

## ***Toxoplasma gondii*: II. Caracterização antigênica de taquizoítos de oito amostras\***

### ***Toxoplasma gondii*: II. Tachyzoite antigenic characterization of eighth strains**

**Regina MITSUKA<sup>1</sup>; Itamar Teodorico NAVARRO<sup>1</sup>; Andrea Cláudia BECKNER DA SILVA<sup>2</sup>; José Wander BREGANÓ<sup>1</sup>; Amauri ALFIERI<sup>1</sup>; José Vitor JANKEVICIUS<sup>1</sup>; Odilon VIDOTTO<sup>1</sup>**

**CORRESPONDÊNCIA PARA:**  
Odilon Vidotto  
Departamento de Medicina  
Veterinária Preventiva  
Universidade Estadual de  
Londrina  
Caixa Postal 6001  
86051-970 – Londrina – PR  
e-mail: vidotto@npd.uel.br

1 - Departamento de Medicina  
Veterinária Preventiva da UEL  
– PR  
2 - Universidade Estadual de  
Maringá – PR

#### **RESUMO**

Oito amostras de *T. gondii* - LIV IV, LIV V e S 11 isoladas de suínos, RH e VPS de seres humanos, AS 28 de camundongo, HV III de cão e CN de gato - foram analisadas com o objetivo de verificar a existência de possíveis diferenças na resposta imune quando inoculadas em coelhos. Através da técnica de ELISA, não foram constatadas diferenças entre as oito amostras estudadas. Todas as amostras reagiram de forma semelhante com soros homólogos e heterólogos. A suspensão antigênica, constituída de extrato celular total, mostrou-se eficiente no ELISA teste indireto, já que os soros positivos reagiram fortemente e os soros negativos não apresentaram reação contra os antígenos testados. A análise das amostras, pela técnica de Western blot, revelou que os isolados de *T. gondii* compartilham vários antígenos com algumas variações. Dentre as bandas reconhecidas no Western blot, três foram comuns a todas as amostras: a p33 (33-37 kDa), p54 (52-55 kDa) e a p66 (66 kDa). A amostra HV III, isolada recentemente de um cão, foi a que mais diferiu no perfil antigênico. Essa amostra não apresentou três antígenos (50, 70 e 75 kDa) presentes nas demais amostras. Apenas dois antígenos, um de 62 kDa da CN e outro de 67 kDa da LIV IV, foram amostra-específicos.

**UNITERMOS:** *Toxoplasma gondii*; Antígenos; ELISA teste indireto; Western blot.

#### **INTRODUÇÃO**

Diferentes amostras de *Toxoplasma gondii*, isoladas de diversas espécies animais, apresentam variações na virulência quando inoculadas em animais de laboratório<sup>13,15</sup>. Ware; Kasper<sup>30</sup>, utilizando as técnicas de Western Blot e redução da formação de placas de parasitas com anticorpos monoclonais, observaram diferenças qualitativas e quantitativas nos antígenos de três amostras (RH, P e C). De La Cruz *et al.*<sup>12</sup>, no entanto, ao analisarem quatro amostras de *T. gondii*, através da técnica de Western blot, utilizando soros hiperimunes produzidos em camundongos, observaram apenas diferenças quantitativas na expressão de antígenos comuns, sugerindo, os autores, que fossem devidas a uma indução da expressão pelos hospedeiros ou influenciados pela manipulação laboratorial.

Bekner da Silva *et al.*<sup>1</sup>, trabalhando com cinco amostras de *T. gondii* e inoculando-as em suínos, demonstraram a equivalência da reação homóloga e heteróloga dessas amostras de *T. gondii*, pela reação de imunofluorescência, bem como a redução dos títulos de anticorpos quando da adsorção dos soros específicos com taquizoítos vivos das outras amostras. Resultados similares foram obtidos por Navarro *et al.*<sup>23</sup> quando pesquisaram a resposta imune em gatos inoculados com cinco amostras de *T. gondii*. Outra forma de caracterizar amostras de *T. gondii* foi utilizada por Darde *et al.*<sup>9</sup>, através

da determinação dos perfis de isozimas. Em sete amostras, esses pesquisadores obtiveram três grupos de zimodemas que estavam relacionados com a virulência em camundongos e a capacidade de produzir oocistos. Considerando a grande importância dessa doença, tanto em seres humanos como em animais, idealizou-se o presente trabalho, com o intuito de contribuir para o estudo da resposta imune de coelhos ao parasito e obter informações adicionais sobre os antígenos de amostras ainda não analisadas.

#### **MATERIAL E MÉTODO**

**Amostras de *Toxoplasma gondii*.** As oito amostras analisadas foram: RH isolada nos EUA por Sabin<sup>24</sup> e VPS em São Paulo, SP, por Ishizuka<sup>\*\*</sup>, de humanos; CN também isolada em São Paulo, SP, por Ogassawara<sup>\*\*\*</sup>, de gato; LIV IV e LIV V<sup>23</sup> isoladas em Londrina, PR, e S 11<sup>21</sup> em Erechim, RS, de suínos; AS 28<sup>10</sup> isolada em São Paulo, SP, de um camundongo silvestre e HV III<sup>28</sup> isolada de cão em Londrina, PR. Desde o isolamento até o momento de sua utilização nas diferentes etapas do trabalho, as amostras do parasito foram mantidas em laboratório, através de passagens sucessivas em camundongos suíços pela via intraperitoneal.

**Obtenção de taquizoítos.** Para a obtenção de taquizoítos utilizados na eletroforese em gel de poliacrilamida, reação de

\* Trabalho financiado pelo CNPq e CPG/UDEL.

\*\* ISHIZUKA, M. Isolamento da amostra VPS de *Toxoplasma gondii* em São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária da USP, 1982, comunicação pessoal.

\*\*\* OGASSAWARA, S. Isolamento da amostra CN de *Toxoplasma gondii* em São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária da USP, 1988, comunicação pessoal.

imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA teste indireto, os camundongos receberam, via intraperitoneal, inóculo de 0,2 ml de uma suspensão de taquizoítos vivos, em solução fisiológica estéril, obtidos através de uma lavagem peritoneal de camundongos previamente infectados. A purificação das suspensões procedeu-se da seguinte forma: as amostras foram submetidas, primeiro, a uma centrifugação numa baixa rotação (1.000 rpm durante 30 segundos), após a qual os sobrenadantes foram filtrados em uma membrana de policarbonato (Nucleopore Corp.) com diâmetro dos poros de três  $\mu\text{m}$  e centrifugados duas vezes a 2.500 rpm por oito minutos. Os sedimentos foram então ressuspensos em solução de NaCl a 0,9% e padronizados, por contagem dos taquizoítos, em câmara de Neubauer.

**Obtenção de soros hiperimunes.** Para a obtenção de soros hiperimunes, foram inoculados dois coelhos mestiços, fêmeas, com 90 dias de idade, para cada amostra. Antes da inoculação, os animais foram testados, para se verificar a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma*, pela RIFI, sendo que todos foram negativos em dois testes realizados com intervalo de um mês. Os coelhos receberam, via intraperitoneal, inóculo de 106 taquizoítos vivos por animal. Quando apareceram os sintomas da infecção, os coelhos foram tratados com sulfametoxazol (15 mg/kg) e trimetropim, durante 10 dias. As amostras, que levaram os animais a óbito, foram novamente inoculadas com 105 taquizoítos vivos por coelho. Após 45 dias da inoculação, os animais foram sangrados, através de punção cardíaca, e o soro armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

