

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS EM CAPRINOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM TAQUÍZOITOS DA CEPA C4 DE *TOXOPLASMA GONDII* NICOLLE & MANCEAUX, 1909 (APICOMPLEXA:SARCOCYSTIDAE).

R. W. A. VITOR¹, M. T. BAHIA¹ & C. A. CHIARI¹.

(1) Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Caixa Postal 486, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG - Brasil.

SUMÁRIO: Amostras de soros de 17 cabras adultas inoculadas pela via subcutânea com taquízoitos da cepa C4 de *Toxoplasma gondii* foram avaliadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta. Treze cabras não tiveram anticorpos anti-*T. gondii* antes do inóculo, quatro cabras não gestantes (Grupo 1) e nove gestantes (Grupo 2). Quatro cabras já apresentavam anticorpos anti-*T. gondii* antes do inóculo, duas cabras não gestantes (Grupo 3) e duas gestantes (Grupo 4). Os animais foram acompanhados até a 17^a semana após a inoculação. As curvas de anticorpos dos Grupos 1 e 2 foram semelhantes com viragem sorológica na 1^a ou 2^a semana após a inoculação seguida de elevação significativa e títulos estacionados até o final do acompanhamento. Os animais dos Grupos 3 e 4 também apresentaram elevação de títulos após a infecção experimental. Anticorpos anti-*T. gondii* também foram detectados em líquidos cavitários de fetos abortados por cabras gestantes inoculadas onde o exame sorológico pode auxiliar na confirmação de aborto como consequência da toxoplasmose.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, caprinos, Reação de Imunofluorescência Indireta, toxoplasmose experimental, aborto.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose caprina tem sido responsabilizada por perdas econômicas em consequência de abortos e crias debilitadas (Mc SPORRAN *et alii*, 1985; SKINER *et alii*, 1990 e SAMAD, 1992). A evolução dos níveis de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos tem sido estudada utilizando diferentes técnicas sorológicas em animais inoculados experimentalmente (BOTROS *et alii*, 1976; CHHABRA *et alii* 1982 e DUBEY *et alii*, 1985) ou naturalmente infectados (CHIARI *et alii*, 1986).

Em ovinos, foi observado que os níveis de anticorpos anti-*T. gondii* em líquidos cavitários de fetos abortados por ovelhas inoculadas experimentalmente com o parasita eram comparáveis aos níveis séricos (HUNTER *et alii*, 1982), tendo sido observado também que a detecção de anticorpos em fetos foi mais eficiente que o isolamento do parasita. Da mesma maneira, DUBEY e KIRKBRIDE (1984) encontraram anticorpos anti-*T. gondii* no líquido cavitário em 15 dos 16 fetos abortados por esta mesma espécie naturalmente infectada.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os níveis séricos de anticorpos anti-*T. gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em cabras inoculadas experimentalmente e pesquisar anticorpos anti-*T. gondii* em líquidos cavitários de fetos abortados por estes animais como avaliação auxiliar da toxoplasmose congênita em caprinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezessete cabras sem raça definida mantidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais, em baias de piso ripado suspenso foram inoculadas com 10⁷ taquízoitos da cepa C4 do *T. gondii* pela via subcutânea. A cepa C4, de virulência moderada para camundongos, foi isolada de um cão necropsiado em 1972 no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e mantida por passagens sucessivas em camundongos.

Foram inoculadas treze cabras não reagentes pela RIFI antes da infecção sendo quatro não gestantes (Grupo 1) e nove gestantes (Grupo 2). Também foram inoculadas quatro

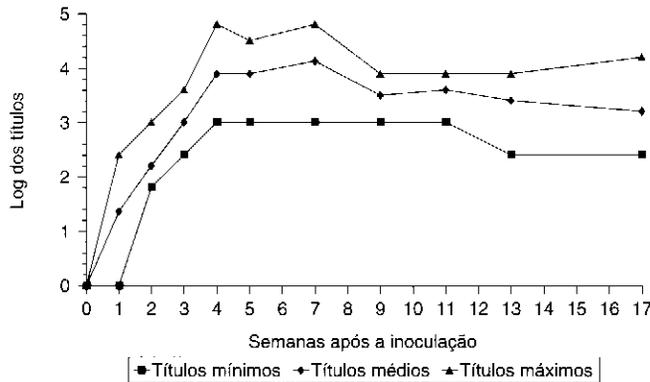


Fig.1. Logaritmo dos títulos mínimos, médios e máximos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta em quatro cabras não prenhes inoculadas experimentalmente.

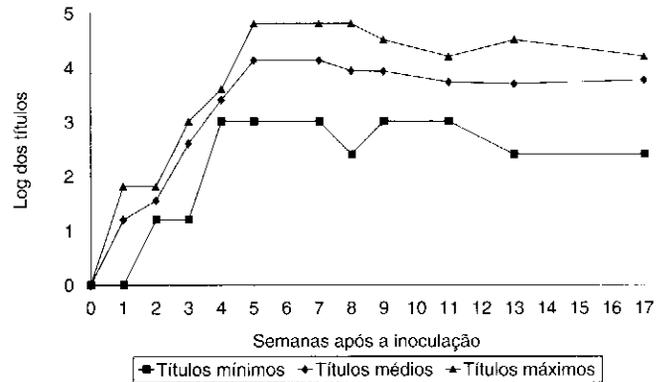


Fig.2. Logaritmo dos títulos mínimos, médios e máximos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta em nove cabras prenhes inoculadas experimentalmente.

Tabela 1 - Títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta em líquidos cavitários de fetos abortados por cabras inoculadas experimentalmente.

Número do feto	Líquido torácico	Líquido pericárdico	Líquido peritoneal	<i>T. gondii</i> nos tecidos
1	1:64	< 1:16	1:64	-
2	1:8192	1:8192	1:8192	+
3	NC	< 1:16	NC	-
4	1:64	NC	NC	+
5	NC	NC	1:16	+
6	1:256	< 1:16	1:16	+
7	< 1:16	NC	< 1:16	-
8	NC	1:64	NC	-
9	< 1:16	NC	NC	+
10	< 1:16	NC	NC	-

NC. Não coletado

Presença (+) e ausência (-) de *T. gondii*.

cabras reagentes pela RIFI (infecção natural) antes da infecção experimental, duas não gestantes (Grupo 3) e duas gestantes (Grupo 4). Três cabras não inoculadas foram acompanhadas como controle, sendo duas gestantes e uma não gestante. Os animais foram acompanhados por um período de 17 semanas após a inoculação. Uma das cabras inoculadas foi acompanhada durante duas gestações sucessivas quando também foram pesquisados anticorpos anti-*T. gondii* no leite e em amostras de soro do filhote antes e após a ingestão do colostro. Também foram avaliadas amostras de líquidos cavitários (líquido torácico, pericárdico e peritoneal) porventura encontrados em fetos abortados pelas cabras gestantes inoculadas experimentalmente.

Para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, as amostras de soros de cabras inoculadas e líquidos cavitários foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), conforme descrição prévia (CHIARI *et alii*, 1985), utilizando conjugado anti-gamaglobulina total de caprino

marcada com isotiocianato de fluoresceína (relação fluoresceína /proteína = 9). Os soros foram avaliados à partir de 1:16 utilizando fator 4 de diluição.

Fragmentos de tecidos dos fetos abortados foram inoculados em camundongos normais para pesquisa do *T. gondii*, de acordo com metodologia descrita por JACOBS *et alii* (1960).

RESULTADOS

As 17 cabras inoculadas foram divididas em quatro grupos para estudo da evolução dos níveis de anticorpos anti-*T. gondii*. Os gráficos destes quatro grupos foram elaborados utilizando a média dos títulos (em logaritmo) além dos valores máximos e mínimos para cada grupo em cada semana de avaliação.

