

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE SORO E PLASMA NA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* PELA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA-PR, 1996

ITALMAR TEODORICO NAVARRO¹
ROBERTA LEMOS FREIRE¹
ODILON VIDOTTO¹
LIZA OGAWA²
FLORA SATIKO KANO²

NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; OGAWA, L.; KANO, F.S. Estudo comparativo entre soro e plasma na pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pela técnica de imunofluorescência indireta em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, 1996. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v. 18, n. 1, p. 15-21, mar. 1997.

RESUMO: Com o objetivo de verificar a utilização do plasma como material alternativo para análise de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, foram colhidas 312 amostras de plasma canino e, destas 85 colhidas com seu soro equivalente para posterior comparação através da imunofluorescência indireta (IFI). Os animais foram agrupados quanto a raça, idade, alimentação e sexo. Resultou em 73 (23,40%) reagentes, e destes: 28 (38,36%) tinham raça definida e 45 (61,64%) sem raça definida; animais na faixa etária de um a sete anos apresentaram maior proporção de positivos; 18 (24,66%) eram alimentados com ração e 55 (73,34%) com comida caseira; e ainda 39 (53,42%) eram fêmeas e 34 (46,58%) machos. A análise estatística observou-se diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação a raça, idade e alimentação dos animais estudados. Das 85 amostras de soro e plasma, 81 (95,30%) foram equivalentes quanto ao título resultado (positivo ou negativo). À análise estatística comparativa entre soro e plasma equivalentes, foi observada concordância quase perfeita pelo teste de Kappa ($k=0,917$), sugerindo que o plasma pode ser utilizado como material alternativo para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, plasma, cães.

1) INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de caráter cosmopolita, causada pelo *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1908). Este coccídeo intestinal de felídeos tem como principal hospedeiro definitivo o gato doméstico, que participa na epidemiologia da infecção como disseminador do parasito no meio. A primeira descrição em cães foi na Itália por MELLO (1910), que relatou nestes animais sinais clínicos de febre, anorexia, vômito e diarreia; no Brasil, foi descrito por CARINI (1911) e CARINI & MACIEL (1913).

DUBEY (1986) estabelece três vias primárias de transmissão do *T. gondii*: congênita, carnivorismo e fecal-oral. Os cães podem se infectar através da ingestão de oocistos em alimentos, água e solo

contaminados e, principalmente, através da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos com bradizoítas viáveis.

A infecção no cão, na maioria dos casos, é de evolução crônica e de difícil diagnóstico, pois muitos não apresentam sintomatologia. Porém, quando em situações imunossupressoras, como a cinomose, a infecção torna-se mais grave (DUBEY, 1985; SVOBODA & SVOBODOVÁ, 1987).

Os sinais clínicos da infecção toxoplásmica em cães são freqüentemente caracterizados por distúrbios respiratórios, diarreia e ataxia (PIMENTA et al., 1993). Hepatoesplenomegalia e áreas focais de necrose no fígado, pulmão e cérebro são comuns em animais infectados (SANTOS et al., 1968; COSTA et al., 1978).

Estudos demonstraram a alta prevalência de cães sororeagentes ao *T. gondii*, com índices de 21%

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - CCA/Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina-PR.

² Bolsistas de Iniciação Científica - CNPq/PIBIC, DMVP/CCA/UEL.

(CHAPLIN et al., 1984); 33,33% (LAZZAROTTO et al., 1996); 47,3% (GUIMARÃES et al., 1992); 52,7% (DURAN et al., 1995); 63,8% (ISHIZUKA & YASUDA, 1981); 72% (ISHIZUKA et al., 1974); 75,98% (FREIRE et al., 1992), e 91% (GERMANO et al., 1985).

Em virtude da ausência de dados da resposta imunológica ao *T. gondii* em plasma de cães naturalmente infectados, o presente trabalho tem o objetivo verificar a utilização do plasma como um segundo material para análise de anticorpos contra o parasito através da imunofluorescência indireta e verificar a ocorrência de cães positivos para anticorpos anti-*T. gondii* atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

2) MATERIAL E MÉTODOS

2.1) AMOSTRAGEM

No período de Outubro de 1995 a Fevereiro de 1996, foram colhidas 312 amostras de sangue com anticoagulante EDTA (Etileno Diamino Tetraacético Ácido) de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, e cada amostra era acompanhada de uma ficha com informações epidemiológicas sobre os animais. Destas amostras 85 foram colhidas sem anticoagulante para posterior obtenção do soro, e comparação com seu respectivo plasma.

2.2) TÉCNICA UTILIZADA

Após a separação do plasma ou a retração do coágulo, para os soros, as amostras foram analisadas através da imunofluorescência indireta (IFI), conforme CAMARGO (1973), com a utilização da anti-IgG canina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA) previamente padronizada na diluição de 1:120. A IFI é uma reação que evidencia anticorpos voltados para os antígenos de superfície do *T. gondii*, durante a fase de proliferação e em infecções crônicas sintomáticas ou não.

A obtenção e posterior preparação em lâminas do antígeno utilizado na IFI foi realizada através da manutenção de cepas padrão de *T. gondii* em camundongos albinos jovens, no biotério do departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

Foram consideradas positivas as reações com título igual ou maior que 16, segundo CAMARGO (1973).

2.3) TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram submetidos ao teste do

Qui-Quadrado (X^2), com nível de significância de 5%, segundo GOMES (1987), para verificar possíveis diferenças em relação ao sexo (macho e fêmea), raça (com ou sem raça definida), alimentação (caseira ou ração), e idade (jovens, desde o nascimento até um ano; e adulto, com idade acima de um ano). Para observar a especificidade e sensibilidade entre soro e plasma foi utilizado o teste Kappa (k), segundo KRAMER & FEINSTEIN (1981).

3) RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação entre as 85 amostras de soro e plasma equivalentes, foi verificado que 81 (95,30%) das amostras testadas obtiveram os mesmos resultados no soro e no plasma, enquanto que quatro (4,70%) amostras não demonstraram a mesma resposta (Tabela 1). Sendo que dois (2,35%) foram negativos para pelo menos um dos testes e, outros dois (2,35%) foram positivos em ambos os testes, apenas não equivalentes quanto os títulos de anticorpos obtidos (Tabela 1). Estas diferenças não invalidam a utilização do plasma, pois quando submetidos ao teste do Kappa, os resultados apresentaram uma concordância quase perfeita ($k=0,917$).

Em relação às 312 amostras de plasma, houve 73 (23,40%) cães positivos para anticorpos contra *T. gondii*. As frequências absolutas e relativas das reações, classificadas por título de anticorpos, estão ilustradas na Tabela 2. Os animais foram agrupados quanto a raça, idade, alimentação e sexo.

Dos animais reagentes: 28 (38,36%) tinham raça definida e 45 (61,64%) eram sem raça definida (Tabela 3). Em relação a faixa etária os cães de um a sete anos apresentaram maior proporção de reagentes (Tabela 4). Quanto ao tipo de alimentação 18 (24,66%) eram alimentados com ração e 55 (73,34%) com comida caseira (Tabela 5). Quanto ao sexo 39 (53,42%) eram fêmeas e 34 (46,58%) machos (Tabela 6).

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação aos animais com ou sem raça definida, com uma maior porcentagem de reações positivas para *T. gondii* nos animais sem raça definida. DURAN et al. (1995) explicam que esta diferença pode ser devido ao tipo de tratamento, em geral mais simples, ao qual o animal sem raça definida é submetido e também ao tipo de alimentação.

Houve, ainda, diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação à idade dos animais estudados, sendo que a maior porcentagem de reagentes ocorreu em animais de um a sete anos de idade. Apesar da literatura sugerir uma maior suscetibilidade em animais

jovens (ISHIZUKA et al., 1974; GERMANO et al., 1985; SVOBODA & SVOBODOVÁ, 1987; FREIRE et al., 1992), os resultados, quando estratificados por faixa etária, jovens até um ano de vida e adultos acima de um ano, demonstram esta tendência de positividade crescente a partir dos primeiros meses de vida, visto que quanto maior a idade, maior é o tempo de exposição às possíveis vias de infecção, principalmente a ingestão de cistos presentes na carne, em especial quando crua ou parcialmente cozida.

Esses resultados são confirmados quando os dados sobre o tipo de alimentação dos animais em estudo foram analisados (Tabela 4), visto que os que consumiam comida caseira foram estatisticamente mais prevalentes em relação aos que consumiam apenas ração. Sabemos ainda que os animais que consomem comida caseira não raro consomem algum tipo de carne, sendo esta a principal via de

transmissão do *T. gondii* para os carnívoros e omnívoros (NAVARRO et al., 1992).

Em relação ao sexo não foram observadas diferenças significativas nos reagentes, estando em conformidade com GERMANO et al. (1985), SVOBODA & SVOBODOVÁ (1987), FREIRE et al. (1992), e DURAN et al. (1995), que demonstraram que tanto machos quanto fêmeas estão sujeitos à infecção toxoplásmica.

Concluímos que o plasma, como material alternativo, obtido rotineiramente a nível ambulatorial, serviu perfeitamente para o diagnóstico do *T. gondii* em cães. Os resultados obtidos quando confrontados com a literatura permitem concluir que o *T. gondii*, presente principalmente em cães adultos, e sendo uma importante zoonose, tem como principal via de transmissão a comida caseira, semelhante o que ocorre também com o ser humano adulto.

Tab.1- Recíproca dos títulos de anticorpos (IgG) anti-*Toxoplasma gondii*, obtidos pela imunofluorescência indireta em soro e plasma equivalentes, de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, 1996.

SORO/ PLASMA	NEGATIVO	16	64	256	1024	4096
NEGATIVO	69	01	-	-	-	-
16	01	05	01	-	-	-
64	-	01	01	-	-	-
256	-	-	-	04	-	-
1024	-	-	-	-	-	-
4096	-	-	-	-	-	02

Tab.2- Recíproca dos títulos de anticorpos (IgG) anti-*Toxoplasma gondii*, obtidos pela imunofluorescência indireta em plasma de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, 1996.

TÍTULO DE ANTICORPOS	Nº DE REAÇÕES POSITIVAS	%
16	27	36,98
64	27	36,98
256	6	8,22
1024	6	8,22
4096	7	9,60
TOTAL	73	100

Tab.3- Frequência de cães positivos para anticorpos (IgG) anti-*Toxoplasma gondii*, obtidos pela imunofluorescência indireta em plasma de Cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, segundo a raça, 1996.

PADRÃO RACIAL	Nº DE PLASMAS ANALISADOS	Nº DE PLASMAS POSITIVOS
RAÇA DEFINIDA	162	28 (38,36%)
SEM RAÇA DEFINIDA	150	45 (61,64%)
TOTAL	312	73 (100%)

Tab.4- Frequência de cães positivos para anticorpos (IgG) anti-*Toxoplasma gondii*, obtidos pela imunofluorescência indireta em plasma de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, segundo a idade, 1996.

IDADE (EM ANOS)	Nº DE PLASMAS ANALISADOS	Nº DE PLASMAS POSITIVOS
0—1	156	22 (30,14%)
1—7	119	42 (57,53%)
> 7	37	9 (12,33%)
TOTAL	312	73 (100%)

Tab.5- Frequência de cães positivos para anticorpos (IgG) anti-*Toxoplasma gondii*, obtidos pela imunofluorescência indireta em plasma de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, segundo o tipo de alimentação, 1996.

ALIMENTAÇÃO	Nº DE PLASMAS ANALISADOS	Nº DE PLASMAS POSITIVOS
RAÇÃO	82	18 (24,66 %)
COMIDA CASEIRA	128	55 (73,34%)
TOTAL	312	73 (100%)

Tab.6- Frequência de cães positivos para anticorpos (IgG) anti-*Toxoplasma gondii*, obtidos pela imunofluorescência indireta em plasma de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, segundo o sexo, 1996.

SEXO	Nº DE PLASMAS ANALISADOS	Nº DE PLASMAS POSITIVOS
FÊMEAS	160	39 (53,42%)
MACHOS	152	34 (46,58%)
TOTAL	312	73 (100%)

NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; OGAWA, L.; KANO, F.S. Comparative study between sero and plasma use for antibodies anti-using indirect immunofluorescence assay in dogs seen at the Londrina State University Veterinary Hospital, 1996. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v. 18, n. 1, p. 15-21, Mar. 1997.

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate plasma use as an alternative material for antibodies against *Toxoplasma gondii* analysis. A total of 312 canine plasma samples, whereas 85 samples with equivalent sera were collected for posterior testing and comparison by immunofluorescence assay. The animals were grouped according to the breed, age, diet and sex. There were 73 (23,40%) positive and of the reactor dogs: 28 animals (8,98%) were purebreed dogs, whereas 45 (14,42%) were mongrel dogs; 18 (5,77%) were fed with commercial diets, 34 (10,90%) ate homemade food and 21 (6,73%) ate commercial diets and homemade food. Of the affected dogs, 39 (12,50%) were females and 34 (10,90%) were males. There was significantly statistical difference (P<0,05) among animals breed, age and diet. From 85 sera and plasma samples, 81 (95,30%) were equivalent as to antibody titres. Significant positive correlation between sera and plasma was observed by Kappa test ($k=0,917$), suggesting that plasma can be used as na alternative material.

KEY-WORDS: *Toxoplasma gondii*, plasma, dogs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARGO, M.E. Improved technique of Indirect Immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 6, p.117-118, 1973.
- CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma curiculi*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v.4, p.518-519, 1911.
- CARINI, A.; MACIEL, J. Toxoplasmose naturelle du chien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v.6, p.681-683, 1913.
- CHAPLIN, E.L.; SILVA, N.R.S.; SEBEN, J.C.; ARAÚJO, F.A.P.; MENDEZ, L.D.V. Cadeia epidemiológica da toxoplasmose em Guaporé/RS, relacionando humanos e seus animais domésticos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, v.12, p.25-34, dez.1984.
- COSTA, A.J.; LUCAS, A.; MORAES, F.R.; KLOBUCARIC, A.; PAULILLO, A.C. Contribuição ao estudo da toxoplasmose canina. *O Biológico*, v.54, p.293-297, 1978.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in dogs. *Canine Pract.*, v.12, p.7-28, 1985.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Assoc.*, Chicago, v.189, n.2, p.166-170, 1986.
- DURAN, F.P.; CABRAL, D.D.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.A.O.;

- MINEO, J.R.; SOUZA, M.A. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães clinicamente saudáveis da cidade de Uberlândia-MG. In: SEMINÁRIO BRAS. DE PARASITOL. VET., 9, 1995, Campo Grande-MS. *Anais...* p.228
- FREIRE R.L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; TUDURY, E.A.; VIANNA, C.C. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-Pr. *Semina: Ci.Agr.*, v.13, n.1, p.66-69, 1992.
- GERMANO P.M.; ERBOLATO, E.B.; ISHIZUKA, M.M. Estudo sorológico da toxoplasmose canina, pela prova de imunofluorescência indireta, na cidade de Campinas. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. USP*, v.22, p.53-58, 1985.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 12ed. Piracicaba: USP, 1987. p.497.
- GUIMARÃES, A.M.; RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; CURY, M.C.; SPIEWAK, G. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.44, n.1, p.67-68, 1992.
- ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O. BROGLIATO, D.F. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de cães do município de São Paulo. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v.11, p.115-125, 1974.
- ISHIZUKA, M.M.; YASUDA, P.N. Incidência de infecção por *Toxoplasma gondii* em cães do município de São Paulo. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v.18, n.2, p.161-165, 1981.
- KRAMER, M.S.; FEINSTEIN, A.R. Clinical biostatistics LIV. The biostatistics of concordance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.29, n.1, p.111-123, 1981.
- LAZZAROTTO, J.J.; PITT, G.L.; LAGAGGIO, V.R.A.; FLORES, M.L.; MORAES, R.O.; KATZER, L.H.; CORRÊA, G.L.B.; ADAMY, M. Hemaglutinação passiva para toxoplasmose em cães da região central do RS. In: PANVET- CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande- MS. *Anais...*
- MELLO, V. Un cas de toxoplasmose du chien observé à Turin. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v.6, p.294, 1910.
- NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii*: isolamento de carne e cérebro de suínos. *Semina: Ci.Agr.*, v.1, p.10-15, 1992.
- NICOLLE, C.S.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (on organismes voisins), du *gondii*. *Compt. Rend. Acad. Sc.*, v.147, p.763-766, 1909.
- PIMENTA, A.L.; PIZA, E.T.; CARDOSO, R.B.; DUBEY, J.P. Visceral toxoplasmosis in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.45, p.323-326, 1993.
- SANTOS, J.A.; NOVLOSKI, G.; PEREIRA, E.F.C.; RESENDE, A.M.L. Estudos sobre a incidência e as lesões histopatológicas da toxoplasmose em mamíferos domésticos (cães e coelhos) no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.3, p.275-283, 1968.
- SVOBODA, M.; SVOBODOVÁ, V. Effects of breed, sex, age, management and nutrition on the incidence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs and cats. *Acta. