGO et al, 1991; CAMARGO, 1996). Adicionalmente, tem sido descrito o uso das reações de avidéz de anticorpos IgG no diagnóstico da primoinfecção materna durante a gestação (LAPPALAINEN et al, 1993) e como auxílio no diagnóstico da retinocoroidite toxoplásmica (JOYNSON et al, 1990).

Nos últimos anos, tem-se estudado o papel potencial das imunoglobulinas A e E como marcadores de fase aguda que possam determinar a época presumível da primoinfecção. Isto porque, em ensaios imunoenzimáticos de captura, sua permanência no soro tem se mostrado mais fugaz que a do IgM, o qual pode persistir de poucas semanas a anos (HALL, 1992; CAMARGO, 1996).

O diagnóstico da toxoplasmose congênita no recém-nascido com base na determinação de anticorpos esbarra nas variações de resposta para imunoglobulinas M, G, e A fetais, em decorrência tanto da presença de anticorpos maternos que possam mascarar as reações, quanto da idade e maturidade fetais em que a infecção ocorreu (REMINGTON & DESMONTS, 1973).

Nestes casos, o encontro de IgG não tem significado por este ser devido à transmissão passiva, muito embora títulos altos relacionados aos perfis I e II sejam sugestivos de infecção recente adquirida pela mãe e a queda de título até sua negativação não exclua a possibilidade de infecção congênita devido à

produção tardia de anticorpos (DINIZ et al, 1991). Os anticorpos IgM, por sua vez, quando presentes denotam infecção ativa na medida em que não ultrapassam a barreira placentária sendo, portanto, produzidos pelo recém nascido. Do mesmo modo, podem não aparecer na totalidade dos casos de infecção congênita tanto pela não produção ou aparecimento fugaz, quanto pela competição com IgG materna, durante a reação de IFI. Em reações imunoenzimáticas de captura, a positividade IgM em recém nascidos pode chegar a 80% ou mais. Resultados falso-positivos em IFI-M podem acontecer em função da presença de fator reumatóide que deverá ser retirado a fim de validar o teste. Novas perspectivas se abriram através da pesquisa de IgA e após o desenvolvimento de novas técnicas de coleta de sangue fetal do cordão a partir da 20ª semana de gestação, possibilitando a determinação da infecção fetal e a suposição da data de seu início (DINIZ et al, 1991).

2.8. TRATAMENTO E IMUNIZAÇÃO

O tratamento para a toxoplasmose é baseado em inibidores da síntese de ácidos nucleicos, como a sulfa e pirimetamina, apesar destas drogas apresentarem alto grau de mielotoxicidade (KOSKINIEMI et al, 1989). Embora o tratamento consiga controlar as formas de rápida proliferação, não existe nenhuma droga que consiga eliminar os cistos teciduais latentes em humanos e animais, e estes se mantêm viáveis por longos períodos podendo reativar a infecção (BEAMAN et al, 1992; WINSTANLEY, 1995).

Até o momento, não existe nenhuma vacina comercial contra a toxoplasmose humana que previna a infecção congênita, ou a formação e reativação de cistos (GOTTSTEIN, 1995). A única vacina registrada é a Toxovax, para uso em ovelhas que utiliza taquizoítos viáveis da cepa S48 (BUXTON, 1993). Em ensaio utilizando ovelhas imunizadas com esta vacina atenuada e posteriormente desafiadas com oocistos, foi mostrado uma eficiência parcial de proteção com 80% dos fetos livres de infecção em ovelhas vacinadas (BUXTON et al, 1991).

Outros modelos de imunizações utilizando parasitas vivos, de baixa patogenicidade, foram ensaiados, mas pelo fato dos indivíduos permanecerem infectados durante muito tempo, provavelmente por toda a vida, não se pode descartar a possibilidade do hospedeiro ter uma perda da imunidade, causando recrudescência da infecção e conseqüentemente lesões graves. A imunização com parasitas mortos também foi testada, mas a imunidade apresentada em ovelhas foi de curta duração, como demonstrado pelo desafio com cepas patogênicas (WANDELAND & FRENKEL, 1983), mesmo utilizando adjuvante incompleto de Freund, sem proteção dos animais contra novos desafios (BUXTON, 1993).

Várias tentativas de definir uma fração antigênica estável e imunizante foram tentadas, com antígenos particulados (KRAHENBUHL et al, 1972), ou proteínas purificadas de membrana, como a p30 ou SAG-1 (GRIMWOOD & SMITH, 1996), mas com resultados erráticos e por vezes com piora do sistema de defesa do agente.

As dificuldades de obtenção em massa de antígeno levaram a modelos de produção de proteínas recombinantes, na busca de antígenos majoritários detectados nos soros de pacientes. Inicialmente, a proteína p30 majoritária da membrana foi escolhida como alvo, com bons resultados iniciais (DARCY et al, 1992), mas a produção de anticorpos monoclonais contra esta proteína mostrou que apenas alguns destes anticorpos eram eficientes na produção do bloqueio da infecção, sugerindo que epítomos conformacionais ou específicos eram de fundamental importância na indução de proteção (VELGE-ROUSSEL et al, 1994). Outros modelos de construção de proteínas híbridas, para melhorar a imunogenicidade resultaram em achados contraditórios (LUNDEN et al, 1997), provavelmente pela necessidade de uma resposta conformacional específica tanto celular como humoral (KHAN et al, 1988). Estes fenômenos imunológicos sugerem que a melhor imunização é aquela que possa oferecer os antígenos mais semelhantes ao parasita original.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar as fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo.

3.2. ESPECÍFICOS

3.2.1. Avaliar, em espécies animais, cuja carne é utilizada para consumo humano, a prevalência da infecção por *T.gondii* por um teste imunoenzimático, com estimativa indireta da incidência em cada espécie pela avidéz de anticorpos.

3.2.2. Avaliar a contaminação ambiental por *T.gondii*, a partir da prevalência sorológica da toxoplasmose em cães não domiciliares, com estudos da avidéz de anticorpos para estimativa da incidência da doença canina.

3.2.3. Avaliar sorologicamente e parasitológicamente a toxoplasmose em gatos não domiciliares para avaliação da fonte de infecção por oocistos.

3.2.4. Avaliar a presença de oocistos de *T.gondii* em água utilizada consumo humano.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÁREAS DE ESTUDO

4.1.1. REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO

4.1.1.1. MUNICÍPIO DE MAUÁ

Situada no Grande ABC, Mauá é um dos trinta e nove municípios que compõem a Região Metropolitana de São Paulo. Ocupa uma área urbana de 67 Km². Segundo o último censo realizado pelo IBGE, Mauá possui mais de 364 mil habitantes e está entre as 15 cidades com maior número populacional do Estado. As atividades econômicas predominantes são a indústria, o comércio e a prestação de serviços.

4.1.1.2. MUNICÍPIO DE OSASCO

Situado a sudeste do Estado de São Paulo e a oeste da região metropolitana de São Paulo, o município de Osasco possui uma área de 66,9 Km². A população tem uma composição heterogênea e é estimada em 648.035 habitantes.

As atividades econômicas predominantes são a indústria, o comércio e a prestação de serviços. O parque industrial engloba cerca de 500 indústrias, principalmente metalúrgicas, têxteis, derivados de madeira e alimentícias

4.1.1.3. MUNICÍPIO DE RIBEIRÃO PIRES

O município de Ribeirão Pires, localizado na Região Metropolitana de São Paulo, ocupa uma área de 107 Km² e possui aproximadamente 103 mil habitantes. As atividades econômicas predominantes são a indústria, o comércio e a prestação de serviços.

4.1.1.4. MUNICÍPIO DE SÃO BERNARDO DOS CAMPOS

Localizada na região metropolitana de São Paulo, São Bernardo dos Campos ocupa uma área de 411 Km² e possui 658.689 habitantes. As atividades econômicas predominantes são a indústria, o comércio e a prestação de serviços.

4.1.2. REGIÃO CENTRO-OESTE

4.1.2.1. MUNICÍPIO DE BOTUCATU

Situada na região Centro-oeste do Estado de São Paulo, a cidade de Botucatu, possui uma área de 1.496 Km² e uma população de aproximadamente 105 mil habitantes. Como atividades econômicas, a indústria, ocupa o primeiro lugar, seguida pelo comércio e agricultura.

Botucatu é sede de uma Regional Agrícola que responde por mais 10 municípios vizinhos (Anhembi, Areiopólis, Bofete, Conchas, Itatinga, Laranjal Paulista, Pardinho, Pereiras, Pratânia e São Manuel). Dentre as principais culturas, destacam-se a braquiária, eucalipto, cana de açúcar, laranja, milho, capim Napier, limão e café. Segundo o IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal (1997), a atividade pecuária da região tem como principais criações: frangos de corte (376.453 cabeças) bovinos (55.816 cabeças), suínos (4.000 cabeças), bubalinos (790 cabeças), ovinos (2.480 cabeças) e caprinos (601 cabeças).

4.1.2.2. MUNICÍPIO DE SÃO CARLOS

Localizada no centro do Estado de São Paulo, a cidade de São Carlos, possui uma população de 180 mil habitantes. Os produtos agropecuários incluem o leite, a laranja e a cana de açúcar. O setor industrial e o de serviços são dominantes. Segundo o IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal (1997), a atividade pecuária da região tem como principais criações: frangos de corte (16.000 cabeças), bovinos (46.515 cabeças), suínos (21.000 cabeças), ovinos (1.200 cabeças) e caprinos (150 cabeças).

4.1.2.3. MUNICÍPIO DE SÃO MANUEL

Localizado na região Centro-oeste do Estado de São Paulo, o município de São Manuel, possui uma área de 666 Km² e uma população de aproximadamente 36 mil habitantes. Dentre as principais culturas, destacam-se a cana de açúcar, braquiária, eucalipto, café, milho, laranja, capim-colonião, pinus e capim Napier. Segundo o IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal (1997), a atividade pecuária da região tem como principais criações: frangos de corte (390.000 cabeças), bovinos (16.389 cabeças), suínos (3.924 cabeças) e ovinos (2.580 cabeças).

4.1.3. REGIÃO SUDOESTE

4.1.3.1. MUNICÍPIO DE TAQUARITUBA

Situada na região Sudoeste do Estado de São Paulo, possui uma área de 453 Km² e uma população estimada em 22 mil habitantes. É centro de uma micro-região que abrange 11 municípios e uma população de aproximadamente 100 mil habitantes.

Tem como principal economia a agricultura e a pecuária além do comércio. Segundo o IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal (1997), a atividade pecuária da região tem como principais criações: a bovina (27.200 cabeças), a suína (11.080 cabeças), frangos de corte (2.600 cabeças); a ovina (860 cabeças) e a caprina (150 cabeças).

A Figura 2 mostra a localização das áreas de estudo no Estado de São Paulo.

FIGURA 2: Localização das áreas de estudo no Estado de São Paulo.

4.2. ANIMAIS

4.2.1. ANIMAIS DE PRODUÇÃO

4.2.1.1. BOVINOS

Para estudo da prevalência sorológica da toxoplasmose em bovinos, foram analisadas 200 amostras de soros de animais, com idade entre 2,5 a 3 anos, abatidos na cidade de Taquarituba, região Sudoeste do Estado de São Paulo.

4.2.1.2. OVINOS

Para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.gondii*, foram analisadas amostras de soro de 200 ovinos, com idade entre 6 a 8 meses, abatidos na cidade de São Manuel, região Centro-oeste do Estado de São Paulo.

4.2.1.3. CAPRINOS

Para determinação da taxa de infecção por *T.gondii*, foram analisadas amostras de 200 caprinos, com idade entre 2 a 24 meses, provenientes da cidade de Botucatu, região Centro-oeste do Estado de São Paulo.

4.2.1.4. FRANGOS DE CORTE

O estudo da prevalência sorológica da toxoplasmose em frangos de corte, foi feito em 185 amostras de soros de animais, com aproximadamente 45 dias, abatidos na cidade de Botucatu, região Centro-oeste do Estado de São Paulo.

4.2.1.5. SUÍNOS

Níveis de anticorpos IgG anti-*T.gondii* foram determinados em 200 amostras de soros de animais, com 6 meses de idade, abatidos na cidade de Osasco, São Paulo.

4.2.2. CÃES E GATOS NÃO DOMICILIADOS

4.2.2.1. CÃES

Foram analisadas amostras de soro de 200 cães, com idade entre 1 a 12 anos, capturados pelos serviços dos Centros de Controle de Zoonoses dos municípios de São Bernardo dos Campos (115 animais), Mauá (50 animais) e Ribeirão Pires (35 animais). Todos estes animais foram doados ao Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo destinados à pesquisa de acordo com as normas de ética vigentes.

4.2.2.2. GATOS

A prevalência sorológica da toxoplasmose felina, foi determinada em 100 amostras de soros de animais, com 1 a 5 anos, mantidos na sede da UIPA (União Internacional de Proteção Animal) em São Paulo.

4.3. PARASITAS

4.3.1. OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO PARASITÁRIA

Os parasitas utilizados nos testes sorológicos foram obtidos do lavado intracavitário de camundongos previamente infectados com a cepa RH de *T.gondii* e células de sarcoma TG 180.

4.3.1.1. MANUTENÇÃO DA CEPA RH DE *Toxoplasma gondii*

Suspensões de *T. gondii*, cepa RH, descrita por Sabin e Feldman (1948), foram obtidas por meio de sucessivas passagens com intervalo de 3 a 4 dias, em camundongos Swiss não isogênicos, pesando em torno de 20g, e com idade variando entre 30 e 60 dias. Cada animal foi inoculado, por via intraperitoneal, com 0,2 ml de exsudato, contendo 10^6 taquizoítos/ml, obtido após lavagem intracavitária com 5ml de PBS 0,01M pH 7.2 estéril com antibióticos (Penicilina Cristalina 25.000UI/ml e Estreptomicina 10mg/ml), de camundongos previamente infectados.

4.3.1.2. MANUTENÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DO SARCOMA TG 180

As células de sarcoma foram mantidas por meio de sucessivas passagens, com intervalo de 10 a 12 dias, em camundongos com as mesmas características daqueles utilizados para a obtenção dos parasitas. Cada animal foi inoculado, por via intraperitoneal, com 0,3 ml de uma solução 1:10 em PBS 0,01M pH 7.2 do exsudato obtido após lavagem intracavitária com 5 ml de PBS, 0,01M pH 7.2 estéril contendo antibióticos (Penicilina Cristalina 25.000UI/ml e Estreptomicina 10mg/ml), de camundongos previamente infectados.

A quantificação dos taquizoítos presentes no lavado peritoneal dos animais inoculados com *T. gondii*, assim como, dos inoculados com células de sarcoma foi realizada em câmara de Neubauer, sob objetiva de 40X, sendo o resultado expresso em números de parasitas $\times 10^6$ por mililitro. Para avaliação e documentação foi realizado esfregaço, em lâmina, de cerca de 10 μ l da suspensão parasitária purificada. O material foi fixado com metanol absoluto durante 15 minutos e corado com corante de Giemsa (1/20) em solução tamponada com Tris-HCl pH 7,2 por 15 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada em água corrente, seca ao ar e observada em microscópio Olympus, sob imersão.

4.3.1.3. MANUTENÇÃO DA CEPA RH DE *T.gondii* COM CÉLULAS DERIVADAS DO SARCOMA TG180

De acordo com DESMONTS & REMINGTON (1980) a co-injeção de *T. gondii* com células TG180, derivadas do sarcoma 180 ATCC (CCRF S-180), em camundongos, propicia a obtenção de um número elevado de parasitas no exsudato peritoneal dos animais infectados. Em nosso trabalho, suspensões contendo células de sarcoma e taquizoítos na proporção de 1:3 respectivamente, foram inoculadas, por via intraperitoneal, em camundongos Swiss. Cada animal foi inoculado com 1ml da suspensão e, após 48 horas, foi feita a lavagem intracavitária dos mesmos para obtenção da suspensão parasitária.

4.3.2. PURIFICAÇÃO DOS PARASITAS

A suspensão resultante do lavado intracavitário dos animais infectados com *T.gondii* e células derivadas do sarcoma TG 180 foi submetida à centrifugação sobre gradiente de Ficoll-Hypaque 10% (2g de Ficoll –Sigma®; 3,6 ml de Hypaque 50% - Sianofi Winthrop® completados para 20 ml de água bidestilada), a 5000rpm por 30 minutos, a 20°C. As células presentes no lavado, quando submetidas à centrifugação sobre este gradiente, foram separadas de acordo com a diferença entre suas densidades, sendo o produto final composto por 3 frações (sobrenadante representado por um número muito pequeno de monócitos, camada intermediária formada pelos leucócitos e sedimento formado por taquizoítos e algumas células tumorais) que foram observadas entre ao microscópio, sob objetiva de 40X. Após microscopia, o sobrenadante e a camada intermediária foram desprezados e, o sedimento foi centrifugado três vezes a 2000rpm, por 10 minutos para remoção do Ficoll-Hypaque. Em seguida, o sedimento foi aliquoteado e mantido a -70°C até o momento da preparação do antígeno. Preparações cujo resultado final mostrou mais que 1 célula nucleada de mamífero por 1000 taquizoítos foram utilizados somente para preparação de lâminas para reação de Imunofluorescência indireta.