No acompanhamento da curva média do Grupo 1 observou-se que os animais passaram a apresentar resultados positivos para *T. gondii* entre a 1^a e a 2^a SAI, alcançando títulos máximos entre a 4^a e a 7^a SAI (Fig. 1). À partir da 9^a semana foi observada uma queda lenta, atingindo os níveis mais baixos na 17^a SAI, última semana de acompanhamento. A evolução da curva sorológica média do Grupo 2 (Fig. 2) mostrou também que os animais passaram a ser positivos entre a 1^a e a 2^a SAI seguido de elevação significativa, atingindo títulos máximos entre a 5^a e a 9^a semana e títulos estacionados até o final do acompanhamento. Os níveis médios de anticorpos anti-*T. gondii* nas cabras do Grupo 3 evoluíram apenas discretamente com ligeira elevação na 5^a SAI (Fig. 3). As duas cabras gestantes e reagentes pela RIFI antes do inóculo experimental (Grupo 4) apresentaram elevação significativa dos níveis de anticorpos anti-*T. gondii* com títulos máximos na 5^a SAI e oscilando de forma irregular até o final do acompanhamento (Fig. 4). As três cabras normais não inoculadas tiveram sorologia negativa durante todo o período de observação.

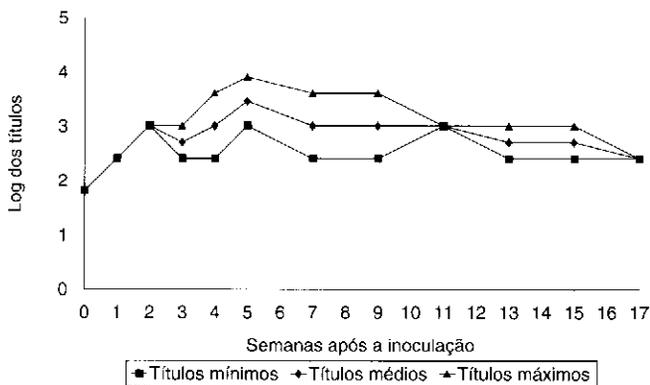


Fig.3. Logaritmo dos títulos mínimos, médios e máximos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta em duas cabras não prenhes portadoras e reinoculadas experimentalmente.

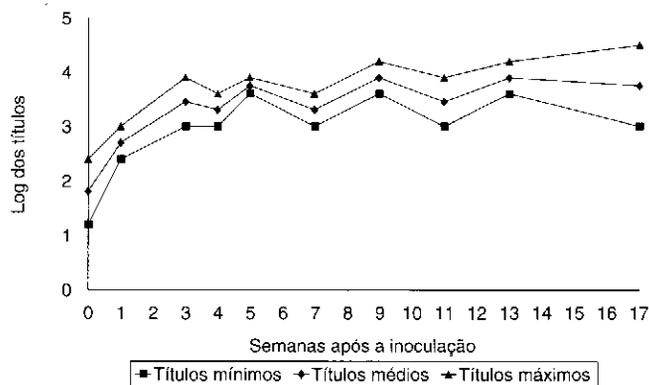


Fig.4. Logaritmo dos títulos mínimos, médios e máximos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta em duas cabras prenhes portadoras e reinoculadas experimentalmente.

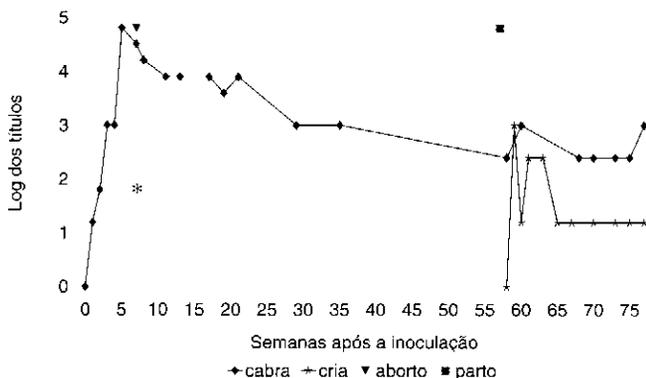


Fig.5. Logaritmo dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta em uma cabra inoculada experimentalmente e em suas crias.