**RIFI e ELISA.** A pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nos soros dos coelhos foi realizada, através da RIFI, conforme técnica preconizada por Camargo<sup>4</sup> e do ELISA teste indireto segundo Camargo *et al.*<sup>5</sup> e Mineo *et al.*<sup>22</sup>, com algumas modificações. Os taquizoítos puros de cada amostra, obtidos como descrito anteriormente, foram concentrados em 1,5 ml de salina, sendo essa solução sonicada (23 kHz, seis vezes em intervalos de 30 segundos a  $4^{\circ}\text{C}$ ) e a concentração de proteína dosada pelo método de Bradford<sup>3</sup>. Essa solução antigênica foi então armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso. A sensibilização das microplacas de ELISA foi realizada com uma suspensão antigênica na concentração de 20  $\mu\text{g/ml}$  de proteína. Os soros foram diluídos a partir de 1:1.000 até 1:512.000, numa razão de dois. O conjugado utilizado foi um anticorpo de carneiro anti IgG de coelho marcado com peroxidase diluído a 1:1.000 (Sigma). A revelação foi feita com 100  $\mu\text{l}$  da solução de substrato contendo 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%), 10  $\mu\text{g}$  de OpD (*O-phenylenediamine dihydrochloride*-Sigma) e 100 ml de tampão de substrato (0,72% p/v de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0,52% p/v de ácido cítrico). Depois de 15 minutos, a reação foi interrompida com 25  $\mu\text{l}$  de solução de ácido sulfúrico a 1%. A densidade óptica (D.O.) a 492 nm foi medida em um espectrofotômetro *Titerk Multiskan* (Labsystems). Foram feitos controles do conjugado, no qual colocou-se no lugar do soro apenas tampão de incubação, do substrato, em que a reação foi efetuada sem o soro e sem o conjugado e, do soro negativo, com o *pool* dos soros pré-ímmunes diluídos 1:1000. O título foi determinado como a maior diluição do soro que exibiu uma absorbância duas vezes maior que a do soro controle negativo. Cada uma das oito preparações antigênicas foi colocada para reagir com todos os soros hiperimunes.

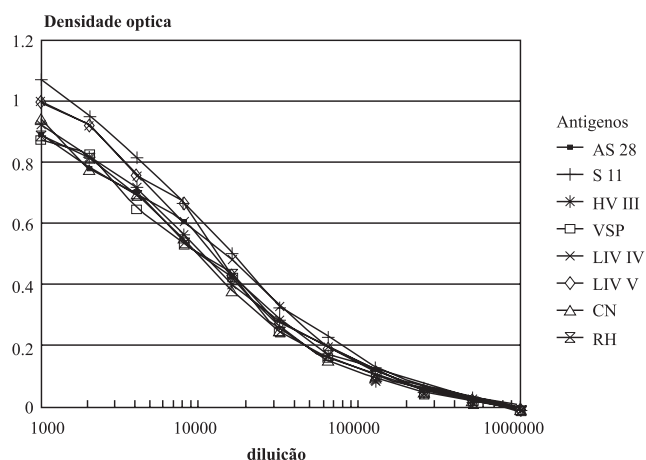
**SDS-PAGE.** A separação de proteínas foi realizada, através de eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE), concentração de 12,5%, de acordo com o método descrito por Laemmli<sup>19</sup>. A suspensão de parasitos obtida foi diluída em tampão de amostra e sonicada conforme descrito anteriormente. Cada amostra foi pipetada na con-

centração de  $2,5 \times 10^7$  taquizoítos por canaleta. A corrida eletroforética foi realizada em corrente constante de 100 V por aproximadamente três horas. Padrões de peso molecular incluíram albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

**Western blot.** O procedimento de transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose (Western blot) obedeceu ao preconizado por Towbin *et al.*<sup>27</sup>. As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas eletroforéticamente do gel para membrana de nitrocelulose de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (Pharmacia). A transferência foi feita a 60 V, durante 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . A membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau a 0,2%, para verificação da eficiência da transferência, com a visualização das bandas de proteínas. A membrana foi então colocada em PBS pH 7,2 (0,15 M) e deixada em repouso a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas. As fitas de nitrocelulose foram colocadas para reagir com um soro homólogo, com o soro heterólogo (anti-RH) e com o soro pré-ímmune de cada coelho. O conjugado utilizado foi um anticorpo de carneiro anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma) diluído a 1:2.000. A revelação foi realizada em solução de 4-cloro-1-naftol, lavada com água e fotografada.

## RESULTADOS

Os testes de ELISA foram realizados com a mesma concentração de proteínas em todas as amostras (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Os soros hiperimunes obtidos de coelhos reagiram igualmente contra os extratos de taquizoítos das oito amostras de *T. gondii*. Na repetição do teste, os resultados foram similares. A Fig. 1 ilustra o tipo de curva apresentada pelas oito amostras estudadas. Todos os soros reagiram fortemente contra as soluções antigênicas preparadas a partir de um extrato de proteínas totais de taquizoítos. O controle do soro negativo apresentou uma D.O. média de 0,004 no primeiro teste e de 0,006 no segundo. Considerando como título final aquele superior a duas vezes a D.O. dos soros negativos, todos os soros apresentaram título final de 512.000 contra qualquer um dos antígenos. Comparando-se a média das D.O. dos diversos soros hiperimunes contra todas as amostras de *Toxoplasma gondii*, verificou-se que, numa diluição média de 1:16.000, a variação foi de 1,021 (anti-LIV V) até 0,213 (anti-



**Figura 1**

ELISA teste indireto. Reatividade do soro anti-S11 contra o extrato celular total das amostras: AS 28; S11; HV III; VPS; LIV IV; LIV V; CN e RH, na concentração de 20  $\mu\text{g}$  de proteína/ml.

AS 28) como mostra a Tab. 1. Na RIFI, o título final foi de 16.000 para o soro anti-AS 28, 32.000 para o anti-CN e 64.000 para os demais anti-soros: S 11, HV III, VPS, LIV IV, LIV V e RH (Tab. 1).

No Western blot, o perfil antigênico das oito amostras pode ser visualizado nas Fig. 2 e 3. As amostras de *T. gondii* apresentaram grande variedade de antígenos, algumas com mais de 15 bandas de peso molecular variando entre 26 e 95 kDa. Dentre os antígenos observados, podem-se destacar nove bandas de peso molecular aproximado de 26, 33-37, 41-45, 46, 50, 52-55, 66, 70 e 75 referidas no presente trabalho como: p26, p33, p43, p46, p50, p54, p66, p70 e p75. Os antígenos p33, p54 e p66 foram comuns a todas as amostras, sendo que os antígenos p33 e p66 foram reconhecidos pelo soros homólogos e heterólogos e o antígeno p54 foi reconhecido somente pelo soro heterólogo (anti-RH) nas amostras VPS, S 11 e AS 28. O antígeno p43 não foi reconhecido apenas na amostra VPS, embora tenha sido fortemente reconhecido nas demais amostras. Os antígenos

p50, p70 e p75 estavam presentes em todas as amostras, menos na HV III. Apenas dois antígenos foram amostra-específicos, o de 62 kDa na CN e 67 kDa na LIV IV, reconhecidos somente pelo soro homólogo. Com relação aos demais antígenos, houve uma variação maior entre as amostras. Pode-se observar, ainda, que existe uma diferença quantitativa nos antígenos. As bandas de 33 e 43 kDa foram as que apresentaram a maior variação quantitativa entre as amostras analisadas, como mostra a Fig. 2. As tiras de nitrocelulose reagidas com os soros pré-ímmunes não apresentaram bandas.

## DISCUSSÃO

Muitos laboratórios utilizam o teste de ELISA para o diagnóstico da toxoplasmose humana, por ser um método que apresenta alta sensibilidade e especificidade, de fácil execução, quantitativo, baixo custo, além de poder ser automatizado. A maioria desses testes usa frações antigênicas simples do parasita inteiro<sup>29</sup> ou antígenos solúveis<sup>17,26</sup>. No presente trabalho, a reação foi feita com extrato total de taquizoítos na concentração de 20 µg/ml de proteínas e mostrou uma forte reação contra todos os soros. Tanto os controles da reação quanto os controles dos soros negativos apresentaram reação muito fraca, ficando a D.O. próxima de zero. A repetição das reações homólogas e heterólogas, com resultados praticamente idênticos, indicou a boa qualidade dos antígenos e da técnica utilizados.