4.3.3. PREPARO DO EXTRATO ANTIGÊNICO SOLÚVEL

Suspensões purificadas de *T.gondii* foram adicionadas de 5ml de água destilada e submetidas à sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc., USA), a 40 ciclos por 4 períodos de 30 segundos, em banho de gelo. Após certificação microscópica da lise dos protozoários, acrescentou-se 5ml de solução de NaCl 0,3M para isotonizar a suspensão e centrifugou-se a 10.000g por 30 minutos, a 4°C segundo metodologia descrita por CAMARGO (1978). O sedimento foi aliquotado e mantido a -70°C.

4.3.3.1. DOSAGEM PROTEICA

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). Para obtenção da curva padrão com 7 pontos, utilizou-se uma solução padrão de γ -globulina humana (Behring®) na concentração de 1mg/ml. Este método, baseia-se no fato de que determinados aminoácidos hidrófobos, como a tirosina, podem se ligar ao Coomassie Brilliant Blue, presente no reagente de Bradford, formando um complexo corante-proteína e, que esta proteína, quando, em meio altamente ácido, acaba interferindo na absorvância do corante, ocasionando uma modificação proporcional da cor detectável do mesmo a 595nm

Um volume de 20ul do extrato antigênico foi adicionado em 1ml de reagente de Bradford e 50ul de solução de NaOH 1M. A leitura espectrofotométrica foi feita a 595 nm (Ultrospec 3000 - Pharmacia Biotech) e de acordo com a curva de calibração realizada com a γ -globulina humana [(D.O. 595 nm* 2,993) - 0,057] obteve-se a concentração proteica.

4.3.3.2. ELETROFORESE DO EXTRATO ANTIGÊNICO EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE DODECIL-SULFATO DE SÓDIO (SDS - PAGE)

Amostras de *T.gondii* purificadas foram submetidas à análise de mobilidade eletroforética e constituintes protéicos por meio de SDS -PAGE

(LAEMLI, 1970), num sistema descontínuo e denaturante utilizando o sistema Mini-Protean II (BIO-RAD®).

O gel de empilhamento composto por Acrilamida-Metileno Bisacrilamida 5% em tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6.8 com SDS 0,1% e gel de resolução contendo Acrilamida-Bisacrilamida 12% em tampão Tris-HCl 0,375 M pH 8.8 com SDS 0,1% foi polimerizado quimicamente pela adição de TEMED e persulfato de amônio.

Todas as amostras, bem como, o padrão de baixo peso molecular (Pharmacia®), presente no Quadro 1, foram denaturadas e reduzidas após a dissolução em tampão de amostra (Tris - HCl 0,0625, SDS 2%, glicerol 10%, β -Mercaptoetanol 5%, uréia 1M, Azul de Bromofenol 0,001% 50% v/v), e aquecimento em banho-maria a 100°C por 3 minutos.

Foram aplicados 300 μ l (10 μ g/ml) da amostra por poço, e a corrida eletroforética foi realizada na presença de Tris 0,025M - Glicina 0,192M pH 8.3, a 120V (20-30 mA) por cerca de 1 hora.

Após corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%, metanol 45% e ácido acético 10% por 4 horas à temperatura ambiente e, em seguida, descorados com uma solução de metanol 10% e ácido acético glacial 5%.

Quadro 1: Proteínas usadas como referência para SDS – PAGE.

Proteínas	Peso molecular (Da)
Fosforilase B	94.000
Albumina bovina	67.000
Ovalbumina	43.000
Anidrase carbônica	30.000
Inibidor de tripsina	20.100
α Lactalbumina	14.400

4.3.3.3. PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO SOLÚVEL PARA OS ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS

4.3.3.3.1. PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO SOLÚVEL PARA O ELISA

O extrato antigênico solúvel com teor protéico de 1500 µg/ml foi testado nas concentrações de 5, 10 e 20µg/ml frente aos soros controle positivo e negativo nas diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024; 1/2048 e 1/4096. Os conjugados anti-IgG espécie-específicos, marcados com peroxidase (Sigma[®]), foram diluídos em diferentes concentrações frente aos soros controle positivo e negativo. Tanto os soros como os conjugados foram utilizados num volume final de 100µl/poço e permaneceram incubados a 37⁰C por 1 hora.

4.3.3.3.2. PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO SOLÚVEL PARA O WESTERN BLOTTING

Foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE para concentrações de 5µg/ml, 10µg/ml e 20µg/ml de extrato antigênico solúvel com teor protéico de 1500µg/ml. Após transferência das frações protéicas do antígeno para membranas de nitrocelulose e bloqueio de sítios livres, os conjugados anti-IgG espécie-específicos (Sigma[®]) foram testados em diferentes concentrações frente aos soros controle positivo e negativo, ambos na diluição de 1/100.

4.3.4. PREPARO DO ANTÍGENO FORMALIZADO PARA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Suspensões purificadas de *T.gondii* foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos a 4⁰C. Em seguida, o material foi centrifugado novamente, com meio de Eagle contendo 0,1% de BSA. Após centrifugação, adicionou-se 10 ml de solução contendo 200ml de formol, 10 ml de meio Eagle e 100 ml de BSA a

10%, e a suspensão parasitária permaneceu por 45 minutos a 37°C. Após incubação, o material foi centrifugado, três vezes, com PBS 0,01M pH 7.2 para remoção do formol e o sedimento foi examinado ao microscópio sob objetiva de 40X, diluindo-se a suspensão até a obtenção de 20 a 30 parasitas por campo microscópico.

Esta mistura foi distribuída em volume de 10µl em lâminas esmaltadas de 26x76 mm para microscopia (BioGlass®), aspirando-se o excesso, para formação de uma película delgada sobre a lâmina.

4.4. SOROS

4.4.1. OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO

As amostras de sangue dos bovinos, ovinos, suínos e frangos de corte foram obtidas no momento do abate dos animais, por secção da veia jugular, e as dos caprinos, cães e gatos por punção venosa. O material coletado foi submetido à centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos para separação do soro.

Todos os soros foram conservados (v/v) em glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato 0,5 M pH 8.5 e acondicionados a -20°C até o momento do uso.

4.4.2. SOROS PADRÃO POSITIVO E PADRÃO NEGATIVO

Os soros padrão positivo e padrão negativo utilizados nos ensaios imunoenzimáticos foram selecionados a partir de triagem prévia pela IFI.

4.4.3. SORO LIMIAR DE REATIVIDADE (SLR)

Um soro limiar de reatividade foi criado para cada espécie em estudo, com a finalidade de facilitar a distinção entre amostras positivas e negativas, no teste de ELISA. Considerou-se como SLR, o menor nível de reação positiva detectável, a partir da diluição de um soro positivo, de título conhecido pela IFI, em um soro sabidamente negativo.

O SLR foi ensaiado, em todas as placas, sempre em duplicata, sendo que a média das duplicatas foi considerada como limiar de reatividade para cada ensaio.

4.5. CONJUGADOS

4.5.1. PADRONIZAÇÃO DOS CONJUGADOS ANTI-IgG UTILIZADOS NO ELISA E NO WESTERN BLOTTING

Os conjugados anti-IgG espécie-específicos, marcados com peroxidase (Sigma®)*, foram testados com 5, 10 e 20 µg/ml de extrato antigênico solúvel. Os conjugados foram diluídos em diferentes concentrações frente aos soros padrão positivo e padrão negativo, ambos, nas diluições de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64.

4.6. SOROLOGIA

4.6.1. IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

A pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.gondii* foi realizada segundo metodologia descrita por CAMARGO & LESER (1976). Lâminas para fluorescência contendo 20 a 30 taquizoítos formolizados por orifício, receberam 10 µl de soro na diluição de 1/8 e foram incubadas a 37° C, em câmara úmida, por 30 minutos.

Decorrido o período de incubação, as lâminas foram lavadas três vezes, por 10 minutos cada, com PBS 0,01M pH 7.2. Em seguida, foram adicionados 10 µl de conjugado marcado com fluoresceína e, as lâminas foram novamente incubadas a 37° C, em câmara úmida, por 30 minutos. Os conjugados foram diluídos em solução de Azul de Evans 0,01% em PBS.

* Todos os anticorpos anti-IgG espécie-específicos, utilizados neste trabalho, foram obtidos da Sigma® já conjugados à peroxidase, com exceção, do anti-IgG felino, cuja conjugação foi realizada no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Após incubação com o conjugado, as lâminas foram novamente lavadas três vezes com PBS e secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato 0,5M pH 8.5 e lamínulas de 24x50mm (GlassTécnica[®]) para posterior leitura.

A leitura das lâminas foi feita sob objetiva de 40X, em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioskop[®]) com sistema de filtros para fluoresceína e lâmpada de mercúrio de 100V, considerando-se positiva a diluição onde os taquizoítos apresentaram uma clara fluorescência verde na membrana celular, contra o fundo vermelho das formas coradas pelo Azul de Evans. A ausência de fluorescência ou apenas na extremidade dos parasitas, conhecida como fluorescência polar, foi considerada como reação negativa.

4.6.2. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

4.6.2.1. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

A técnica foi desenvolvida de acordo com a metodologia descrita por VENKATESAN & WALKLIN (1993). Placas de poliestireno de 96 poços para microtitulação (Costar[®]) foram sensibilizadas com 100 µl/ poço com proteínas de *T. gondii* (extrato antigênico solúvel), suspensas em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9.5, na concentração de 10µg/ml de antígeno. Após sensibilização por 20 hs à 4⁰C, em câmara úmida, as placas foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,01M pH 7.2 contendo 0,02% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 3% de solução de leite desnatado (Molico[®]) em PBST durante 1 hora em estufa a 37⁰C.

Após bloqueio, as placas foram novamente lavadas três vezes e as amostras de soros (100µl/poço), diluídas 1:100 em PBST contendo 3% de leite desnatado, foram depositadas nas placas e incubadas a 37⁰C por 1 hora. Após 3 novas lavagens, foram aplicados 100µl por cavidade de conjugado imunoenzimático marcado com peroxidase e a placa foi novamente, incubada por 1 hora a 37⁰C.

Após lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5.8 contendo OPD 0,4mg/ml e H₂O₂ 0,03% e

interrompida, após 30 minutos, pela adição de HCl 4N. A leitura das densidades ópticas (DO) foi feita em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS) a 492 nm.

Todas as amostras positivas no ELISA foram submetidas ao western blotting para identificação do reconhecimento de proteínas específicas do *T.gondii* pelos anticorpos detectados no ELISA.

4.6.2.2. CRITÉRIOS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.6.2.2.1. ÍNDICE DE REATIVIDADE DAS AMOSTRAS (IR)

O índice de reatividade (IR) das amostras foi calculado dividindo-se a média das densidades ópticas da amostra pela média das duplicatas das densidades ópticas do soro SLR. O soro foi considerado positivo quando $IR \geq 1.0$ de acordo com a fórmula:

$$IR = \frac{\text{D.O amostra}}{\text{D.O SLR}}$$

4.6.2.2.2. UNIDADES (U)

A conversão da D.O. em Unidades (U) foi feita de acordo com cálculo:

$$U = \text{antilog} [\log (\text{D.O. média da amostra} - \text{D.O. média do soro negativo}) / \log (\text{D.O. média do soro positivo} - \text{D.O. média do soro negativo})] \times \log (\text{D.O. média do soro positivo}).$$

Foram consideradas positivas amostras com $U \geq 8$.

4.6.2.3. ESTUDO DA AFINIDADE FUNCIONAL OU AVIDEZ DOS ANTICORPOS IgG ANTI-*Toxoplasma gondii*

O teste de ELISA foi realizado como descrito no item 4.6.2.1, sendo que após a incubação das amostras, a primeira lavagem foi feita com solução de uréia 6M por 5 minutos. O índice de avides (IA) foi calculado pela relação da DO da amostra tratada com uréia pela D.O da amostra sem o tratamento com uréia, multiplicado por 100. Valores de IA maiores que 50% foram considerados de alta avides de anticorpos.

O cálculo do índice de avides foi feito a partir da fórmula:

$$IA = \frac{\text{D.O com uréia}}{\text{D.O sem uréia}} \times 100$$

4.6.2.4. REPRODUTIBILIDADE DO ELISA

4.6.2.4.1. ENSAIO INTRATESTE

Para avaliação da reprodutibilidade intrateste, todos os soros foram testados em duplicata, sendo as densidades ópticas (DO) submetidas à análise por regressão linear. Os soros padrão positivo, padrão negativo e SLR foram testados em todas as placas. O ensaio obedeceu ao protocolo de reação descrito no item 4.6.2.1.

4.6.2.4.2. ENSAIO INTERTESTE

Para avaliação do ensaio interteste, os soros foram testados em diferentes dias de ensaio, e as densidades ópticas obtidas foram comparadas com as anteriores e analisadas por regressão linear.

4.6.3. WESTERN BLOTTING (WB)

Para a realização do western blotting, amostras de *T.gondii* foram submetidas à análise de mobilidade eletroforética e constituintes protéicos por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE num sistema descontínuo e denaturante utilizando o sistema Mini-Protean II (BIO-RAD®) como descrito no item 4.3.3.2.

Após eletroforese, as proteínas de *T. gondii* foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore®), em sistema de transferência semi-seco Trans-Blot RD (BIO-RAD®) para posterior ensaio. O gel foi colocado sobre membrana de nitrocelulose, envolta por folhas de papel filtro embebidas em tampão de transferência de Towbin (25 mM Tris, 192 mM glicina, 205 metanol, pH 8.1-8.5). A transferência foi conduzida a 10V com amperagem constante por 30 minutos. Em seguida, a membrana foi corada com solução Ponceau 0,5% para verificação da eficiência da transferência. Para remoção do corante, as membranas foram lavadas várias vezes com PBS 0,01M pH 7.2 contendo 0,02% de Tween-20

As membranas foram cortadas em tiras de aproximadamente 0,4 mm e colocadas em bandejas de incubação com canaletas de 10,5 cm x 5 mm (BIO-RAD®), onde foram bloqueadas por imersão em 500 µl de solução de PBS 0,01M pH 7.2 contendo 0,02% de Tween-20 e 5% de leite desnatado - Molico® durante 18 horas sob agitação a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com 500 µl dos soros na diluição de 1/100 por 2 horas a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as membranas foram lavadas cinco vezes com PBS 0,01M pH 7.2 contendo 0,02% de Tween-20 e 5% de leite desnatado - Molico® e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com 500µl de conjugado imunoenzimático marcado com peroxidase. As membranas foram submetidas a mais cinco lavagens e, a reação foi revelada com solução cromógena (4-cloro-1-naftol, 6mg; metanol, 2ml; PBS 0,01M pH 7.2, 10ml; H₂O₂ 30%, 10µL).

4.6.4. HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA (HI)

O teste de hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos anti *T.gondii* foi feito através do kit comercial Salck Hap Toxoplasmose.

Previamente ao teste, os soros foram inativados por 30 minutos a 56⁰C. Todos os soros foram diluídos na concentração de 1:16 em diluente fornecido pelo kit.

Foram adicionados 25 µl de cada soro na diluição 1:16 em placas de microtitulação de fundo em “V” e, em seguida, adicionou-se 25 µl de hemáceas sensibilizadas com *Toxoplasma gondii*. Em todas as placas foram testados um soro controle positivo e um controle negativo, ambos, presentes no kit. As placas foram, então, homogenizadas e deixadas em repouso, em câmara úmida, por 1 hora.

A partir da leitura macroscópica do teste, interpretou-se como positivas, todas as reações, que resultaram na formação de uma rede ou malha semi-transparente sobre o fundo das cavidades. Por outro lado, as reações foram consideradas negativas quando formou-se um botão escuro, nítido, uniforme e sem halo reagente no fundo das cavidades.

4.7. ISOLAMENTO DO AGENTE

Foram pesquisadas formas de *T.gondii* em materiais biológicos de 10 gatos que apresentaram anticorpos, detectados pelo ELISA, contra o agente. Foram pesquisados também, oocistos de *T.gondii* em água potável destinada ao consumo humano em área de surto epidêmico da doença

4.7.1. DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *T.gondii* EM FEZES DE GATOS

4.7.1.1. COLETA E PRESERVAÇÃO DO MATERIAL

Amostras de fezes, removidas mecanicamente do intestino grosso dos animais, durante necropsia, foram mantidas em dicromato de potássio 2,5% (v/v) a 4⁰C, até o momento de serem processadas.

4.7.1.2. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DO PARASITA NAS FEZES

4.7.1.2.1. COLORAÇÃO DE KINYOUN

Os materiais fecais em suspensão de dicromato de potássio 2,5% foram adicionados de 3 volumes de água destilada, homogeneizados e centrifugados a 1000rpm por 15 minutos. Os precipitados foram utilizados para preparação de lâminas através de esfregaço localizado. Após secagem à temperatura ambiente, os esfregaços foram fixados com metanol anidro por 5 minutos e, corados por 10 minutos com fucsina carbólica (fucsina básica, 4g; álcool 96%, 20ml; cristal de fenol, 8g em 100ml de água destilada). Em seguida, o esfregaço foi lavado com ácido sulfúrico a 10% e água corrente. A contra-coloração foi realizada com azul de metileno a 1% por 4 minutos, com lavagem em água corrente. Os esfregaços foram examinados ao microscópio, em imersão.

4.7.1.2.2. MÉTODO DE SHEATHER MODIFICADO

Os materiais fecais foram submetidos à centrifugação em solução de açúcar de acordo com metodologia descrita por STRICKLAND (1991).

Foram colocados cerca de 1 a 2 ml de suspensão fecal em tubos de centrífuga e adicionou-se solução de Sheather (sacarose, 500 mg; fenol, 6,5 mg em 320 ml de água destilada) até 3/4 do tubo. Após agitação, o volume do tubo foi completado com solução de Sheather e o material foi centrifugado a 300g por 10 minutos. Em seguida, uma amostra do sobrenadante foi observada, entre lâmina e lamínula, ao microscópio, sob objetiva de 40X, para pesquisa de oocistos de *T. gondii* e outra parte, foi administrada em camundongos.

4.7.1.2.3. BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

Camundongos Swiss não isogênicos com idade entre 30 e 60 dias e sorologicamente negativos para *T. gondii* foram inoculados, por via oral, com

0,3 ml de suspensão fecal obtida após centrifugação das fezes com solução de Sheather. O material fecal, de cada gato, foi inoculado num grupo de dez camundongos que foram observados durante 45 dias. Durante este período, foram coletadas amostras de sangue dos animais, por punção do plexo orbital, para pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* por ELISA.

Após o período de experimentação, todos os camundongos foram sacrificados para pesquisa de cistos cerebrais. Os animais que vieram a óbito durante o período de estudo, também, foram submetidos à pesquisa de cistos cerebrais. Os camundongos foram sacrificados em cubas contendo algodão embebido em éter sulfúrico e, em seguida, os cérebros foram retirados e macerados, individualmente, com 3ml de PBS 0,01 M pH 7.2. A suspensão foi observada, entre lâmina e lamínula, ao microscópio, sob objetiva de 40X.

Os camundongos foram considerados *Toxoplasma*-negativos quando não foram visualizados cistos do parasita à microscopia óptica e pela ausência de anticorpos séricos específicos para *T.gondii* no ELISA.

4.7.2. DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *T.gondii* EM ÁGUA POTÁVEL

Foram analisadas amostras de água do reservatório central e da caixa d'água do restaurante do campus universitário de São Carlos - USP. As amostras foram coletadas em galões de plástico com capacidade para 20 litros, e enviadas ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Faculdade de Medicina - USP para pesquisa de oocistos de *Toxoplasma gondii* devido a um surto de toxoplasmose humana no campus universitário.

4.7.2.1. FILTRAÇÃO DO MATERIAL

Cerca de 40 litros de água foram submetidos ao processo de filtração em membrana não absorvente de poro de 0,22 µm (Millipore®), em sistema de bomba portátil. Em seguida, a membrana foi desintegrada mecanicamente em PBS 0,01M pH 7.2 e a suspensão foi administrada em camundongos.

4.7.2.2. BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

Camundongos Swiss não isogênicos e negativos sorologicamente para *T.gondii*, foram inoculados, por via oral, com 0,3 ml da suspensão descrita no item anterior. Os animais foram observados durante 45 dias sendo os procedimentos adotados, iguais aos descritos no item 4.7.1.2.3.

4.8. INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM FRANGOS DE CORTE

Para obtenção de soros padrão positivo e padrão negativo para os ensaios imunoenzimáticos, 3 galinhas com aproximadamente 45 dias, pesando 2Kg, foram infectadas com *Toxoplasma gondii* e mantidas em observação por um período de 45 dias, recebendo água e ração comercial “*ad libitum*”.

Antes da inoculação, por via intramuscular, com 10^6 taquizoítos da cepa RH de *T.gondii*, foram coletadas amostras de sangue dos animais, as quais foram submetida à IFI para detecção de anticorpos anti-*T.gondii*, permanecendo como padrões negativos. Para acompanhamento da infecção, amostras de sangue foram coletadas quinzenalmente, e analisadas pela IFI.

Após o período de experimentação, os animais foram sacrificados e necropsiados, sendo que fragmentos de musculaturas lisa, esquelética e cardíaca, cérebro e fígado foram mantidos em formol 10% para exames histopatológicos. Os exames foram realizados no Laboratório de Dermatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, de acordo com o protocolo descrito a seguir: os fragmentos dos órgãos foram submetidos aos processos de fixação em líquido de Bouin, desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanização em xilol e impregnação pela parafina. Destes materiais foram realizados cortes histológicos que foram corados pelo método de hematoxilina-eosina. Os cortes realizados em micrótomo, receberam dois banhos consecutivos em xilol puro por quinze minutos, seguidos de banhos em concentrações decrescentes de álcool por três minutos (álcool puro, álcool 95% e álcool 70%). Foram então, lavados em água corrente por cinco minutos e imersos em hematoxilina de Harris por três minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente por três minutos e diferenciados com

álcool ácido 0,5% (álcool 70% e ácido clorídrico). Após lavagem em água corrente por 15 minutos foram imersos em solução aquosa de eosina a 0,5% por trinta segundos, seguido de desidratação em álcool 95% por trinta segundos, em álcool absoluto durante dois minutos, em álcool-xilol durante três minutos e em xilol puro durante três minutos. Após montagem em lâmina e lamínula com resina sintética, os cortes foram lidos em microscopia de campo claro, observando-se a presença de formas parasitárias e lesões teciduais.

4.9. ANÁLISE DOS DADOS

Os índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa e valores preditivos positivo e negativo, os intervalos de confiança de 95% para proporções e a concordância entre testes (Índice Kappa) foram calculados pelo programa EpiInfo 6.04, sendo a reação de ELISA considerada como teste referência sem tentativas de comparações estatísticas mais complexas.

5. RESULTADOS

5.1. PARASITAS

5.1.1. DOSAGEM PROTEICA

O extrato antigênico solúvel, descrito no item 4.3.3, forneceu um volume total de 15 ml com teor protéico de 1500 µg/ml, com 22.5 mg totais, a partir de $1,5 \times 10^{10}$ taquizoítos.

5.1.2. ELETROFORESE DO EXTRATO ANTIGÊNICO EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE DODECIL-SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

O perfil da mobilidade eletroforética e constituintes protéicos de *T. gondii* purificado estão presentes na Figura 3, mostrando 3 produtos majoritários: um de 80kDa, provavelmente tubulina, um de 31 kDa representando a SAG1, e outro de 14kDa. Bandas mais fracas são visíveis em todo o gel.

FIGURA 3: Perfil da mobilidade eletroforética e constituintes protéicos de *T.gondii* purificado. (A) Padrão de baixo peso molecular. (B) Amostra de *T. gondii*.

5.1.3. PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO SOLÚVEL PARA O ELISA E WESTERN BLOTTING

O extrato antigênico forneceu melhores resultados discriminatórios na concentração de 10 µg/ml quando testado frente aos soros padrão positivo e padrão negativo como descritos nos itens 4.3.3.3, para as várias reações estudadas.

5.2. CONJUGADOS

5.2.1. PADRONIZAÇÃO DOS CONJUGADOS ANTI-IgG UTILIZADO NO ELISA E NO WESTERN BLOTTING

A titulação dos conjugados anti-IgG espécie-específicos, utilizados no ELISA, forneceu uma diluição final de 1/100 para o conjugado anti-IgG felino; 1/10.000 para os conjugados anti-IgG ovino, anti-IgG suíno e anti-IgG de galinha; 1/20.000 para os conjugados anti-IgG canino, anti-IgG bovino e anti-IgG caprino quando submetidos a uma concentração de 10µg/ml de extrato antigênico solúvel. No western blotting as diluições foram de 1/25 para o conjugado anti-IgG felino; 1/5.000 para os conjugados anti-IgG ovino e suíno; 1/10.000 para os conjugados anti-IgG canino, anti-IgG bovino e anti-IgG caprino.

5.3. SOROLOGIA

5.3.1. ELISA

5.3.1.1. ANIMAIS DE PRODUÇÃO

5.3.1.1.1. BOVINOS

As amostras de bovinos da região de Taquarituba foram testadas por ELISA, conforme descrito em métodos, após criteriosa padronização.

Os resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros bovinos estão presentes na tabela 1, mostrando uma positividade de 11% nas amostras estudadas.

A figura 4 mostra os resultados da distribuição dos soros bovinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e U, onde pode ser observada a clara delimitação entre positivos e negativos.

TABELA 1: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros bovinos.

	ELISA	
	IR	U
Positivo	22	22
Negativo	178	178
Total	200	200

FIGURA 4: Distribuição dos soros bovinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.

5.3.1.1.2. OVINOS

As amostras de ovinos da região de São Manuel foram testadas por ELISA, conforme descrito em métodos, após criteriosa padronização.

Os resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros ovinos estão presentes na tabela 2, mostrando uma positividade de 31% nas amostras estudadas.

A figura 5 mostra os resultados da distribuição dos soros ovinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e U, onde pode ser observada a clara delimitação entre positivos e negativos.

TABELA 2: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros ovinos.

	ELISA	
	IR	U
Positivo	62	62
Negativo	138	138
Total	200	200

FIGURA 5: Distribuição dos soros ovinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.

5.3.1.1.3. CAPRINOS

As amostras de caprinos da região de Botucatu foram testadas por ELISA, conforme descrito em métodos, após criteriosa padronização.

Os resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros caprinos estão presentes na tabela 3, mostrando uma positividade de 17% nas amostras estudadas.

A figura 6 mostra os resultados da distribuição dos soros caprinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e U, onde pode ser observada a clara delimitação entre positivos e negativos.

TABELA 3: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros caprinos.

	ELISA	
	IR	U
Positivo	34	34
Negativo	166	166
Total	200	200

5.3.1.1.4. FRANGOS DE CORTE

As amostras de frangos de corte da região de Botucatu foram testadas por ELISA, conforme descrito em métodos, após criteriosa padronização.

Os resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de frangos de corte estão presentes na tabela 4, mostrando uma taxa de infecção de 0% nas amostras estudadas.

A figura 7 mostra os resultados da distribuição dos soros de frangos de corte de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e U.

FIGURA 6: Distribuição dos soros caprinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.

TABELA 4: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de frangos de corte.

	ELISA	
	IR	U
Positivo	0	0
Negativo	185	185
Total	185	185

FIGURA 7: Distribuição dos soros de frangos de corte de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança. As barras laterais, vermelha e azul, correspondem, respectivamente, aos resultados do ELISA analisado pelo IR e por U para as amostras dos animais infectados experimentalmente.

5.3.1.1.5. SUÍNOS

As amostras de suínos da região de Osasco foram testadas por ELISA, conforme descrito em métodos, após criteriosa padronização.

Os resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros suínos estão presentes na tabela 5, mostrando uma positividade de 8,5% nas amostras estudadas.

A figura 8 mostra os resultados da distribuição dos soros suínos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e U, onde pode ser observada a clara delimitação entre positivos e negativos.

TABELA 5: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de suínos.

	ELISA	
	IR	U
Positivo	18	18
Negativo	182	182
Total	200	200

FIGURA 8: Distribuição dos soros suínos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.

5.3.1.2. CÃES E GATOS NÃO DOMICILIADOS

5.3.1.2.1. CÃES

As amostras de cães não domiciliados da região metropolitana de São Paulo foram analisadas por ELISA, conforme descrito em métodos, após criteriosa padronização.

Os resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros caninos estão presentes na tabela 6, mostrando uma positividade de 50,5% nas amostras estudadas.

A figura 9 mostra os resultados da distribuição dos soros de cães de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e U, onde pode ser observada a clara delimitação entre positivos e negativos.

TABELA 6: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de cães.

	ELISA	
	IR	U
Positivo	101	101
Negativo	99	99
Total	200	200

FIGURA 9: Distribuição dos soros caninos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.

5.3.1.2.2. GATOS

As amostras de felinos não domiciliados da região metropolitana de São Paulo foram testadas por ELISA, conforme descrito em métodos, após criteriosa padronização.

Os resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros felinos estão presentes na tabela 7, mostrando uma positividade de 40% nas amostras estudadas.

A figura 10 mostra os resultados da distribuição dos soros de gatos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e U, onde pode ser observada a clara delimitação entre positivos e negativos.

TABELA 7: Resultados do ELISA para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de gatos.

	ELISA	
	IR	U
Positivo	40	40
Negativo	60	60
Total	100	100

FIGURA 10: Distribuição dos soros felinos de acordo com os resultados do ELISA analisados pelo IR e por U. As áreas marcadas correspondem às amostras negativas com 99% de confiança.

5.3.1.3. REPRODUTIBILIDADE DO ELISA

5.3.1.3.1. REPRODUTIBILIDADE INTRATESTE

A figura 11 mostra os dados de reprodutibilidade intratestes do ELISA para cada espécie estudada, mostrando a correlação entre valores sempre maiores que 98%.

FIGURA 11: Reprodutibilidade intratestes do ELISA para amostras bovinas (A), ovinas (B), caprinas (C), suínas (D), frangos de corte (E), caninas (F) e felinas (G).

5.3.1.3.2. REPRODUTIBILIDADE INTERTESTE

A figura 12 mostra os dados de reprodutibilidade interteste do ELISA para cada espécie estudada, mostrando a correlação entre valores sempre maiores que 97%.

FIGURA 12: Reprodutibilidade interteste do ELISA para amostras bovinas (A), ovinas (B), caprinas (C), suínas (D), frangos de corte (E), caninas (F) e felinas (G).

5.3.1.4. VARIABILIDADE INTERPLACA DOS CONTROLES NEGATIVO, POSITIVO E LIMIAR

A figura 13 mostra os valores dos controles negativo, positivo e limiar em cada placa para as diferentes espécies estudadas, mostrando discreta variação na proporção de medidas interplacas, mas sempre uniformidade dos resultados.

FIGURA 13: Variabilidade interplaca dos controles negativo, positivo e limiar

5.3.1.5. AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Toxoplasma gondii*

5.3.1.5.1. ANIMAIS DE PRODUÇÃO

5.3.1.5.1.1. BOVINOS

Os resultados do ELISA para detecção da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros bovinos estão presentes na tabela 8, onde constatamos que todos os soros apresentaram alta avidéz de anticorpos.

A figura 14 mostra os resultados individuais da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* para soros bovinos.

TABELA 8: Avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros bovinos.

Avidéz de anticorpos	Número de amostras
Alta avidéz	22
Baixa avidéz	0
Total	22

5.3.1.5.1.2. OVINOS

Os resultados do ELISA para detecção da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros ovinos estão presentes na tabela 9, onde constatamos que todos os soros apresentaram alta avidéz de anticorpos.

A figura 15 mostra os resultados individuais da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* para soros ovinos.

FIGURA 14: Avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros bovinos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz de anticorpos.

TABELA 9: Avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros ovinos.

Avidéz de anticorpos	Número de amostras
Alta avidéz	62
Baixa avidéz	0
Total	62

5.3.1.5.1.3. CAPRINOS

Os resultados do ELISA para detecção da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros caprinos estão presentes na tabela 10, onde constatamos que 31 soros apresentaram alta avidéz, e 3 baixa avidéz de anticorpos, representando 9% da população positiva estudada.

A figura 16 mostra os resultados individuais da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* para soros caprinos.

Figura 15: Avidéz de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* dos soros ovinos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz de anticorpos.

TABELA 10: Avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros caprinos.

Avidéz de anticorpos	Número de amostras
Alta avidéz	31
Baixa avidéz	03
Total	34

FIGURA 16: Avidéz de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros caprinos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz e os vermelhos, as amostras de baixa avidéz de anticorpos.

5.3.1.5.1.4.SUÍNOS

Os resultados do ELISA para detecção da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros suínos estão presentes na tabela 11. Somente 1 soro apresentou alta avidéz de anticorpos, sendo o restante de baixa avidéz.

A figura 17 mostra os resultados individuais da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* para soros suínos.

TABELA 11: Avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros suínos.

Avidéz de anticorpos	Número de amostras
Alta avidéz	01
Baixa avidéz	16
Total	17

FIGURA 17: Avidéz de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros suínos. O círculo azul representa a amostra de alta avidéz e os vermelhos, as amostras de baixa avidéz de anticorpos.

5.3.1.5.2. CÃES E GATOS NÃO DOMICILIADOS

5.3.1.5.2.1. CÃES

Os resultados do ELISA para detecção da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros caninos estão presentes na tabela 12, mostrando aproximadamente 20% dos soros com baixa avidéz de anticorpos.

A figura 18 mostra os resultados individuais da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* para soros de cães.

5.3.1.5.2.2. GATOS

Os resultados do ELISA para detecção da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros felinos estão presentes na tabela 13, onde podemos constatar que 20% dos soros apresentaram baixa avidéz.

A figura 19 mostra os resultados individuais da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* para soros felinos.

TABELA 12: Avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros de cães.

Avidéz de anticorpos	Número de amostras
Alta avidéz	81
Baixa avidéz	20
Total	101

FIGURA 18: Avidéz de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros caninos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz e os vermelhos, as amostras de baixa avidéz de anticorpos.

TABELA 13: Avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros de gatos.

Avidéz de anticorpos	Número de amostras
Alta avidéz	32
Baixa avidéz	08
Total	40

FIGURA 19: Avidéz de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros felinos. Os círculos azuis representam as amostras de alta avidéz e os vermelhos, as amostras de baixa avidéz de anticorpos.

5.3.2. HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA

5.3.2.1. ANIMAIS DE PRODUÇÃO

5.3.2.1.1. BOVINOS

Os resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros bovinos estão presentes na tabela 14.

A tabela 15 apresenta os índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para bovinos.

A proporção de soros reagentes na HI em relação ao ELISA estão presentes na figura 20, juntamente com os intervalos de confiança de cada medida.

TABELA 14: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de bovinos.

		Hemaglutinação Indireta		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	06	16	22
	Negativos	13	165	178
	Total	19	181	200

5.3.2.1.2 OVINOS

Os resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros ovinos estão presentes na tabela 16.

A tabela 17 apresenta os índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para ovinos.

A proporção de soros reagentes na HI em relação ao ELISA estão presentes na figura 21, juntamente com os intervalos de confiança de cada medida.

TABELA 15: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para bovinos.

HI	IR	U
Sensibilidade relativa	27.3%	27.3%
(I.C.95%)	(11.6-50.4)	(11.6-50.4)
Especificidade relativa	92.7%	92.7%
(I.C.95%)	(87.6-95.9)	(87.6-95.9)
Valor Preditivo positivo	31.6%	31.6%
(I.C.95%)	(13.6-56.5)	(13.6-56.5)
Valor Preditivo negativo	91,2%	91,2%
(I.C.95%)	(85.8-94.7)	(85.8-94.7)

FIGURA 20: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras bovinas. As barras representam intervalo de confiança de 95%.

TABELA 16: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros ovinos.

		Hemaglutinação Indireta		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	33	29	62
	Negativos	03	135	138
	Total	36	164	200

TABELA 17: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para ovinos.

HI	IR	U
Sensibilidade relativa	53.2%	53.2%
(I.C.95%)	(40.2-65.8)	(40.2-65.8)
Especificidade relativa	97.8%	97.8%
(I.C.95%)	(93.3-99.4)	(93.3-99.4)
Valor Preditivo positivo	91.7%	91.7%
(I.C.95%)	(76.4-97.8)	(76.4-97.8)
Valor Preditivo negativo	82.3%	82.3%
(I.C.95%)	(75.4-87.7)	(75.4-87.7)

5.3.2.1.3. CAPRINOS

Os resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de caprinos estão presentes na tabela 18.

A tabela 19 apresenta os índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para caprinos.

A proporção de soros reagentes na HI em relação ao ELISA estão presentes na figura 22, juntamente com os intervalos de confiança de cada medida.

FIGURA 21: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de ovinos. As barras representam intervalo de confiança de 95%.

TABELA 18: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros caprinos.

		Hemaglutinação Indireta		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	30	04	34
	Negativos	42	124	166
	Total	72	128	200

TABELA 19: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para caprinos.

HI	IR	U
Sensibilidade relativa	88.2%	88.2%
(I.C.95%)	(71.6-96.2)	(71.6-96.2)
Especificidade relativa	74.7%	74.7%
(I.C.95%)	(67.3-81.0)	(67.3-81.0)
Valor Preditivo positivo	41.7%	41.7%
(I.C.95%)	(30.4-53.9)	(30.4-53.9)
Valor Preditivo negativo	96.9%	96.9%
(I.C.95%)	(91.7-99.0)	(91.7-99.0)

5.3.2.1.4. FRANGOS DE CORTE

Os resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de frango de corte estão presentes na tabela 20.

A proporção de soros reagentes na HI em relação ao ELISA estão presentes na figura 23, juntamente com os intervalos de confiança de cada medida.

FIGURA 22: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de caprinos. As barras representam intervalo de confiança de 95%.

TABELA 20: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de frangos de corte.

		Hemaglutinação Indireta		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	0	0	0
	Negativos	10	175	185
	Total	10	175	185

FIGURA 23: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de frangos de corte. As barras representam intervalo de confiança de 95%.

5.3.2.1.5. SUÍNOS

Os resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de suínos estão presentes na tabela 21.

A tabela 22 apresenta os índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para suínos.

A proporção de soros reagentes na HI em relação ao ELISA estão presentes na figura 24, juntamente com os intervalos de confiança de cada medida.

TABELA 21: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros suínos.

		Hemaglutinação Indireta		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	02	15	17
	Negativos	40	143	183
	Total	42	158	200

TABELA 22: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e U para suínos.

HI	IR	U
Sensibilidade relativa	11.8%	11.8%
(I.C.95%)	(2.1-37.7)	(2.1-37.7)
Especificidade relativa	78.1%	78.1%
(I.C.95%)	(71.3-83.8)	(71.3-83.8)
Valor Preditivo positivo	4.8%	4.8%
(I.C.95%)	(0.8-17.4)	(0.8-17.4)
Valor Preditivo negativo	90.5%	90.5%
(I.C.95%)	(84.6-94.4)	(84.6-94.4)

FIGURA 24: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de suínos. As barras representam intervalo de confiança de 95%.

5.3.2.2. CÃES E GATOS NÃO DOMICILIADOS

5.3.2.2.1. CÃES

Os resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de cães estão presentes na tabela 23.

A tabela 24 apresenta os índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para cães.

A proporção de soros reagentes na HI em relação ao ELISA estão presentes na figura 25, juntamente com os intervalos de confiança de cada medida.

TABELA 23: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros caninos.

		Hemaglutinação Indireta		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	52	49	101
	Negativos	24	75	99
	Total	76	124	200

TABELA 24: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para cães.

HI	IR	U
Sensibilidade relativa	51.5%	51.5%
(I.C.95%)	(41.4-61.5)	(41.4-61.5)
Especificidade relativa	75.8%	75.8%
(I.C.95%)	65.9-83.6)	65.9-83.6)
Valor Preditivo positivo	68.4%	68.4%
(I.C.95%)	(56.6-78.3)	(56.6-78.3)
Valor Preditivo negativo	60.5%	60.5%
(I.C.95%)	(51.3-69.0)	(51.3-69.0)

FIGURA 25: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de cães. As barras representam intervalo de confiança de 95%.

5.3.2.2.2. GATOS

Os resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros de felinos estão presentes na tabela 25.

A tabela 26 apresenta os índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para felinos.

A proporção de soros reagentes na HI em relação ao ELISA estão presentes na figura 26, juntamente com os intervalos de confiança de cada medida.

TABELA 25: Resultados dos testes de hemaglutinação indireta para detecção de IgG anti-*T.gondii* em soros felinos.

		Hemaglutinação Indireta		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	16	24	40
	Negativos	01	59	60
	Total	17	83	100

TABELA 26: Índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da hemaglutinação indireta, em relação, ao ELISA analisado pelo IR e por U para felinos.

HI	IR	U
Sensibilidade relativa	40.0%	40.0%
(I.C.95%)	(25.3-56.6)	(25.3-56.6)
Especificidade relativa	98.3%	98.3%
(I.C.95%)	(89.9-99.9)	(89.9-99.9)
Valor Preditivo positivo	94.1%	94.1%
(I.C.95%)	(69.2-99.7)	(69.2-99.7)
Valor Preditivo negativo	71.1%	71.1%
(I.C.95%)	(59.9-80.3)	(59.9-80.3)

FIGURA 26: Proporção de soros reagentes no ELISA e HI para amostras de gatos. As barras representam intervalo de confiança de 95%.

No anexo 1, encontram-se as imagens digitais das placas da HI para todas as amostras estudadas.

5.3.3. WESTERN BLOTTING

Todos os soros positivos no ELISA foram submetidos ao Western blotting, como descrito em materiais e métodos, sendo a intensidade das bandas proporcional ao título de anticorpos IgG. Soros com baixo título de anticorpos apresentaram bandas de baixa intensidade. Os resultados dos WB encontram-se no anexo 2.

Na figura 27 estão representados os resultados obtidos para as diferentes espécies, a fim de facilitar a interpretação geral dos mesmos.

FIGURA 27: Prevalência de anticorpos anti-*T.gondii*, detectados pelo ELISA e confirmados por western blotting, para as diferentes espécies estudadas.

5.4. INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM FRANGOS DE CORTE

Os animais não apresentaram nenhuma sintomatologia no decorrer do período de experimentação, sendo encontrado apenas infiltrados de células inflamatórias nos fragmentos de musculaturas lisa, esquelética e cardíaca, cérebro e fígado submetidos à coloração de hematoxilina-eosina (anexo 3).

A figura 28 mostra os níveis de anticorpos obtidos pelos animais durante infecção experimental.

5.5. ISOLAMENTO DO AGENTE

5.5.1. DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *T.gondii* em fezes de gato

Não foram encontrados oocistos de *T.gondii* nas amostras fecais submetidos à coloração de Kinyoun ou método de Sheather modificado.

Com relação ao bioensaio, não foram detectados anticorpos anti-*T.gondii* em camundongos desafiados com as amostras fecais. Todos os animais da prova biológica permaneceram vivos durante o período de estudo, e nenhum cisto de *T.gondii* foi encontrado no cérebro dos mesmos.

FIGURA 28: Resultados da infecção experimental de galinhas com a cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

5.5.2. DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *T.gondii* em água potável

Não foram detectados anticorpos anti-*T.gondii* e cistos cerebrais nos camundongos da prova biológica, desafiados com o material da membrana de filtração da amostra de água suspeita.

6. DISCUSSÃO

Nossos dados mostram que a infecção por *T.gondii* não foi homogênea entre as diferentes espécies estudadas, mas que todas as espécies apresentaram uma prevalência associada à longevidade e exposição ambiental.

A determinação da infecção pelo *T.gondii* é complexa, podendo ser feita por pesquisa parasitológica que apresenta algumas limitações como baixa sensibilidade, demanda de tempo para realização de infecções experimentais, além da necessidade de observador treinado. Por outro lado, a pesquisa de anticorpos séricos é extremamente eficiente principalmente pela praticidade e rapidez quando comparada aos ensaios biológicos (VENKATESAN & WAKELIN, 1993). Em nosso estudo, mostramos que a pesquisa de anticorpos específicos para *T.gondii* depende de inúmeros fatores, como a preparação do antígeno, linhagem de *T.gondii* utilizada, condições de reação, padronização do ensaio, além da qualidade dos reagentes secundários o que permitiu uma maior confiabilidade dos resultados, baseada na sua alta reprodutibilidade intra e inter testes.

Em nossos ensaios, a reação de hemaglutinação indireta mostrou baixa sensibilidade e especificidade quando comparada com os resultados do ELISA que foi considerado o teste de referência. Este fato pode ser atribuído a várias causas como problemas com a origem e confecção do reagente, além da possibilidade de reações cruzadas com anticorpos contra grupos sanguíneos (STORMONT, 1982; SHAN et al, 1998), já que o reagente é produzido com hemácias de aves, e geralmente padronizado apenas para uso em diagnóstico humano.

Os testes imunoenzimáticos apresentam inúmeras vantagens como alta sensibilidade e especificidade, além de identificação específica do antígeno como é o caso do western blotting. Além disso, variações intertestes podem ser corrigidas tanto pela utilização de um soro limiar, especialmente construído, ou pelo uso de padrões que permitam a quantificação de Unidades (U) de

anticorpos específicos, ambos utilizados com eficiência em nossos ensaios. A utilização de um soro limiar como “cut-off”, adequadamente padronizado, otimiza a reação permitindo que um número maior de amostras sejam testadas numa mesma placa, tornando assim, o teste menos oneroso e portanto, mais acessível aos laboratórios e aos trabalhos de campo.

Uma outra consequência da reação de ELISA é que pela sua quantificação e forma de ensaio, permite a identificação da avidez de anticorpos, que é proporcional ao tempo de infecção do animal em até 8-12 meses do início da mesma. Isso permite abordar com um único teste vários fatores da infecção, melhorando a eficiência da detecção da incidência em cada espécie, bem como, a velocidade com que a transmissão do agente está ocorrendo num determinado grupo. Este dado, originalmente descrito em humanos (CAMARGO et al, 1991; BERTOZZI et al, 1999), foi por nós utilizado com sucesso em porcos, experimentalmente infectados, mostrando a confiabilidade desta abordagem (SUARÉZ-ARANDA et al, 2000).

Uma vez que a confiabilidade do ELISA em IR e U foi alta e condizente com os resultados do western blotting, utilizamos estas medidas para definição da taxa de infecção nas diferentes espécies, sendo que as prevalências sorológicas isoladas serão discutidas a seguir.

Com relação à espécie felina, foram detectados, em nosso estudo, níveis significantes de anticorpos em 40% das 100 amostras testadas pelo ELISA e confirmadas pelo western blotting, sendo estes dados similares a outros trabalhos citados na literatura mundial. UGGLA et al (1990), na Suécia, encontraram 42% (102/244) de reagentes no ELISA. SUMMER & ACKLAND (1999), na Austrália, detectaram 39% de animais positivos utilizando ELISA. SAMAD et al (1997), em Bangladesh, mostraram 33.33% (8/24) de reagentes no teste de aglutinação em látex. SVOBODOVÁ et al (1998), na Tchécoslováquia, encontraram 61,3% (219/357) de gatos positivos no ELISA. Por outro lado, NOGAMI et al (1998), no Japão, encontraram uma prevalência de 6% (48/800) em gatos domiciliados utilizando o teste de aglutinação em látex. No Brasil, nossos dados foram similar à prevalência descrita por SOGORB et al (1972), em São Paulo, que encontrou 45% de gatos positivos utilizando a reação de Sabin-Feldman, e também, a descrita em São Paulo por

SANTOS et al (1983) que mostraram uma prevalência de 59% em gatos domésticos utilizando a reação de hemaglutinação indireta. Entretanto, LUCAS et al (1999) encontraram uma prevalência de 17,7% em gatos atendidos no serviço do ambulatório do hospital veterinário da USP, utilizando a reação de imunofluorescência indireta e, segundo os autores, a prevalência foi baixa devido ao fato dos animais não terem acesso às ruas e receberem apenas ração comercial o que diminui o risco de exposição e infecção. Esta explanação foi também sugerida por TENTER et al (1994), na Alemanha, que obtiveram, no ELISA, taxas de infecção variando em torno de 32% para gatos sem acesso às ruas até 55% para animais que tinham acesso às ruas. Outro fator a ser considerado é que as rações comerciais são geralmente processadas a temperaturas que inviabilizam os cistos de *T.gondii*.

A análise da avidéz de anticorpos IgG mostrou que 20% (8/40) dos gatos positivos apresentaram baixa avidéz de anticorpos, indicando que estes animais infectaram-se recentemente, e que por isso podem estar eliminando oocistos de *T.gondii* nas fezes, já que estes são excretados durante as fases iniciais da infecção (DUBEY, 1993). Estas formas são extremamente resistentes à destruição por agentes químicos e apresentam alta capacidade de resistência a variações térmicas, especialmente ao frio, não sendo abolida a sua infectividade nem por períodos prolongados de conservação a -10° C (DUBEY, 1998). Evidentemente, dentre os animais estudados, os gatos são os principais elementos na rede causal da toxoplasmose, pois são responsáveis pela eliminação do oocistos que são uma das principais fontes de infecção da toxoplasmose humana, como demonstrado em grupo estritos de vegetarianos que apresentaram a doença, sem possibilidade de ingestão de cistos teciduais (RAWAL, 1959) e pela ausência desta em locais livres de felídeos (WALLACE, 1969).

No tocante a espécie canina, anticorpos IgG anti-*T.gondii* foram detectados em 50,5% (101/200) das amostras testadas no ELISA. Esta prevalência foi consideravelmente, maior que a descrita por UGGLA et al (1990), na Suécia, que encontrou 23% de animais positivos no ELISA. No Brasil, em Minas Gerais, SILVA et al (1997) encontraram 35% de positivos no

ELISA e SALATA et al (1985), na cidade de Botucatu, São Paulo, encontraram 63.8% de soropositivos utilizando a reação de imunofluorescência indireta.

A prevalência de cães infectados foi alta, refletindo o alto nível de transmissão do agente na área estudada, especialmente quando comparado o tempo de vida destes animais com o do homem. A análise da avidéz de IgG mostrou que aproximadamente 20 % (20/101) dos cães positivos apresentaram baixa avidéz de anticorpos que indica infecção recente confirmando a disseminação ambiental do parasita. Estes dados sugerem que a avidéz de anticorpos IgG dos cães poderia servir como uma alternativa para estimação da contaminação ambiental por *T.gondii* em estudos epidemiológicos, já que o cão não domiciliado é exposto a todas as formas de transmissão do parasita, tanto pela ingestão de restos de comida, ou pelo acesso à água não tratada e exposta à excreta de gatos. Além disso, o hábito de espojar-se no solo permite o contato e infecção do animal com oocistos eliminados por gatos durante a primo-infecção.

Embora os dados de idade dos cães estivessem disponíveis para o estudo, não houve correlação entre a faixa etária dos animais e a freqüência de anticorpos de baixa avidéz, já que animais velhos apresentaram baixa avidéz indicando infecção recente o que sugere exposição constante ao agente independentemente da faixa etária analisada.

Nos animais cuja carne é destinada ao consumo humano, houve uma menor prevalência sorológica da toxoplasmose, provavelmente devido ao aprimoramento e intensificação das criações que visam o máximo de produtividade num tempo curto com o uso freqüente de rações secas ou tratadas termicamente diminuindo portanto, o risco de infecção animal.

A taxa de 0% infecção (0 - 1.60% - 95% intervalo de confiança) nos frangos de corte não era esperada, já que dados de literatura mostram prevalências de 39.5% na Índia (DEVADA et al,1998) utilizando testes de aglutinação modificada e 47.2% no Egito (EL-MASSRY et al, 2000). A ausência de infecção nas amostras estudadas pode ter ocorrido devido ao manejo intensificado das criações de frangos de corte que visam o abate dos animais

com aproximadamente 45 dias de vida. Contudo, não podemos eliminar o fato de que animais de postura e também aqueles mantidos em criação não intensiva possam apresentar infecção por *T.gondii* e assim, representarem uma fonte de transmissão ao homem, visto que o agente já foi isolado de ovos de animais infectados (BIANCIFIORI et al, 1986).

O estudo em aves é extremamente importante, pois freqüentemente, a carne de frango não é citada como fonte de infecção humana (COOK et al, 2000), embora, alguns estudos já tenham comprovado a presença de cistos de *T.gondii* nas musculaturas esquelética e cardíaca de animais infectados experimentalmente (KANETO et al, 1997).

Em nosso estudo, a prevalência sorológica de 8,5%, encontrada para a espécie suína, foi idêntica à descrita por GAJADHAR et al (1998), no Canadá, ao analisarem 2.800 amostras pelo teste de aglutinação em látex. Contudo, esta taxa foi inferior à descrita por outros autores. DUBEY et al (1991) encontraram 23.9% (2.830/11.842) de reagentes no teste de aglutinação modificada (MAT) em suínos abatidos nos Estados Unidos. GAMBLE et al (1999), encontraram uma taxa de infecção de 47.4% utilizando o teste de aglutinação modificado em amostras de animais da região da Nova Inglaterra nos Estados Unidos. SUARÉZ-ARANDA et al (2000) encontraram uma prevalência de 32,3% em amostras de animais peruanos utilizando ELISA. No Brasil, D'ANGELINO & ISHIZUKA (1986) encontraram uma taxa de infecção superior a 40% utilizando reação de imunofluorescência indireta. De um modo geral, as taxas de infecção suína variam de acordo com o tipo de manejo e tempo de exposição ambiental dos animais como foi demonstrado por DUBEY (1990) nos Estados Unidos e van KNAPEN et al (1995) na Holanda.

As fontes de infecção para o suíno são geralmente ambientais, mas também podem ocorrer devido ao uso de restos de matadouros ou restaurantes na alimentação dos animais, prática habitual em pequenas criações (SUARÉZ-ARANDA et al, 2000). Como o suíno é mantido geralmente estabulado, raramente tem acesso às pastagens, mas é mantido próximo das habitações rurais, onde gatos podem estar presentes, facilitando a infecção por

oocistos. No caso de manejo intensivo, tanto a água, o ambiente e as rações utilizadas são menos propícios para a transmissão da infecção.

Outro aspecto importante a ser ressaltado, é que os suínos são responsáveis, também, pela transmissão da teníase, outra importante parasitose humana, o que reforça a necessidade de um controle rigoroso das criações tanto em nível zootécnico como sanitário (ACHA & SZYFRES, 1986).

Nos ruminantes, nossos achados mostraram uma prevalência progressivamente crescente em bovinos, caprinos e ovinos. Quanto aos bovinos, a prevalência de 11%, encontrada neste estudo, foi similar às prevalências descritas por COSTA & COSTA (1978) e PASSOS et al (1984) no Estado de Minas Gerais e por FERRARONI et al (1980) na região da Amazônia. Em Poços de Caldas, *T.gondii* foi detectado em 12% de 350 amostras analisadas, através da reação de imunofluorescência indireta, por COSTA & COSTA (1978) e, em Belo Horizonte, PASSOS et al (1984) mostraram que 9% de 991 amostras foram positivas na reação de imunofluorescência indireta. Nossos dados foram semelhantes também, aos descritos em outros países. Na Holanda, *T. gondii* foi descrito em 13.1% de 6.123 amostras analisadas por ELISA (van KNAPEN et al, 1995). Na Indonésia, 9% de 200 amostras foram positivas no teste de aglutinação em látex (MATSUO & HUSIN, 1996) e no sul do Vietnã, 10.5% de 200 amostras foram reagentes ao teste de aglutinação em látex (HUONG et al, 1998). Entretanto, a nossa prevalência foi consideravelmente menor que a de 91,8% descrita por AVEZZA et al, (1993) na Lombardia, Itália. Por outro lado, a prevalência encontrada neste trabalho, foi maior que a citada por GONDIM et al (1999) na Bahia que encontraram 1,03% (2/194) de positivos no teste de aglutinação em látex. O consumo freqüente de carne bovina crua ou mal cozida, normalmente relacionado a hábitos culturais, reforça a necessidade de controle da toxoplasmose nestes animais.

Os ovinos, geralmente implicados como fonte de infecção da toxoplasmose humana (SMITH, 1993; BONAMETTI et al, 1996; COOK et al ,2000) apresentaram em nosso trabalho, prevalência sorológica semelhante às descritas em outros locais. Na Holanda, 30% de 115 amostras foram positivas

no ELISA (van KNAPEN, 1982). Na Espanha, 33,72% de 2.306 amostras foram reagentes na reação de imunofluorescência indireta (MARCA et al, 1996). No Uruguai, FREYRE et al (1997), utilizando o teste de aglutinação direta, encontraram uma taxa inicial de 28,7% soropositivos, entre 1.613 ovelhas estudadas, que elevou-se para 38,5% após 2,5 anos. Por outro lado, a prevalência encontrada neste trabalho, foi menor que a de 39% (39/100) descrita por LARSSON et al (1980) em Uruguiana, Rio Grande do Sul, através do teste de Sabin-Feldman. Contudo, nossa prevalência foi maior que a descrita por GONDIM et al (1999), na Bahia, SILVA (1999) em Botucatu e por HASHEMI-FESHARKI (1996), no Irã. Na Bahia, 18,75% de 240 amostras foram positivas no teste de aglutinação em látex. Em Botucatu, 7,7% (40/522) foram positivas na IFI, e no Irã, 24,50% de 3.311 amostras foram positivas no teste de aglutinação em látex. Cabe ressaltar que no Brasil, a ovinocultura é uma prática voltada, sobretudo, para a produção de carne, o que implica em menor longevidade dos animais, quando comparada à dos animais lanígeros.

Com relação à espécie caprina, nossos resultados foram semelhantes aos relatados por DUBEY (1987) na Noruega e por HASHEMI-FESHARKI (1996) no Irã. Na Noruega, 17% de 212 amostras foram positivas no teste de Sabin-Feldman e no Irã, 19,25% de 638 amostras foram reagentes no teste de aglutinação em látex. Por outro lado, a prevalência encontrada neste estudo, foi menor que às prevalências descritas, no Brasil, por CHIARI et al (1987) em Minas Gerais e GONDIM et al (1999) na Bahia. Em Minas Gerais, 37% de 372 amostras foram positivas na reação de imunofluorescência indireta e na Bahia, 28,93% de 439 amostras foram reagentes ao teste de aglutinação em látex. Nossa prevalência também foi menor que a de 47,5% (76/160) encontrada por MATSUO & HUSIN (1996) na Indonésia, através do teste de aglutinação em látex.

Todas as amostras bovinas e ovinas apresentaram alta avidéz de anticorpos indicando que nestas espécies a infecção é precoce ou seja, ocorre quando os animais são jovens. Por outro lado, a análise da avidéz de anticorpos dos caprinos mostrou que 8,82% (3/34) das amostras foram de baixa avidéz, o que nos leva a concluir que estes animais infectaram-se próximo ao abate. Desta forma, podemos sugerir que em espécies criadas em

manejo extensivo como é o caso da bovina e ovina, a infecção ocorre no período em que os animais são jovens, provavelmente porque coincide com a época das águas que facilita a disseminação dos oocistos nas pastagens. Já em espécies de manejo semi-intensivo, como é o caso da caprina, a taxa de infecção é menor porém, a transmissão do agente é constante.

A análise da avidéz de anticorpos para a espécie suína mostrou que 94% (16/17) das amostras foram de baixa avidéz indicando que estes animais se infectaram próximo ao abate. Isto pode ser atribuído ao fato de que animais em fase final de engorda, podem ser suplementados com restos de matadouro que poderiam estar contaminados por cistos de *T.gondii* o que explicaria a ocorrência da infecção próximo ao sacrifício.

As prevalências sorológicas obtidas para cães e gatos não domiciliados foram superiores às prevalências dos animais de produção. Isto pode ser atribuído ao fato de que os animais não domiciliados estão expostos a todas as formas de infecção do *T.gondii*, enquanto que os animais de produção estariam expostos somente à água, pastagem e ração contaminados por oocistos de *T.gondii*.

A prevalência sorológica para os cães foi consideravelmente maior que a dos gatos devido, sobretudo, ao hábito alimentar destes animais que diferentemente dos felinos, são mais expostos à infecção, já que podem adquirir a doença através da ingestão não só de presas infectadas, mas, também, água e restos de comida contaminados tanto com oocistos como cistos de *T.gondii*. O tipo de exposição ambiental maior do cão não domiciliar pode representar o máximo de transmissão da infecção por *T.gondii*, pois, embora possa ser sugerido que os gatos freqüentem o mesmo tipo de ambiente, estes são muito mais seletivos e de maior mobilidade para escolha do alimento, sempre de menor volume que o ingerido pelo cão. Outro fator seria o consumo de água que é bem maior para os cães aumentando assim, o grau de exposição desta espécie em relação à felina.

Com relação aos animais de produção, a taxa de infecção dos ruminantes (bovino, caprino e ovino) foi maior que a dos suínos e frangos de

corte provavelmente, devido ao tipo de criação. O manejo altamente intensificado das granjas de suínos e de frangos de corte diminui os riscos de exposição e infecção dos animais. Contudo, a prevalência dos suínos foi maior que a dos frangos de corte, e isto pode ser atribuído ao fato de que em algumas criações, como é o caso da do presente estudo, os animais em final de engorda podem ser suplementados com restos de matadouros que podem estar contaminados com cistos de *T.gondii*, o que explicaria uma maior taxa de infecção nas granjas de suínos quando comparada a de frangos de corte.

As diferenças nas taxas de infecção dos ruminantes podem ser atribuídas ao sistema de criação, pois os ovinos e bovinos por serem criados em manejo extensivo estariam mais expostos à pastagem e a água contaminadas por oocistos de *T.gondii* que os caprinos, criados em sistema semi-intensivo, onde os cuidados com a qualidade da água e alimento são maiores.

As diferenças nas prevalências obtidas para os ovinos e bovinos, ambos de criação extensiva, poderiam ser atribuídas ao hábito alimentar. Como os ovinos apresentam uma preferência por pastagens mais baixas, estes animais estariam mais expostos à infecção, uma vez que os oocistos ficam aderidos à vegetação rente ao solo. Um outro fator a ser considerado é o volume do aparelho digestivo, pois para penetrarem nas células entéricas, os esporozoítos precisam percorrer uma distância maior, no caso dos bovinos adultos, o que acabaria por inviabilizá-los, explicando a menor taxa de infecção para esta espécie quando comparada à ovina e à infecção em animais jovens.

A ausência de oocistos de *T.gondii* nos materiais fecais submetidos à coloração de Kinyoun e método de Sheather modificado, bem como, a ausência de soro-conversão dos camundongos da prova biológica, pode ser atribuídas ao fato de que gatos adultos soropositivos não estejam eliminando oocistos pelas fezes, embora, já, o tenham feito na fase aguda da doença (DUBEY, 1996), principalmente porque a maioria 90% (9/10) das amostras examinadas foram obtidas de animais com alta avidéz de anticorpos indicando infecção tardia.

A ausência de soro-conversão e cistos cerebrais nos camundongos inoculados com a membrana em que a água foi filtrada, pode ser explicada pelo fato de que a amostra analisada foi coletada um mês após a ocorrência do surto da doença. ISAAC-RENTON et al (1998) utilizaram o mesmo método para detecção de oocistos de *T.gondii* durante um surto da doença em humanos no oeste do Canadá, com resultados semelhantes, atribuindo o insucesso à época da coleta que deve ser feita no início do surto. Pela história natural da toxoplasmose, este tipo de pesquisa tem uso limitado e deve ser feito regularmente para um possível sucesso, independentemente da ocorrência de surtos da doença humana.

Muita discussão tem sido feita em relação à importância da carne na transmissão da toxoplasmose (COOK et al, 2000). Procuramos dados de consumo específico dos diferentes tipos de carne pelos brasileiros que apresentam uma alta incidência de toxoplasmose (GUIMARÃES et al, 1993), mas não conseguimos encontrar dados fidedignos recentes. Imaginamos que pelos hábitos culturais do Sul e Sudeste do Brasil, a carne de frango é a mais consumida, seguida pela carne bovina, suína, e, com uma participação menor, a ovina e a caprina. Assim, acreditamos que o maior fator de infecção não está relacionada à ingestão de carnes contendo cistos, mas sim a oocistos, mais implicados também em surtos epidêmicos (BOWIE et al, 1997). Outro aspecto significativo é a alta taxa de infecção na infância até os 10 anos de idade, quando os hábitos de higiene estão menos consolidados, facilitando esta via de transmissão. Evidentemente o hábito do churrasco, muito freqüente em nosso meio, pode facilitar a ingestão de carnes cruas ou mal cozidas, fato relacionado a algumas microepidemias (KEAN et al, 1969). O sistema de tratamento de água usado em nosso meio é a decantação seriada seguida de cloração, o que não afeta os oocistos, pelo que esta fonte de infecção não pode ser descartada tanto para a doença animal como humana.

Ressaltamos que medidas profiláticas simples em manejo intensivo, como o bloqueio do acesso de felinos, uso exclusivo de rações e a filtração de água poderiam facilmente eliminar a infecção por *T.gondii*, como foi demonstrado em frangos de corte.

Extrapolações de prevalência ou incidência da toxoplasmose e suas fontes de infecção em um único estudo transversal devem ser cautelosamente avaliadas, mas isso não interfere no valor da medida, principalmente quando existe uma carência enorme de estudos na área, que deveriam ser de responsabilidade de órgãos específicos governamentais de controle de alimentos, sendo que nosso estudo fornece dados transversais com o desenvolvimento de tecnologias que permitirão os estudos seqüenciais necessários para o controle desta importante protozoose humana.

7. CONCLUSÕES

7.1. GERAIS

7.1.1. Foi possível padronizar ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em felinos, cães, bovinos, ovinos, caprinos, suínos e frangos de corte, com alta reprodutibilidade intra e interteste, além de confirmação por western blotting, o que permitiu determinar a avides dos anticorpos com estimativa grosseira da época de infecção.

7.1.2. A prevalência da toxoplasmose animal foi determinada sendo crescente em suínos (8.5%), bovinos (11%), caprinos (17%), ovinos (31%), felinos (40%) e cães (50,5%), não sendo encontrada em frangos de corte.

7.2. ESPECÍFICAS

7.2.1. Em suínos, a prevalência de 8.5% foi acompanhada de 94% de anticorpos de baixa avides, sugerindo infecção recente.

7.2.2. Em bovinos (11%) e ovinos (31%) não foram encontrados anticorpos de baixa avides, sugerindo infecção precoce ou sazonal na vida do animal.

7.2.3. Em caprinos (17%) foi encontrada uma porcentagem baixa de soros de baixa avides (8,82%), sugerindo que nesses animais, a transmissão da infecção é constante durante a vida do animal.

7.2.4. Em cães (50,5%) foi encontrada alta prevalência e uma frequência significativa (20%) de anticorpos de baixa avides, sugerindo que nesses animais, a transmissão da infecção é intensa e constante durante sua vida, representando um bom indicador da contaminação ambiental pelo *T.gondii*

- 7.2.5. Em felinos (40%), foi encontrada proporção significativa de anticorpos de baixa avidéz (20%), embora sem comprovação da excreção de oocistos em pequena parte da amostragem. Pela alta taxa de infecção recente, é possível prever uma fração significativa de animais excretando oocistos.
- 7.2.6. A avaliação da presença de anticorpos anti-*T.gondii* deve ser criteriosa, sendo que os reagentes de hemaglutinação para uso humano fornecem resultados erráticos nesta medida.
- 7.2.7. A pesquisa de oocistos na água é de baixa sensibilidade, devendo ser feita em materiais colhidos no período de suspeita da transmissão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ACHA, P. N., SZYFRES, B. Toxoplasmosis. In: **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. Washington, Organizacion Panamericana de la Salud., 1986, p. 646-58.

AHLFORS, K., BORJESON, M., HULDT, G., FORSBERG, E. Incidence of Toxoplasmosis in pregnant women in the city of Malmo, Sveden, Scand. **J. Infect. Dis.**, **21**: 315-21, 1989.

AMATO NETO, V., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4.ed. São Paulo, Sarvier, 1995,154p.

AMATO NETO, V., NAGASSE, T. K., MOREIRA, A. A. B., GOMES, A. E. C.; CAMPOS, R. Utilização, em politransfundidos, da pesquisa de anticorpos IgM anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Toxoplasma gondii* para detectar infecções pós transfusionais recentes. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **26** (2): 83-6, 1984.

AMENDOEIRA, M. R. R., LOPES, P. F. A. Isolamento de Toxoplasma em solo de horta. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 5, Rio de Janeiro, 1980 Apud: AZEVEDO, D. S., JAMRA, L. M. F., RIBEIRO, M. F. Isolamento de oocistos de *Toxoplasma gondii* em dois bairros de Recife - PE. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **25** (1):31-36.

AOUIZERATE, F., CAZENAVE, J., POIRIER, L., VERIN, P. H., CHEYROU, A., BEGUERET, J., LAGOUTTE, F. Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor by the polymerase chain reaction. **Br. L. Ophthalmol.**, **77**: 107-9, 1993.

* De acordo com:

Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses / [elaborado pelo] Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1987.

- ARAÚJO, F. G., REMINGTON, J.S. Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, **141**(2): 144-50, 1980.
- ARAÚJO, F.G. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **12** (2):105-11, 1970.
- AVEZZA, F., GREPPI, G., AGOSTI, M.; BELLOLI, A., FAVERZANI, S. Bovine toxoplasmosis. Results of a serological investigation (Lombardy). **Atti-della-Societa-italiana-di-Buiatria**, **25**: 621-624, 1993.
- AZEVEDO, D. S., HYAKUTAKE, S., SCHLODTMAN, A. G. Prevalência de infecção toxoplásmica em doadores de sangue de Recife, PE. In: CONGRESSO. SOCIEDADE BRASILEIRA MEDICINA TROPICAL E III CONGRESSO SOCIEDADE PARASITOLOGIA,19, João Pessoa, PB, 1978. Apud: AZEVEDO, D. S., JAMRA, L. M. F., RIBEIRO, M. F. Isolamento do oocistos de *Toxoplasma gondii* em dois bairros de Recife, PE. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **25** (1): 31-36, 1983.
- AZEVEDO, D. S., JAMRA, L. M. F., RIBEIRO, M. F. Isolamento de oocistos de *Toxoplasma gondii* em dois bairros de Recife (PE). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **25** (1): 31-36, 1983.
- BARUZZI, R. G. Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology. Serologic survey among the indians of the Upper Xingu River, Central Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **12** (2): 93-104, 1970.
- BEAMAN, M. H., LUFT, B. J., REMINGTON, J. S. Prophylaxis for toxoplasmosis in AIDS. **Ann. Intern. Med.**, **117**(2): 163-4, 1992.
- BERTOZZI, L. C., SUZUKI, L. A., ROSSI, C. L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **41**(3): 175-177, 1999.

- BEVERLY, J. K. A., HENRY, L., HUNTER, O., BROWN, M. E. Experimental toxoplasmosis in calves. **Res. Vet.**, **23**: 33-37, 1977.
- BIANCIFIORI, F., RONDINI, C., GRELLONI, V., FRESCURA, T. Avian toxoplasmosis: experimental infection of chicken and pigeon, **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, **9**(4): 337-46, 1986.
- BLEWETT, D. A., WATSON, W. A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. II. Possible sources of infection in outbreaks of clinical disease. **Br. Vet. J.**, **139**: 546-55, 1983.
- BLEWETT, D. A., WATSON, W. A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis III. Observations of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. **Br. Vet. J.**, **140**: 54-63, 1984.
- BONAMETTI, A. M., PASSOS, J. N., DA SILVA, E. M., BORTOLIERO, A. L. Outbreak of acute toxoplasmosis transmitted thru the ingestion of ovine raw meat. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30** (1): 21-5, 1996.
- BOWIE, W. R., KING, A. S., WERKER, D. H., ISAAC-RENTON, J. L., BELL, A., ENG, S. B., MARION, S. A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. **Lancet**, **350**(9072):173-7, 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**:248, 1976.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA/CENEPI. **Boletim Epidemiológico. Brasília, Centro Nacional de Epidemiologia**, **8**:31, 1996.
- BRESCIANI, K. D., COSTA, A. J., TONIOLO, G. H., SABATINI, G. A., MORAES, F. R., PAULOLLO, A. C., FERRAUDO, A. S. Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. **Vet. Parasitol.**, **86**(2):143-5, 1999.

- BROOKS, R.G., SHARMA, S. D., REMINGTON, J. S. Detection of *Toxoplasma gondii* antigens by a dot-immunobinding technique. **J. Clin. Microbiol.**, **21**(1): 113-6, 1985.
- BROWN, C., McLEOD, R. Class I MHC genes and CD8⁺ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. **J. Immunol.**, **145** (10): 3438-3441, 1990.
- BROWN, C., McLEOD, R. Mechanisms of survival of mice during acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection. **Parasitol. Today**, **10** (8): 290-292, 1994.
- BULOW, R., BOOTHROYD, J. C. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigens in liposomes. **J. Immunol.**, **147**: 3496-3500, 1991.
- BUXTON, D. Ovine toxoplasmosis: A review. **J. Royal Soc. Med.**, **83**: 509-11, 1990.
- BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp) in sheep and goats: Recent advances. **Vet. Res.**, **29**: 289-310, 1998.
- BUXTON, D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitol. Today**, **9**(9):335-337, 1993.
- BUXTON, D., THOMSON, K., MALEY, S., WRIGHT, S., BOS, H. J. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. **Vet. Rec.**, **129**(5):89-93, 1991.
- CAMARGO, M. E., LESER, P. G. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II Evolutive study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, **18**(4):227-38, 1976b.

- CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. In: FERREIRA, A. W., ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto imunes**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. p. 165-74.
- CAMARGO, M. E., FERREIRA, A. W., MINEO, J. R., TAKIGUTI, C. K., NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infect. Immu.**, **21**(1): 55-8, 1978a.
- CAMARGO, M. E., FERREIRA, A. W., MINEO, J. R., TAKIGUTI, C. K., NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infect. Immun.** **21**(1): 55-8, 1978a.
- CAMARGO, M. E., FERREIRA, A. W., ROCCA, A., BELÉM, Z. R. Um teste prático para a sorologia da toxoplasmose: o teste de hemaglutinação. Estudo comparativo com os testes de imunofluorescência e imunoenzimático de captura de IgM. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, **22**(6): 196-201, 1986.
- CAMARGO, M. E., LESER, P. G., GUARNIERI, D. B., ROCCA, A. Padronização de testes sorológicos para a toxoplasmose, problema urgente da patologia clínica. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, **13**:1-5, 1977a.
- CAMARGO, M. E., LESER, P. G., LESER, W. S. P. Definições de perfis sorológicos na toxoplasmose. Importância diagnóstica e epidemiológica. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, **13**: 113-27, 1977b.
- CAMARGO, M. E., LESER, P. G., LESER, W. S. P. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis: I – A comparative study of hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests in 3,752 serum samples. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **18**(1):215-26, 1976a.
- CAMARGO, M. E., LESER, P. G., ROCCA, A. Detection of IgM anti-Toxoplasma antibodies in acute acquired and congenital toxoplasmosis after protein A treatment of serum. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **25**(5): 201-6, 1983.

- CAMARGO, M. E., LESER, P. G., ROCCA, A. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis: III – Hemagglutination titers paradoxical decrease in acute infections. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **20**(1): 41-4, 1978b.
- CAMARGO, M. E., LESER, P. G., ROCCA, A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-Toxoplasma fluorescent tests. A technique for specific results. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **14**: 310-3, 1972.
- CAMARGO, M. E., MOURA, M. G. E., LESER, P. G. Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **31**(4): 279-85, 1989b.
- CAMARGO, M. E., SILVA, S. M., LESER, P. G., GRANATO C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **33** (3): 213-218, 1991.
- CAMARGO, M.E. Diagnóstico de laboratório da toxoplasmose humana. **Rev. Bras. Anál. Clín.**, **21**(1):3-11, 1989a.
- CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au "*Toxoplasma cuniculi*". **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, **4**:518-9, 1911.
- CARMONA, M. D. Toxoplasmosis: parasitologia, epidemiologia, clínica, diagnóstico, tratamento. **Rev. Iber. Parasitol.**, **20**: 519-66, 1960.
- CHANG, G. N. Epidemiology of swine toxoplasmosis in Taiwan. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, **22**: 111-4, 1991.
- CHHABRA, M. B., BHARDWAY, R. M., GAUTAM, O. P., GUPTA, R. P. Toxoplasma infection and abortion in dairy goats. **Trop. Anim. Health Prod.**, **13** (4):222-6, 1981.
- CHIARI, C. A., LIMA, J. D., ANTUNES, C. M. F. Soro-epidemiologia da toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, **39**:587-609, 1987.

- COLE, C. R., SANGER, V. L., FARRELL, R. L., KORNDER, J. D. The present status of toxoplasmosis in veterinary medicine. **North Am. Vet.**, **35**:265-270, 1954.
- COOK, A. J., GILBERT, R. E., BUFFOLANO, W., ZUFFEREY, J., PETERSEN, E., JENUM FOULON, W., SEMPRINI, A. E., DUNN, D. T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: Europe multicentre case-control study. European research network congenital toxoplasmosis. **BMJ**. **321** (7254):142-147, 2000.
- COSTA, A. J., COSTA, E. P. Frequência de bovinos reagentes à imunofluorescência indireta para *Toxoplasma gondii* em Poços de Caldas, M.G., Brasil. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, **30**: 47-51, 1978.
- COUTINHO, S. G., SOUZA, W. J. S., CAMILLO-COURA, L., MARZOCHI, M. C. A., AMENDOEIRA, M. R. R. Levantamento dos resultados das reações de Imunofluorescência Indireta para toxoplasmose em 6079 pacientes de ambulatório ou gestantes no Rio de Janeiro realizadas durante os anos de 1971 a 1977. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **23** (2): 48-56, 1981.
- CRISTINA, N., OURY, B., AMBROISE-THOMAS, P., SANTORO, F. Restriction fragment length polymorphism among *Toxoplasma gondii* strains. **Parasitol. Res.**, **77**: 266-268, 1991.
- D'ANGELINO, J. L., ISHIZUKA, M. M. Avaliação da prevalência de infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pela prova de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. **Bol. Oficina Sanit. Panam.**, **100**: 634-644, 1986.
- DARCY, F., MAES, P., GRAS-MASSE, H., AURIAULT, C., BOSSUS, M., DESLEE, D., GODARD, I., CESBRON, M. F., TARTAR, A., CAPRON, A., Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. **J.Immunol.**, **149**(11):36636-3641,1992.
- DEANE, M. P., SOGORB, S. F., JAMRA, L. F., GUIMARÃES, E. C. On the gametogenic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **13**:110-3, 1971.

- DEROUIN, F., RABIAN-HERZOG, C., SULAHIAN, A. Longitudinal study of the specific humoral and cellular response to *Toxoplasma gondii* in a patient with acquired toxoplasmosis. **J. Clin. Lab. Immunol.**, **30**: 97-102, 1989.
- DESMONTS, G., REMINGTON, J. Direct agglutination test for diagnosis of Toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity. **J. Clin. Microbiol.**, **11**(6): 562-68, 1980.
- DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. **N. Engl. J. Med.**, **290** (20):1110-1116, 1974.
- DEVADA, K., ANANDAN, R., DUBEY, J. P. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in Madras, India. **J. Parasitol.**, **84** (3):621-2, 1998.
- DINIZ, E. M. A., CAMARGO, M. E., COSTA VAZ, F. A. Toxoplasmose congênita. In: DINIZ, E. M. A., COSTA VAZ, F. A. **Infecções congênitas e perinatais**. São Paulo, Atheneu, 1991, p. 31-72.
- DORNY, P., VAN AKEN, D. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in goats in Sri Lanka. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **86** (1): 83-5, 1992.
- DUBEY J.P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures **J Parasitol.**,**84**(4), p.862-5, 1998.
- DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Vet Parasitol.**, **22**: 177-202, 1986.
- DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in pigs. **Vet. Parasitol.**,**19** (3-4): 181-223, 1986.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, **28**(7): 1019-1024, 1998.
- DUBEY, J. P. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Vet. Parasitol.**, **13**:199-211, 1983.

- DUBEY, J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **J. Parasitol.**, **82**(6): 957-961, 1996.
- DUBEY, J. P. Lesions in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Vet. Parasitol.**, **32** (2-3): 133-44, 1989.
- DUBEY, J. P. Lesions in transplacentally induced toxoplasmosis in goats. **Am. J. Vet. Res.**, **49** (6): 905-9, 1988.
- DUBEY, J. P. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T.gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **Am. J. Res.**, **49** (6): 910-3, 1988.
- DUBEY, J. P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers public health significance of toxoplasmosis in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **177**(12): 1203-7, 1980 .
- DUBEY, J. P. Serologic prevalence of toxoplasmosis in cattle, sheep, goats, pigs, bison, and elk in Montana. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **186**: 969-70, 1985.
- DUBEY, J. P. Status of toxoplasmosis in pigs in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **196**(2):270-4, 1990.
- DUBEY, J. P. Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **196**:259-62, 1990.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: KREIER, J. P. **Parasitic protozoa**. 2. ed., v.6, New York ,Academic Press, 1993, p. 1-57.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in goats.** Agriculture Pract., 8: **43-52, 1987.**
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **J. Am. Vet. Med Assoc.** **205** (11), 1593-1598, 1994.
- DUBEY, J. P., BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of Animals and Man.** CRC Press, Inc, Boca Raton, Flórida, 1988, 220p.

- DUBEY, J. P., BRAKE, R. J., MURRELL, K. D., FAYER, R. Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. **Am. J. Vet. Res.**, **47**: 518-522, 1986.
- DUBEY, J. P., FRENKEL, J. K. Cyst induced toxoplasmosis in cats. **J. Protozool.**, **19**: 155-177, 1972.
- DUBEY, J. P., GOODWIN, M. A., RUFF, M. D., KWOK, O. C., SHEN, S. K., WILKINS, G. C., THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in Japanese quail. **J. Vet. Diagn. Invest.**, **6** (2):216-21, 1994a.
- DUBEY, J. P., KIRKBRIDE, C. A. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **195**: 1715-6, 1989.
- DUBEY, J. P., KOTULA, A. W., SHARAR, A., ANDREWS, C. D., LINDSAY, D.S. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **J. Parasitol.**, **76** (2):201-4, 1990.
- DUBEY, J. P., LEIGHTY, J. C., BEAL, V. C, ANDERSON, W. R, ANDREWS C. D, THULLIEZ, P. National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. **J Parasitol.**, **77** (4): 517-21, 1991.
- DUBEY, J. P., MURRELL, K. D., FAYER,R., SCHAD, G. A. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **188**(9):1035-7, 1986.
- DUBEY, J. P., RUFF, M. D., WILKINS, G. C., SHEN, S. K., KWOK, O. C. Experimental toxoplasmosis in pheasants (*Phasianus colchicus*). **J. Wildl. Dis.**, **30**(1):40-5, 1994b.
- DUBEY, J. P., THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Am. J. Vet. Res.**, **54**(2):270-3, 1993.
- DUBEY, J. P., URBAN Jr, J. F.. Diagnosis of transplacentally induced toxoplasmosis in pigs. **Am. J. Vet. Res.**, **51**(8): 1295-98,1990.

- DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Serologic diagnosis to toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **194**(9): 1297-9, 1989.
- DUBEY, J., SHARMA, S. P., LOPES, W. G., WILLIAMS, J. F., WILLIAMS, S. F., WEISBRODE, S. E. Caprine Toxoplasmosis: abortion, clinical signs and distribution of toxoplasma in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, **41**: 1072-1076, 1980 .
- DUBREMTZ, J. F., RODRIGUEZ, C., FERREIRA, E. *Toxoplasma gondii* redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. **Exp. Parasitol.**, **59**: 24-32, 1985.
- DUPOUY-CAMET, J., DE SOUZA, S. L., MASLO, C., PAUGAM, A., SAIMOT, A. G., BENAROUS, R. TOURTE-SCHAEFER, C., DEROUIN, F. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, **31**(7):1866-9, 1993.
- DURFFE, P. T., CHIEN, J. Transmission of *Toxoplasma gondii* to cats via ingestion of infected pork. **J. Amer. Vet. Med. Ass.**, **159**: 1783-1788, 1971.
- EI - MASSRY, A., MAHDY, O. A., EI - GHAYSH, A., DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of turkeys, chickens, and ducks from Egypt. **J. Parasitol.**, **86**(3):627-8, 2000.
- ESTEBAN-REDONDO, I., INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, **20** (2):191-6, 1997.
- FAYER, R., FRENKEL, J. K. Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidia: *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma*. **J. Parasitol.**, **65**:756-762, 1979.
- FERRARONI, J. J., LACAZ, C. S. Prevalência de anticorpos contra agentes causadores de hepatite, malária, sífilis e toxoplasmose em cinco populações humanas distintas da Amazônia Brasileira. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **24** (3): 155-61, 1982.

- FERRARONI, J. J., REED, S. G., SPEER, C. A. Prevalence of *Toxoplasma* antibodies in humans and various animals in the Amazon. **Proc. Helminth. Soc. Wash.**, **47**:148-150, 1980.
- FLECK, D. G., CHESSUM, B. S., PERKINS, M. Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. **Br. Med. J.**, **3**:111-112, 1972.
- FLEGR, J., ZITKOVÁ, S., KODYM, P., FRYNTA, D. Induction of changes in human behavior by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **Parasitol.**, **113**: 49-54, 1996.
- FRENKEL, J. K. Diagnosis, incidence and prevention of congenital toxoplasmosis. **Amer. J. Dis. Child.**, **144**: 957-59, 1990.
- FRENKEL, J. K., DUBEY, J. P., MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, **167**:893-6, 1970.
- FRENKEL, J. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology and immunology. In: HAMMOND, D. M.; LONG, P. L. *Coccidia*, Baltimore, University Park Press, 1973, p.343.
- FRENKEL, J.K. Dermal hypersensitivity to toxoplasma antigens (toxoplasmins). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **68**: 634-6399, 1948. Apud: AMATO NETO, V., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I .S. **Toxoplasmose**. 4ed. São Paulo, Savier, 1995, 154p.
- FREYRE, A., BONINO, J., FALCON, J., CASTELLS, D., CORREA, O., CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Vet. Parasitol.**, **73**:13-5, 1997.
- GAJADHAR, A. A., ARAMINI, J. J., TIFFIN, G., BISAILLON, J. R. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in canadian market age pigs. **J. Parasitol.**, **84** (4): 759-763,1998.
- GAMBLE, H. R., BRADY, R. C., DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. **Vet. Parasitol.**, **82**(2):129-36, 1999.

- GANLEY, P. J., COMSTOCK, W. G. Association of cats and toxoplasmosis. **Am. J. Epidemiol.**, **111**: 238-245, 1980.
- GASCON, J., TORRES-RODRIGUEZ, J. M., SOLDEVILA, M., MERLOS, A. M. Sero-epidemiologia de la toxoplasmosis en dos comunidades de Rwanda (África Central). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **31** (6): 399-402, 1989.
- GAZZINELLI, R. T., WYSOCKA, M., HAYASHI, S., DENKERS, E.Y, HIENY, S., CASPAR, P., TRINCHIERI, G., SHER, A. Parasite-induced IL12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, **153**: 2533-2543, 1994.
- GAZZINELLI, R., HAKIM, F. T., HIENY, S., SHEARER, G. M., SHER, A. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J. Immunol.**, **146** (1): 286-292, 1991.
- GAZZINELLI, R., XU, Y., HIENY, S., CHEEVER, A., SHER, A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, **149** (1): 175-180, 1992.
- GAZZINELLI, R.T., HIENY, S., WYNN, T. A., WOLF, S., SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T cell deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 6115-6119, 1993.
- GELLIN, B. G., SOAVE, R. Coccidian infections in AIDS: Toxoplasmosis, Cryptosporidiosis and Isosporiasis. **Med. Clin. N. America**, **76** (1): 205-234, 1992.
- GOTTSTEIN, B. *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, **65**(Suppl):89S-95S, 1995.
- GRIMWOOD, J., SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. **Int. J. Parasitol.**, **26**(2):169-173, 1996.

- GROSS, U., MULLER, W. A., KNAPP, S., HEESEMANN, J. Identification of a virulence associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of mouse monoclonal antibody. **Infect. Immun.**, **59**:4511-4516, 1991.
- GUILLO, B.; DESMONTS, G. Diagnostic sérologique de la toxoplasmose. Essai d'application aux animaux de boucherie. **Rec. Méd. Vét**, **136**:383-398, 1960.
- GUIMARÃES, A. C. S., KAWARABAY, M., BORGES, M. M., TOLEZANO, J. E., ANDRADE JR, H. F. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **35** (6): 479-83, 1993.
- GUIMARÃES, A. C. S., PORTELA, A. A. B., KAWARABAYASHI, M., ARAÚJO, M. F., PAGLIARI, C., TOLENZANO, J. E., ANDRADE Jr, H. F. Diagnosis of acute toxoplasmosis in an immunocompetent patient by isolation of the agent and immunohistochemistry from lymph node biopsy: letter to editor. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **38**(1): 75-7, 1996.
- HAGIWARA T., KATSUBE Y., KAMIYAMA T. Latent infection of *Toxoplasma* in sheep and goats **Nippon Juigaku Zasshi**, **40**(4): 455-7, 1978.
- HALL, S. M. Congenital toxoplasmosis: regular review. **Br. Med. J.**, **305**(6848):291-7., 1992.
- HASHEMI-FESHARKI, R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. **Vet. Parasitol.**, **61**(1-2):1-3, 1996.
- HENDMAN, K., LAPPALAINEN, M., SEPPALA, I., MAKELA, O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Infect. Dis.**, **159**(4):736-40, 1989.
- HIRVELÄ-KOSKI, V. The prevalence of *Toxoplasma* antibodies in swine sera in Finland. **Acta Vet. Scand.**, **33**: 21-25, 1992.
- HOHFELD, P., DAFFOS, F., COSTA, J. M., THULLIEZ, P., FORESTIER, F., VIDAUD, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a

- polymerase-chain reaction test on amniotic fluid. **N. Engl. J. Med.**, **331**: 695-9, 1994.
- HOHLFELD, P., DAFFOS, F., COSTA, J. M., THULLIEZ, P., FORESTIER, F., VIDAUD, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain reaction test on amniotic fluid. **N. Engl. J. Med.**, **331**: 695-9, 1994.
- HOLLIMAN, R. E. Recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. **Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.**, 6: 5-16, 1994.
- HUONG, L. T. T., LJUNGSTRÖM, B. L., UGGLA, A., BJÖRKMAN, C. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. **Vet. Parasitol.**, **75**:53-57, 1998.
- HUTCHISON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, **206**:961-2, 1965.
- HUTCHISON, W. M., DUNACHIE, J. F., SIIM, J. C., WORK, K. Coccidian – Like nature of *Toxoplasma gondii*. **Br. Med. J.**, **1**:142-144, 1970.
- INSKEEP, W., GARDINER, C. H., HARRIS, R. K., DUBEY, J. P., GOLDSTON, R. T. Toxoplasmosis in atlantic bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*), **J. Wildlife Dis.**, **26** (3): 377-382, 1990.
- ISAAC-RENTON, J., BOWIE, W. R., KING, A., IRWIN, G. S; ONG, C. S, FUNG, C. P., SHOKEIR, M. O.; DUBEY, J. P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. **App. Environmental Microbiol.** **64** (6): 2278-2280, 1998.
- JACOBS, L., MELTON, M. L. Modifications in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various hosts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **3**: 447-457, 1974.
- JACOBS, L.; LUNDE, M. A hemagglutination test for toxoplasmosis. **J. Parasitol.**, **43**: 308-314, 1957. Apud: AMATO NETO, V.; MEDEIROS,

- E.A.S.; LEVI, G.C.; DUARTE, M.I.S. **Toxoplasmose**. 4ed. São Paulo, Savier, 1995, 154p.
- JAMRA, L. M. F., GUIMARÃES, E. C. Conversão sorológica para toxoplasmose em crianças de um centro de saúde de São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **23** (3):133-7, 1981.
- JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lutea in eye of normal dimensions, and microphthalmic eye, with parasites in the retina. **Cas. Lék. Cesk.**, **62**: 1021-7, 1054-9, 1081-5, 1111-5, 1138-44, 1923. Apud: AMATO NETO, V., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4ed. São Paulo, Savier, 1995, 154p.
- JOYNSON, D. H. M., PAYNE, R. A., RAWAL, B. K. Potencial role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. **J. Clin. Pathol.**, **43**(12): 1032-3, 1990.
- KANETO, C. N, COSTA, A. J., PAULILLO, A. C., MORAES, F. R., MURAKAMI, T. O., MEIRELES, M. V. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. **Vet. Parasitol.**, **69** (3-4): 203-10, 1997.
- KASPER, L. H., MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Today**, 10(5):184-188, 1994.
- KASPER, L. H., WARE, P. L. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. **J. Clin. Invest.**, **75**: 1570-1575, 1985.
- KEAN, B. H. Clinical toxoplasmosis – 50 years. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **66** (4): 549-471, 1972.
- KEAN, B. H., KIMBALL, A. C., CHRISTENSON, W. N. An epidemic of acute toxoplasmosis. **J.A.M.A.** **208**:1002-1004, 1969.
- KELEN, A. E., AYLLON-LEIDL, L., LAB-GOFFSKY, N. A. Indirect fluorescent antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. **Can. J. Microbiol.**, **8**: 545-54, 1962. Apud: AMATO NETO, V., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4ed. São Paulo, Savier, 1995,154p.

- KHAN, I. A., ECKEL, M. E., PFEFFERKORN, E. R., KASPER, L. H. Production of interferon- γ by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (p30) from *Toxoplasma gondii*. **J. Infect. Dis.**, **157**: 979-984, 1988.
- KHAN, I. A., SMITH, K. A., KASPER, L. H. Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (p30) of *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, **141**(10):3600-3605, 1988.
- KIRKPATRICK, C. F., COLVIN, B. A., DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* antibodies in common barn-owls (*Tyto alba*) and pigeons (*Columbia livia*) in New Jersey. **Vet. Parasitol.**, **36** (1-2):177-80, 1990.
- KOESTNER, A., COLE, C. R. Comparative studies of the pathogenesis of cerebral toxoplasmosis in domestic animals. **IV. Int. Congr. Neuropath**, **4**:297-303, 1962.
- KOSKINIEMI, M. Toxoplasmosis needs evaluation. An overview and proposals. **Am. J. Dis. Child**, **143**(6), 724-8, 1989.
- KOTULA, A. W., DUBEY, J. P., SHARAR, A. K., ANDREWS, C. D., SHEN, S. K., LINDSAY, D. S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **J. Food Prot.**, **54** (9): 687-690, 1991.
- KOZOJED, V., JÍRA, J., VALKOUN, A. Preservation of laboratory strains of *Toxoplasma gondii* in vitro. **J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.**, **29**(1): 97-100, 1985.
- KRAHENBUHL, J. L., RUSKIN, J., REMINGTON, J. S. The use killed in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, **108**(2):425-431, 1972.
- LAEMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685, 1970
- LAPPALAINEN, M. KOSKELA, P., KOSKINIEMI, M., AMMALA, P., HIILESMAA, V., TERAMO, K., RAIVIO, K. O., REMINGTON, J. S.,

- HEDMAN, K. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. **J. Infect. Dis.**, **167**: 691-7, 1993.
- LAPPIN, M. R., POWELL, C. C. Comparison of latex agglutination, indirect hemagglutination, and ELISA techniques for the detection of *Toxoplasma gondii* specific antibodies in the serum of cats. **J. Vet. Intern. Med.**, **5**(5): 299-301, 1991.
- LAPPIN, M. R., ROBERTS, S. M., DAVIDSON, M. G., POWELL, C. C., REIF, J. S. Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in the serum of cats. **Am. J. Vet. Res.**, **50**(9):1586-90, 1992.
- LARSSON C. E., JAMRA, L. M. F., GUIMARÃES, E. C. Prevalência da toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais em Uruguaiana, RS, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, **14**: 582, 1980.
- LARSSON, C. E., JAMRA, L. M. F., RIBEIRO, M. F. Prevalência de toxoplasmose felina determinada pela reação de Sabin-Feldman, em São Paulo. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 37, Pirassununga, 1982.
- LIN, D. B., SU, K. E., YU, J. C. Studies on cryopreservation of *Toxoplasma gondii* and its antigenicity in mice. **Am. J. Med. Hyg.**, **53**(4): 392-6, 1995.
- LINDASAY, D. S., DUBEY, J. P., BUTLER, J. M., BLAGBURN, B. L. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Vet. Parasitol.**, **73**(1-2): 27-33, 1997.
- LUCAS, S. R. R., HAGIWARA, M. K., LOUREIRO, V. S., IKESAKI, J. Y., BIRGEL, E. H. *Toxoplasma gondii* infection in brazilian domestic outpatient cats. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **41**(4): 221-224, 1999.
- LUNDEN, A., PARMLEY, S. F., BENGTSSON, K. L., ARAUJO, F. G. Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, **83**(1):6-9, 1997.

- LYCKE, E., CARLBERG, K., NORRBY, R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of Toxoplasma. **Infect. Immun.**, **11**: 853-861, 1975.
- MAGALDI, C., ELKIS, H., PATTOLI, D. Surto de toxoplasmose em um seminário de Bragança Paulista–SP. Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. **Rev. Saúde Pública**, **1**:141-71, 1968.
- MAINAR, R. C, DE LA CRUZ, C., ASENSIO, A., DOMINGUES, L., VAZQUEZ-BOLAND, J. A. Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madri Region, Spain, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. **Vet. Res. Comm.**, **20**:153-9, 1996.
- MARCA, M. C., RAMOS, J. J., LOSTE, A., SAEZ, T., SANZ, M. C. Comparison of indirect immunofluorescent antibody test and modified direct agglutination test methods for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in adult sheep in Spain. **Vet. Parasitol.**, **67**(1-2):99-103, 1996.
- MARQUES, L. C., COSTA, A. J. Experimental sheep toxoplasmosis. I. Clinical, haematological and immunological observations. **Ars. Vet.**, **1**: 57-67, 1985.
- MASUR, H., JONES, T. C., LEMPert, J. A., CHERUBINI, T. D. Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. **Am. J. Med.**, **64**: 396-402, 1978.
- MATSUO, K., HUSIN, D. A survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in goats and cattle in Lampung, Indonesia. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, **27**(3): 554-5, 1996.
- McKERROW, J., HEYNEMAN, D. Parasitic diseases. In: STITES, D. P., TERR, A. I., PARSLOW, T. G. **Basic & clinical immunology**. 8. ed. Westport, Appleton & Lange, 1994, p. 668-669.
- MEHDI, N. A., KAZACOS, K. R., CARLTON, W. W. Fatal disseminated toxoplasmosis in a goat. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **183** (1):115-7, 1983.

- MEHLHORN, H.; FRENKEL, J. K. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondi*, *Sarcocystis muris* and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. **J. Parasitol.**, **66** (1): 59-67, 1980.
- MELLO, U. Un cas de toxoplasmose du chien observé à Turin. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, **3**:359-63, 1910.
- MORSY, T. A., EL DASOUQUI, S.T., MICHAEL, S. A. A preliminary study on toxoplasmosis in Amman, Jordan. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, **7**: 226, 1977.
Apud: YOUSSEF, M. M., EL GANAYNI, G. A., EL SHAZLY, A. M. The efficacy of IHAT, IFAT and DOT-ELISA in sero-diagnosis of toxoplasmosis in complicated pregnancies. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, **22** (2): 343-7, 1992.
- MUNDAY, B. L. Bovine toxoplasmosis: experimental infections. **Int. J. Parasitol.**, **8**: 285-288, 1978.
- NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 6.ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1985, p. 141-53.
- NICHOLS, B.A., O'CONNOR, G.R. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoan *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. **Lab. Invest.** **44**:324-335, 1981.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. **C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci.**, **147**: 763-766, 1908.
- NOBUTO, K., SUZUKI, K., OMURO, M., ISHI, S. Studies on toxoplasmosis in domestic animals. Serological response of animals to experimental infection and successful application of complement inhibition test for exposure of infected herd. **Bull. Natl. Inst. Anim. Health (Japan)**, **40**: 29-52, 1960.
- NOGAMI, S., MORITOMO, T., KAMATA, H., TAMURA, T., SAKAI, T., NAKAGAKI MOTOYOSHI, S. Seroprevalence against *Toxoplasma gondii* in domiciled cats Japan. **J Vet Med Sci.**, **60**(9),1001-1004, 1998.

- OLAFSON, P., MONLUX, W. S. Toxoplasma infection in animals. **Cornell Vet.**, **32**:176-90, 1942.
- OPEL, U., CHARLESTON, W. A., POMROY, W. E., ROMMEL, M. A survey of the prevalence of Toxoplasma infection in goats in New Zealand and a comparison of the latex agglutination and indirect fluorescence tests. **Vet. Parasitol.**, **40** (3-4): 181-6, 1991.
- PANDEY, V. S., van KNAPEN, F. The seroprevalence of toxoplasmosis in sheep, goats and pigs in Zimbabwe. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **86**(3): 313-5, 1992.
- PARK, B. K., MOON, H. R., YU, J. R., KOOK, J., CHAI, J. Y., LEE, S. H. Comparative susceptibility of different cell lines for culture of *Toxoplasma gondii* in vitro. **Korean J. Parasitol.**, **31**(3): 215-222, 1993.
- PASSOS, L. M. F., LIMA, J. D., FIGUEIREDO, B. L. Determination of *Toxoplasma gondii* infection in cattle through serological tests and attempts to isolate the parasite from the diaphragm musculature. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, **36**: 581-590, 1984.
- PASSOS, L. N., ARAÚJO FILHO, O. F., ANDRADE JUNIOR, H. F. *Toxoplasma* encephalitis in AIDS patients in São Paulo duri and 1991. A comparative retrospective analysis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **42** (3):141-145, 2000.
- PEPIN, M., RUSSO, P., PARDON, P. Public health hazards from small ruminant meat products in Europe. **Rev. Sci. Tech.**, **16** (2): 415-25, 1997.
- PFEFFERKORN, E. R. Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In: DAVID, J. W. **Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects**. New York: WH Freeman, 1990, p. 26-50.
- PIMENTA, A. L., PIZA, E. T., CARDOSO Jr, R. B., DUBEY, J. P. Visceral toxoplasmosis in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, **45**(3-4):323-6, 1993.

- PINKERTON, H.; HENDERSON, R.G. Adult toxoplasmosis. A previously unrecognized disease entry simulating the typhus-spotted fever group. **J. Am. Med. Assoc.**, **116**: 807-814, 1941. Apud: AMATO NETO, V., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4.ed. São Paulo, Savier, 1995,154p.
- PINKERTON, H.; WEINMAN, D. Toxoplasma infection in man. **Arch. Pathol.**, **30**: 374-392, 1940. Apud: AMATO NETO, V., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4.ed. São Paulo, Savier, 1995,154p.
- PIPER, R. C., COLE, C. R., SHADDUCK, J. A. Natural and experimental ocular toxoplasmosis in animals. **Am. J. Ophthalmol.**, **69**: 662-668, 1970.
- PITA GONDIM, L. F., BARBOSA Jr, H. V., RIBEIRO FILHO, C. H., SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, **82**(4): 273-6, 1999.
- PLANT, J. W., RICHARDSON, N., MOYLE, G. G. Toxoplasma infection and abortion in sheep with feeding of grain contaminated with cat faeces. **Aust. Vet. J.**, **150**: 19-21, 1974.
- POP, A., OPRISAN, A., CERBEU, A., STAVARACHE, M., NITU, R. Toxoplasmosis prevalence parasitologically evaluated in meat animals. **Arch Roum Pathol Exp Microbiol.**, **48** (4): 373-8, 1989.
- POTASMAN, I., ARAÚJO, F. G., DESMONTS, G., REMINGTON, J. S. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. **J. Infect. Dis.**, **54**: 650-657, 1986.
- QUIST, C. F., DUBEY, J. P., LUTTRELL, M. P., DAVIDSON, W. R. Toxoplasmosis in wild turkeys: a case report and serologic survey. **J. Wildl. Dis.**, **31** (2): 255-8, 1995.
- RAWAL, B. D. Toxoplasmosis; a dye-test survey on sera from vegetarians and eaters in Bombay. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **53**:61-63, 1959.

- REMINGTON, J. S., DESMONTS, G. Congenital toxoplasmosis: variability in the IgM-fluorescent antibody response and some pitfalls in diagnosis. **J. Pediatr.**, **83**(1): 27-30, 1973.
- REMINGTON, J. Toxoplasmosis: recent development. **Ann. Rev. Med.**, **21**: 201-218, 1970.
- REMINGTON, J.S., McLEOD, R., DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J. O. **Infectious diseases of the fetus & newborn infant**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995, p. 140-267.
- RIEMANN, H. P., KANEKO, J. J., HAGHIGHI, S., BEHYMER, D. E., FRANTI, C. E., RUPPANNER, R. The prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among hospitalized animals and stray dogs. **Can J. Comp. Med.**, **42** (4): 407-13, 1978.
- RIFAAT, M. A., MORSY, T. A., SADEY, M. S. M., KHALID, M. L. M.; AZAB, M. E., SAFAR, E. H. Prevalence of Toxoplasma antibodies among slaughtered animals in Lower Egypt. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, **8**: 339-45, 1978. Apud: YOUSSEF, M. M., EL GANAYNI, G. A., EL SHAZLY, A. M. The efficacy of IHAT, IFAT and DOT-ELISA in sero-diagnosis of toxoplasmosis in complicated pregnancies. **J. Egypt. Soc. Parasitolol.**, **22**, (2): 343-7, 1992
- ROBERTS, F., McLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitol. Today**, **15** (2): 51-57, 1999.
- ROMMEL, M. The possibility of transmission of *T. gondii* by domestic animals through nematodes and milk. **Schlacht und Viehhof Zeiting**, **69**: 26-69, 1969.
- RUIZ, A., FRENKEL, J. K. Isolation of Toxoplasma from cat feces deposited in false attics of homes in Costa Rica. **J. Parasitol.**, **63**: 931-932, 1977.
- RUIZ, A., FRENKEL, J. K., CERDAS, L. Isolation of Toxoplasma from soil. **J. Parasitol.**, **59**: 204-206, 1973.

- SABIN, A. B. Toxoplasmic encefalitis in children. **J. Amer. Med. Ass.**, **116**: 801-807, 1941.
- SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (Toxoplasma). **Science**, **108**: 660-3, 1948.
- SACKS, J. J., ROBERTO, R. R., BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk, **JAMA**, **248** (14): 1728-32, 1982.
- SALATA, E., YOSHIDA, E. L. A., PEREIRA, E. A., CORREA, F. M. A, Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **27**:20-22, 1985.
- SAMAD, M. A., DEY, B. C., CHOWDHURY, N. S., AKHTAR, S, KHAN, M. R., Sero-epidemiological studies on *Toxoplasma gondii* infection and animals in Bangladesh. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**. **28**(2), 339-343, 1997.
- SANCHEZ, R.M.; GORDO, R. B.; AMADOR, E.A.; BERRIO, L. A. Prevalência de infecção toxoplásmica em gestantes de la provincia la Habana. **Rev. Inst. Med. Tropical São Paulo**, **36** (5):445-450, 1994.
- SANGER, V.L., CHAMBERLAIN, D. M., CHAMBERLAIN, K. W., COLE, C. R., FARRELL, R. L. Toxoplasmosis. V. Isolation of Toxoplasma from cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **123**: 87-91, 1953.
- SANTOS, S. M., AMARAL, V., REBOUÇAS, M. M., DRUMOND, L. S. Anticorpos antitoxoplasma detectados por hemaglutinação indireta em soros de gatos domésticos provenientes da capital de São Paulo, Brasil. **Biológico**, **49**:163-165, 1983.
- SHAN, B., SUGIURA, T., YAMASHITA, U. Five monoclonal antibodies against glycophorin A of human erythrocyte. **Hybridoma**, **17**(1): 55-62, 1998.

- SHARMA, S. D. Immunology of toxoplasmosis. In: DAVID, J. W., **Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects**. New York: WH Freeman, 1990, p.184-99.
- SHARMA, S. P., DUBEY, J. P. Quantitative survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in pepsin and in trypsin solutions, **Am. J. Vet. Res.**, **42**:128-30, 1981.
- SHOURA, M. I., MORSY, T. A., EL DASOQUI, I. T. Toxoplasmin skin tests in Riyadh, Saudi Arabia. **J. Trop. Med. Hyg.**, **76**: 254, 1973.
- SIBLEY, L.D., BOOTHROYD, J. Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. **Mol. Biochem. Parasitol**, **51**:291-300, 1992.
- SILVA, A. V. Toxoplasmose ovina: avaliação de métodos diretos na detecção do seu agente em cordeiros sorologicamente positivos, abatidos para consumo humano. Botucatu, 1999. 161p. [Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista].
- SILVA, D. A., CABRAL, D. D., BERNARDINA, B. L., SOUZA, M. A., MINEO, J. R. Detection of *Toxoplasma gondii* specific antibodies in dogs. A comparative study of immunoenzymatic, immunofluorescent and haemagglutination titers. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**(6):785-9, 1997.
- SMITH, J. E. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, **25**(11):1301-9, 1995.
- SMITH, J. L. Documented outbreaks of toxoplasmosis: Transmission of *Toxoplasma gondii* to humans. **J. Food Protect.**, **56**:630-9, 1993.
- SOGORB, F., JAMRA, L. F., GUIMARÃES, E. C., DEANE, M. P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres em São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **14**:314-320, 1972.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche de'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo.

- Nota preliminaire. **Rev. Soc. Sci. São Paulo**, **3**:109-12, 1908. Apud: AMATO NETO, V., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4.ed. São Paulo, Savier, 1995, p.154.
- STALHEIM, O. H., PROCTOR, S. J., FAYER, R., LUNDE, M. Death and abortion in cows experimentally infected with *Sarcocystis* from dogs. **Annu. Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost.**, **19**: 317-327, 1980.
- STILES, J., PRADE, R., GREENE, C. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. **Am. J. Vet. Res.**, **57**(3): 264-7, 1996.
- STORMONT, C. J. Blood groups in animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **181**(10):1120-4, 1982.
- STRICKLAND, G.T. Laboratory diagnosis of parasitic diseases. In: **Hunter's Tropical Medicine**. 7.ed., Philadelphia, EUA,.1991, p.1079-1080.
- SUARÉZ-ARANDA, F., GALISTEO Jr., A. J., HIRAMOTO, R. M., CARDOSO, R. P. A., MEIRELES, L. R., MIGUEL, O., ANDRADE Jr., H. F. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Vet. Parasitol.**, **91**: 23-32, 2000.
- SUGGS, M., WALLS, K. W., KAGAN, I. G. Comparative antigenic study of *Besnoitia jellisoni*, *B. panamenis* and five *Toxoplasma gondii* isolates. **J. Immunol.**, **101**: 166-175, 1968.
- SUMMER, B., ACKLAND, M. L. *Toxoplasma gondii* antibody in domestic cats in Melbourne. **Aust Vet J.**, **77**(7), 447-449, 1999.
- SVOBODOVÁ, V., KNOTEK, Z., SVOBODA, M. Prevalence of IgG and IgM antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in cats. **Vet. Parasitol.**, **80**: 173-176, 1998.
- TENTER, A. M., VIETMEYER, C., JOHNSON, A. M., JANITSCHKE, K., ROMMEL, M., LEHMACHER, W. ELISA based on recombinant antigens for

- seroepidemiological studies on *Toxoplasma gondii* infections in cats. **Parasitology**, **109**(1): 29-36, 1994.
- THOMAS, P. A., PELLOUX, H. Toxoplasmosis congenital and in immunocompromised patients: a parallel. **Parasitol. Today**, **9** (2): 61-63, 1993.
- TIMOFEEV, B. A.; AKULOV, A. V. Life cycle of toxoplasma and their epizootiological danger for animals. **Skih. Biol.**, **10**:257-263, 1975.
- TOMAVO, S., DUBREMETZ, J. F., SCHWARZ, R.T. Structural analysis of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface glycoprotein gp23. **Biol Cell**, **78** (3):155-162, 1993.
- TORRES, C.M. Affinité de l'*Encephalitozoon chagasi* agent étiologique d'une méningoencephalomyélite congénitale avec myocardite et myosite chez l'homme. **C. R. Soc. Biol.**, **97**:1797-1799, 1927. Apud: AMATO NETO, V.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4.ed. São Paulo, Savier, 1995, 154p.
- UGGLA, A. Evaluation of a solid phase immunoassay (DIS ELISA) for the serodiagnosis of ovine toxoplasmosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **14** (4):309-18, 1987.
- UGGLA, A., MATTSON, S., JUNTTI, N. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats, dogs and horses in Sweden. **Acta Vet. Scand.** **31**(2): 219-222, 1990.
- UNDERWOOD, W. J., ROOK, J. S. Toxoplasmosis infection in sheep. **Comp. Cont. Ed. Vet. Pract.**, **14**: 1543-9, 1992.
- Van KNAPEN, F., KREMERS, A. F., FRANCHIMONT, J. H., NARUCKA, U. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in the Netherlands: towards an integrated control of livestock production. **Vet. Q.**, **17**(3): 87-91, 1995.

- VELGE-ROUSSE, F., CHARDES, T., MEVELEC, P., BRILLARD, M., HOEBEKE, J., BOUT, D. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **66**(1):31-38, 1994.
- VENKATESAN, P., WAKELIN, D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs, **Parasitol. Today**, **9**(6): 228-232, 1993.
- VERGARA, T. R. C. Epidemia de toxoplasmose do sistema nervoso central em enfermos com AIDS na cidade do Rio de Janeiro. **Arq. Bras. Med.**, **59** (6):397-406, 1985.
- VICKERS, M. C., HARTLEY, W. J., MASON, R. W., DUBEY, J. P., SCHOLLAM, L. Blindness associated with toxoplasmosis in canaries. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **200** (11): 1723-5, 1992.
- VITOR, R. W. A.; PINTO, J. L.; CHIARI, C. A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, **42** (2):147-154, 1991.
- WAINSTEIN, M. V. Achados neuropatológicos na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA): Revisão de 138 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **25** (2): 95-9, 1992.
- WALDELAND, H., FRENKEL, J. K. Live and killed vaccines against toxoplasmosis of mice. **J. Parasitol.**, **69**(1):60-65, 1983.
- WALLACE, G. D. Serological and epidemiologic observations on toxoplasmosis on three Pacific atolls. **Am. J. Epidemiol.**, **90**: 103-111, 1969.
- WARNEKULASURIYA, M.R., JOHNSON, J. D., HOLLIMAN, R. E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **Int. J. Food Microbiol.**, **45**: 211-5, 1998.
- WEBSTER, J. P. The effect of *Toxoplasma gondii* and other parasites on activity levels in wild and hybrid *Rattus norvegicus*. **Parasitol.**, **109**: 583-589, 1994.

- WEBSTER, J. P., BRUNTON, C. F. A., MACDONALD, D. W. Effect of *Toxoplasma gondii* on neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitol.**, **109**: 37-43, 1994.
- WINSTANLEY, P. Drug treatment of toxoplasmic encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. **Postgrad. Med. J.**, **71**(837): 404-8, 1995.
- WOLF, A., COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to na encephalytozoon (encephantozic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. **Bull. Neurol. Inst.**, **6**: 306-371, 1937. Apud: AMATO NETO, V., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4.ed. São Paulo, Savier, 1995, 154p.
- WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, **7**: 299-316, 1993.
- YAMAMOTO, Y. I. Toxoplasmose aguda: desenvolvimento de reagente de hemaglutinação passiva (HA-TOXO-IgM) para fins de diagnóstico. São Paulo, 1987. 126p. [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- YILMAZ, S. M., HOPKINS, S. H. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **J. Parasitol.**, **58**: 938-939, 1972.

ANEXO 1

(A)

Reação de hemaglutinação indireta dos soros bovinos, usando kit comercial Salck HAP Toxoplasmosse.

ANEXO 1

(B)

Reação de hemaglutinação indireta dos soros ovinos, usando kit comercial Salck HAP Toxoplasmose.

ANEXO 1

(C)

Reação de hemaglutinação indireta dos soros caprinos, usando kit comercial Salck HAP Toxoplasmose.

ANEXO 1

(D)

Reação de hemaglutinação indireta dos soros suínos, usando kit comercial Salck HAP Toxoplasmosse.

ANEXO 1

(E)

Reação de hemaglutinação indireta dos soros de frangos de corte, usando kit comercial Salck HAP Toxoplasmose.

ANEXO 1

(F)

Reação de hemaglutinação indireta dos soros de cães, usando kit comercial Salck HAP Toxoplasmose.

ANEXO 1

(G)

Reação de hemaglutinação indireta dos soros de gatos, usando kit comercial Salck HAP Toxoplasmosse.

ANEXO 2

(B)

Western blotting de antígenos de *T.gondii* ensaiados frente a diversos soros de ovinos

ANEXO 2

(A)

Western blotting de antígenos de *T.gondii* ensaiados frente a diversos soros de bovinos

ANEXO 2

(C)

Western blotting de antígenos de *T.gondii* ensaiados frente a diversos soros de caprinos.

ANEXO 2

(E)

Western blotting de antígenos de *T.gondii* ensaiados frente a diversos soros de cães.

ANEXO 2

(F)

Western blotting de antígenos de *T.gondii* ensaiados frente a diversos soros de gatos.

ANEXO 2

(D)

Western blotting de antígenos de *T.gondii* ensaiados frente a soros suínos.

ANEXO 3

Histologia da infecção experimental crônica de galinhas pela cepa RH de *Toxoplasma gondii*, onde podem ser notados focos perivasculars de infiltrado inflamatório crônico(setas) nos vários órgãos estudados. Não foram encontrados cistos do agente após pesquisa imunohistoquímica. A. Fígado, B. Coração, C Musculo esquelético, D Musculatura lisa . E Encefálo.