A curva sorológica do animal gestante acompanhado por duas gestações sucessivas é observada na Fig. 5. A primeira gestação resultou em aborto, provavelmente devido ao *T. gondii* (título 1:64 nos líquidos torácico e peritoneal do feto). A segunda gestação resultou em um parto normal e em cria negativa ao RIFI, com elevação dos níveis de anticorpos específicos após a ingestão do colostro e retornando à níveis mínimos após 8 semanas de vida. Os níveis de anticorpos anti-*T. gondii* no leite desta cabra estavam próximos a 1:8192 no dia do segundo parto declinando a seguir e oscilando entre 1:16 e 1:64 até a 77^a SAI.

Os resultados da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de líquidos cavitários dos dez fetos abortados por cabras inoculadas experimentalmente e a pesquisa de parasitas nos tecidos fetais estão apresentados na Tabela 1. Pela pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, foram observados seis fetos com títulos $\geq 1:16$, enquanto na pesquisa de parasitas encontrou-se cinco fetos infectados. Na

combinação dos dois métodos foi possível evidenciar a transmissão congênita em sete dos dez fetos abortados.

DISCUSSÃO

Entre possíveis marcadores para diferenciação entre fase aguda e crônica na toxoplasmose caprina estaria o estudo da evolução dos níveis de anticorpos específicos. A viragem sorológica seria o principal marcador da primo infecção conforme observado em todos os animais dos Grupos 1 e 2. A ocorrência de níveis elevados de anticorpos anti-*T. gondii* como observado nestes Grupos até a 17^a SAI, devido à primo infecção também seria um forte indicativo de fase aguda de infecção (Fig. 1 e 2). Entretanto alguns animais nesta fase de infecção tiveram títulos baixos, indicando que mesmo na fase inicial de infecção é comum se observar níveis baixos de anticorpos anti-*T. gondii* detectados pela RIFI. Os resultados observados por DUBEY *et alii* (1985) demonstram que a ocorrência de títulos baixos ou elevados pode persistir por períodos prolongados de tempo independente da fase de infecção em que o animal se encontra. Ainda nas Fig. 1 e 2 fica claro que o período de gestação não interferiu na evolução dos níveis de anticorpos onde o perfil da curva foi semelhante em ambos os grupos. A elevação dos níveis de anticorpos específicos em animais que já apresentavam anticorpos anti-*T. gondii* (Grupos 3 e 4) sugere a possibilidade da ocorrência de reinfeção após inoculação experimental.

A presença de anticorpos anti-*T. gondii* em líquidos cavitários do feto abortado (primeira gestação) por uma cabra acompanhada em duas gestações sugere a ocorrência de transmissão congênita e resposta do sistema imune do feto no momento da infecção (Fig. 5). Na segunda gestação, a ausência destes anticorpos no filhote indica que não ocorreu transmissão congênita. A elevação súbita nos níveis

destas imunoglobulinas ocorreu provavelmente devido à aquisição passiva de anticorpos após a ingestão do colostro. A utilização de líquidos cavitários de fetos abortados por ovelhas para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* já foi demonstrada (HUNTER *et alii*, 1982; DUBEY e KIRKBRIDE, 1984). Também no presente trabalho este procedimento pode ser utilizado como alternativa para a confirmação de suspeita de toxoplasmose congênita em caprinos, pois em sete dos dez fetos abortados houve concordância entre o resultado sorológico e parasitológico. Por outro lado, a pesquisa de parasitas por inoculação em camundongos ou cultura de células tem sido um método extremamente demorado e dispendioso (DEROUIN *et alii*, 1987) podendo apresentar resultados falso negativos caso o feto abortado tenha um quadro de adiantada putrefação. A pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em líquidos cavitários de fetos abortados por caprinos pode portanto ser considerada como um método importante na confirmação da suspeita de infecção congênita pelo parasita.