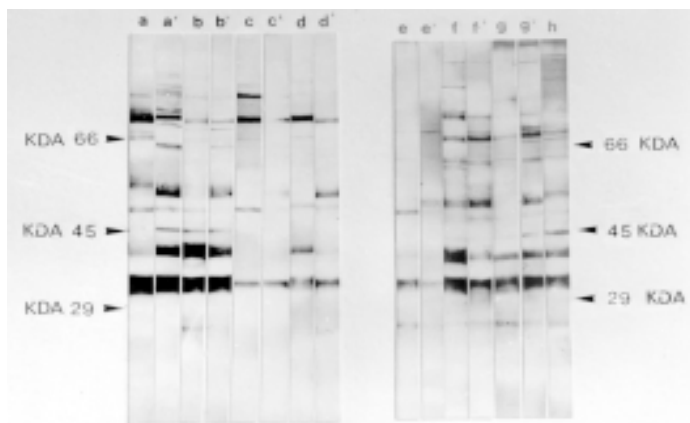
Apesar da alta sensibilidade do teste de ELISA, não foi possível observar diferenças nas reações contra os diversos antígenos, já que as reações heterólogas foram equivalentes, em termos quantitativos, às homólogas. Esses resultados sugerem que diferentes soros reconhecem similarmente várias amostras, conforme obser-

**Tabela 1**

Média das densidades ópticas (D.O.), obtidas no ELISA teste indireto, da reação entre soros hiperímmunes de coelhos inoculados com diferentes amostras de *Toxoplasma gondii* e o extrato celular total dessas amostras, na diluição de 1:16.000, e título final na RIFI - Londrina, 1993.

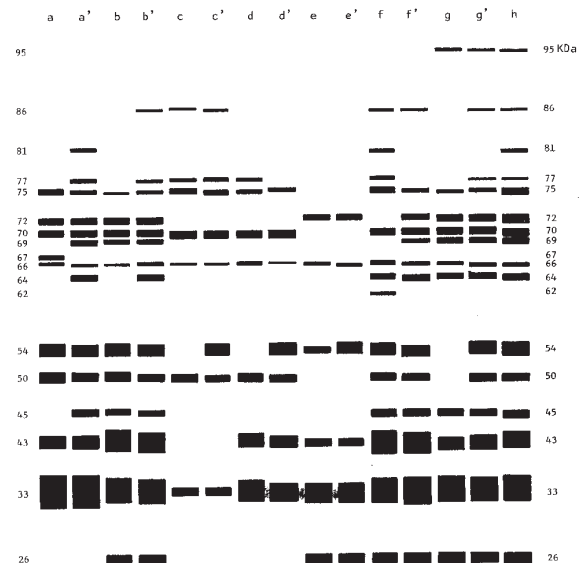
Soros hiperímmunes	Média da D.O. (1:16.000)	RIFI* (Título final)
AS 28	0,213	16.000
S11	0,441	64.000
HV III	0,814	64.000
VPS	0,345	64.000
LIV IV	0,632	64.000
LIV V	1,021	64.000
CN	0,293	32.000
RH	0,568	64.000

\* Reação feita utilizando-se taquizoítos formolizados da amostra RH.



**Figura 2**

Análise de Western blot das amostras LIV IV (a); LIV V (b); VPS (c); S 11 (d); HV III (e); CN (f); AS 28 (g) e RH (h) incubadas com os soros hiperímmunes obtidos de coelhos inoculados experimentalmente com essas amostras. Em a, b, c, d, e, f, g e h, reação com soros homólogos, e em a', b', c', d', e', f' e g', reação com o soro heterólogo anti-RH. A reação foi revelada utilizando-se um conjugado contendo imunoglobulinas de carneiro antiimunoglobulinas G de coelho marcadas com peroxidase. As setas indicam o peso molecular padrão (albumina bovina - 66 kDa; albumina do ovo - 45 kDa; e anidrase carbônica - 29 kDa).



**Figura 3**

Representação esquemática dos antígenos, reconhecidos por imunoglobulinas G de coelhos inoculados com diferentes amostras de *Toxoplasma gondii*, demonstrados através da técnica de Western blot. As oito amostras de *T. gondii* analisadas foram: LIV IV (a), LIV V (b), VPS (c), S 11 (d), HV III (e), CN (f), AS 28 (g) e RH (h). Em a, b, c, d, e, f, g e h, reação com soros hiperímmunes homólogos, e em a', b', c', d', e', f' e g', reação com o soro heterólogo anti-RH. O PM aproximado, em kDa, de cada banda está representado do lado direito e esquerdo da figura.

vado pela homogeneidade das curvas de titulação (Fig. 1) frente às várias amostras. Os resultados obtidos vêm reforçar a observação da existência de antígenos comuns entre as amostras de *T. gondii* isoladas de diferentes espécies animais e de humanos<sup>1,12,23</sup>.

As diferenças encontradas entre as médias dos valores das D.O. na diluição de 1:16.000, entre os soros hiperimunes, provavelmente podem ser atribuídas à variação nos níveis séricos de anticorpos, resultados esses corroborados pelos títulos da RIFI (Tab. 1), para as quais existe uma proporcionalidade entre o título final obtido pela RIFI e a D.O. dos soros. Essas diferenças podem ser atribuídas à variação no hospedeiro ou variação na capacidade das amostras de induzirem a produção de anticorpos.

A técnica de Western blot revelou dois antígenos comuns, a p33 e a p54. O antígeno de peso molecular aproximado de 33 kDa foi o mais abundante, reconhecido pelos soros homólogo e heterólogo em todas as amostras. Este antígeno provavelmente é o mesmo observado por Handman *et al.*<sup>14</sup> com massa molecular de 27 kDa, descrito como o maior antígeno de superfície do taquizoíta e, posteriormente, por Kasper *et al.*<sup>18</sup>, que o estimaram em 3 a 5% do total de proteínas e o denominaram de p30. Essa proteína tem sido estudada por vários pesquisadores e parece importante na indução de uma resposta imune protetora. A p30 pode ser detectada em uma variedade de isolados de *T. gondii* derivados de hospedeiros humanos e animais<sup>30</sup>.

É provável que o antígeno de 54 kDa (52-55), também presente em todas as amostras, seja uma proteína interna, pois Sadak *et al.*<sup>25</sup> descrevem um anticorpo monoclonal que reagiu com uma proteína de 55 kDa de roptria em taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Do mesmo modo, Leriche; Dubremetz<sup>20</sup> também descrevem um antígeno de roptria com 55 kDa. Chardès *et al.*<sup>6</sup> encontraram imunoglobulinas IgA na secreção intestinal que reconheciam um antígeno de roptrias de 55 kDa. Outros autores<sup>8,11,16</sup> caracterizaram um antígeno de 57 kDa secretado e excretado pelo *Toxoplasma gondii*. Esse antígeno de 57 kDa poderia ser o mesmo encontrado nas roptrias e que seria liberado durante a invasão celular. Esta hipótese parece ser bastante interessante e maiores investigações devem ser feitas para se conhecer melhor esta proteína.

Outro antígeno importante foi a p43, que variou de 41 a 45 kDa. Esta proteína foi a segunda mais abundante, reconhecida nas reações homólogas e heterólogas em todas as amostras com exceção da VPS. Inicialmente descrita por Handman *et al.*<sup>14</sup> como de 43 kDa, sendo uma das quatro maiores proteínas de membrana do taquizoíta, foi caracterizada posteriormente por outros autores<sup>6,7,11</sup>.

Esse antígeno é um importante componente da membrana celular do taquizoíta<sup>14</sup>, sendo também encontrado na rede do vacúolo parasitóforo, podendo estar envolvido na penetração celular<sup>2</sup>. Recentemente, Navarro *et al.*<sup>23</sup> demonstraram que essa mesma proteína é reconhecida por soros de gatos infectados experimentalmente, sendo o único antígeno comum às cinco amostras de *T. gondii* analisadas, incluindo a amostra VPS que, no presente trabalho, não foi demonstrado. Essa discrepância de resultados poderia ser devida a uma variação individual do hospedeiro em reconhecer este antígeno.

A amostra HV III foi a que apresentou a maior variação com relação ao perfil antigênico, não apresentando três antígenos (p50, p70 e p75) que estavam presentes nas demais amostras. Esse fato poderia estar relacionado ao tempo de isolamento, visto que essa amostra é uma das isoladas mais recentemente.

As diferenças quantitativas encontradas (principalmente nos antígenos p33 e p43) também foram observadas por Ware; Kasper<sup>30</sup> e por De La Cruz *et al.*<sup>12</sup>. Estes últimos sugeriram que tais diferenças poderiam ser devidas a uma variação na indução da expressão desses antígenos pelos hospedeiros ou influenciadas pela manipulação laboratorial.

Os resultados obtidos na análise de Western blot demonstraram algumas diferenças na composição antigênica, concordando com os dados obtidos por Ware; Kasper<sup>30</sup> e De La Cruz *et al.*<sup>12</sup>. Do mesmo modo, Weiss *et al.*<sup>31</sup> observaram que soros de pacientes com AIDS reconheceram de forma variada diferentes amostras analisadas. Beckner da Silva *et al.*<sup>1</sup> também observaram diferenças na análise por Western blot de soros de suínos infectados experimentalmente, e Navarro *et al.*<sup>23</sup> obtiveram resultados semelhantes em gatos. Neste caso não foi possível determinar nenhum antígeno amostra-específico.

## CONCLUSÕES

Com bases nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1) a metodologia empregada no teste de ELISA mostrou-se de alta sensibilidade e especificidade, vantagens que podem ser adicionadas à simplicidade em se obterem antígenos de alta qualidade;
- 2) a análise por Western blot revelou que os antígenos p33, p54 e p66 são comuns a todas as amostras;
- 3) a amostra HV III foi a que mais diferiu no perfil antigênico, não revelando três bandas, de 50, 70 e 75 kDa, presentes nas demais amostras;
- 4) apenas dois antígenos foram amostra-específicos, 62 kDa da CN e 67 kDa da LIV IV.

## SUMMARY

Eight *Toxoplasma gondii* strains were analyzed using ELISA and Western blot techniques, in order to demonstrate possible immunological differences. The analyzed strains were: LIV IV, LIV V and S 11 isolated from swine, RH and VPS from a human being, AS 28 from a wild mouse, HV III from a dog and CN from a cat. With the ELISA assay the eight strains showed similar reactivity with homologous and heterologous sera. The antigenic suspension, consisting of total cellular extract of tachyzoites, was effective in the indirect ELISA assay, with the positive sera reacting strongly and the negative not reacting with the antigens. The Western blot analysis showed that the *T. gondii* strains have similar antigenic profiles with a few variations. Three bands were observed in all strains: one of about 33 kDa (p33), another of 54 kDa (p54) and a third one of 66 kDa (p66). The HV III strain, isolated from a dog, did not show three antigens (50, 70 and 75 kDa) that were present in the others. However, this difference was not detected by the ELISA assay. Only two antigens (62 kDa of the CN and 67 kDa of the LIV IV) were strain-specific antigens.

**UNITERMS:** *Toxoplasma gondii*; Antigens; Western blot; ELISA indirect test.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BECKNER DA SILVA, A.C.; MITSUKA, R.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; JANKEVICIUS, S.I.; VIDOTTO, O.; JANKEVICIUS, J.V. Avaliação pela imunofluorescência indireta dos aspectos imunogênicos e antigênicos de diferentes amostras de *Toxoplasma Gondii* inoculadas em suínos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.3, n.1, p.17-22, 1994.
- 2- BONHOMME, A.; BOULANGER, F.; BHARADWAJ, L.M.; PUYGAUTHIER-TOUBAS, D.; BONHOMME, P.; PLUOT, M.; PINON, J.M. *Toxoplasma gondii*: Immunocytochemistry of four immunodominant antigens with monoclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, v.71, n.4, p.439-51, 1990.
- 3- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.7, p.248-54, 1976.
- 4- CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, p.143-171, 1973.
- 5- 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. **Infection and Immunity**, v.21, n.1, p.55-8, 1978.
- 6- CHARDÈS, T.; BOURGUIN, I.; MEVELEC, M.N.; DUBREMETZ, J.F.; BOUT, D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. **Infection and Immunity**, v.58, n.5, p.1240-6, 1990.
- 7- COUVREUR, G.; SADAK, A.; FORTIER, B.; DUBREMETZ, J.F. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v.97, part 1, p.1-10, 1988.
- 8- DARCY, F.; DESLEE, D.; SANTORO, F.; CHARIF, H.; AURIAULT, C.; DECOSTER, A.; DUQUESNE, V.; CAPRON, A. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v.10, n.5, p.553-67, 1988.
- 9- DARDE, M.L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrilamid gels. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.39, n.6, p.551-8, 1988.
- 10- DEANE, M.P.; SOGORB, S.; JAMRA, L.F.; GUIMARÃES, E.C. On the gametogonic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.13, n.2, p.110-3, 1971.
- 11- DECOSTER, A.; DARCY, F.; CAPRON, A. Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. **Clinical Experimental Immunology**, v.73, n.3, p.376-82, 1988.
- 12- DE LA CRUZ, A.A.; DREESEN, D.W.; EVANS, D.L. Western blot analysis and LD50 determinations of *Toxoplasma gondii* isolates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.23, n.3/4, p.355-64, 1989.
- 13- DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. **Journal of Parasitology**, v.59, n.3, p.505-12, 1973.
- 14- HANDMAN, E.; GODING, I.W.; REMINGTON, J.S. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v.124, n.6, p.2578-83, 1980.
- 15- HARBOE, A.; ERICHSEN. A comparative study of the length of the parasite of four strains of *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v.37, p.31, 1955.
- 16- HASSL, A.; AUER, H.; HERMENTIN, K.; PICHER, O.; ASPÖCK, H. Experimental study on circulating antigen of *Toxoplasma gondii* in intermediate host criteria for detection and structural properties. **Zentralblatt fuer Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene series A**, v.263, n.4, p.625-34, 1987.
- 17- HUGHES, H.P.A.; VAN KNAPEN, F. Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. **Journal of Parasitology**, v.12, n.5, p.433-7, 1982.
- 18- KASPER, L.H.; CRABB, J.H.; PFEFFERKORN, E.R. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. **Journal of Immunology**, v.130, n.5, p.2407-12, 1983.
- 19- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage  $\tau$ . **Nature**, v.227, n.259, p.680-5, 1970.
- 20- LERICHE, M.A.; DUBREMETZ, J.F. Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.45, n.2, p.249-60, 1991.
- 21- MARTINS, M.C.; SILVEIRA, C.; JAMRA, L.F.; BARROS, P.M.; BELFORT Jr., R.; RIQUEIRO, M.P.; NEVES, R.N. Isolamento de *Toxoplasma gondii* de carnes e derivados e olhos humanos, provenientes de região endêmica de toxoplasmose ocular- Erechim-RS. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.53, n.2, p.60-6, 1990.
- 22- MINEO, J.R.; CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W. Enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v.27, n.2, p.283-7, 1980.
- 23- NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; BECKNER DA SILVA, A.C.; MITSUKA, R.; JANKEVICIUS, J.V.; SHIDA, P.N.; CORTÊS, J.A. Comportamento imunológico e antigênico de cinco amostras de *Toxoplasma gondii* inoculadas em gatos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.28, n.3, p.453-9, 1998.
- 24- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalites in children. **Journal of the American Medical Association**, v.116, p.801-7, 1941.
- 25- SADAK, A.; TAGHY, Z.; FORTIER, B.; DUBREMETZ, J.F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.29, n.2/3, p.203-11, 1988.
- 26- TOMASI, J.P.; SCHILIT, A.F.; STADTSBAEDER, S. Rapid double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human immunoglobulin M anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v.24, n.5, p.849-50, 1986.
- 27- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Biotechnology**, v.24, p.145-9, 1992.
- 28- TUDURY, E.A.; VIOTTI, N.M.A.; BRACARENSE, L. Diferentes quadros neurológicos provocados pelo *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) em 5 cães e 1 gato. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 46., São Paulo, 1991. **Anais**, p.31.
- 29- VERHOFSTEDE, C.; SABBE, L.; VAN RENTERGHEM, L. Ability of the enzyme linked immunosorbent assay to detect early immunoglobulin G antibodies to *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Clinical Microbiology**, v.6, n.2, p.147-51, 1987.
- 30- WARE, P.L.; KASPER, L.H. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.55, n.3, p.778-83, 1987.
- 31- WEISS, L.M.; UDEM, S.A.; TANOWITH, H.; WITTNER, M. Western blot analysis of the antibody response of patients with AIDS and Toxoplasma encephalites: antigenic diversity among *Toxoplasma* strains. **Journal of Infectious Diseases**, v.157, n.1, p.7-13, 1988.

Received: 21/11/1995  
Accepted: 04/12/1997