SUMMARY

Serum samples from seventeen goats inoculated with *Toxoplasma gondii* were analyzed using the indirect immunofluorescent antibody test. Thirteen goats serologically negative to *T. gondii* (four non pregnant goats - Group 1, and nine pregnant goats - Group 2) and four goats serologically positive to *T. gondii* (two non pregnant goats - Group 3, and two pregnant goats - Group 4) were observed for 17 weeks after inoculation. Seroconversion was shown within one or two weeks after inoculation for groups 1 and 2 and high titers in serum samples were observed until 17 weeks after inoculation. Anti-*T. gondii* antibodies raised in blood sera for Groups 3 and 4. Pregnant goats aborted and specific antibodies were detected in body fluids of the fetuses. Serologic examination of the fetus can aid diagnosis of abortion due to toxoplasmosis.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*, goats, indirect immunofluorescent antibody test, experimental toxoplasmosis, abortion.

REFERÊNCIAS

BOTROS, B. A. M.; MOCH, R. W.; BARSOUM, I. S.; KERKOR, M. E.; HANNA, S. M. & MAHMOUD, A. H. (1976) Some clinical and immunological observations on domestic animals experimentally infected with toxoplasmosis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 6: 83-94.

CHHABRA, M. B.; MAHAJAN, S. K.; GUPTA, S. L. & GAUTAM, O. P. (1982) Experimental toxoplasmosis in pregnant goats. *Indian Journal of Animal Science*, 52: 661-664.

CHIARI, C. A.; LIMA, J. D. & ANTUNES, C.M.F. (1985) Reações de Imunofluorescência Indireta e de Sabin Feldman na pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de caprinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 37: 121-129.

CHIARI, C. A.; LIMA, J. D. & LIMA, W. S. (1986) Anticorpos circulantes em caprinos naturalmente infectados pelo *Toxoplasma gondii*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 38: 889-898.

DEROUIN, F.; MAZERON, M.C. & GARIN, Y.J.F. (1987) Comparative study of tissue culture and mouse inoculations methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 1597-2000.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G.; ANTUNES, F. & McDONALD, C. (1985) Serological diagnosis in experimentally infected pregnant goats and transplacentally infected kids. *American Journal of Veterinary Research* 46: 1137-1140.

DUBEY, J. P. & KIRKBRIDE, C. A. (1984) Epizootics of ovine abortion due to toxoplasmosis in north central United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184: 657-660.

HUNTER, D.; CHADWICK, P.; BALFOUR, A. H.; BRIDGES, J. B. (1982) Examination of ovine foetal fluid for antibodies to *Toxoplasma gondii* by the dye test and an indirect immunofluorescence test specific for IgM. *British Veterinary Journal*, 138: 29-34.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. P. & MELTON, M. L. (1960) The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, 46: 11-21.

McSPORRAN, K. D.; McCAUGHAN, C. CURRAL, J. H. S. & DEMSTEEGT, A. (1985) Toxoplasmosis in goats. *New Zealand Veterinary Journal*, 33: 39-40.

SAMAD, M. A. (1992) Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* associated with abnormal reproduction in Black bengal goats. *Preventive Veterinary Medicine*, 13: 217-220.

SKINNER, L. J.; TIMPERLEY, A. C.; WIGHTMAN, D.; CHATTERTON, J. M. W. & HO-YEN, D. O. (1990) Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goat owner's family. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 22: 359-361.

(Received 18 March 1994, Accepted 21 June 1994)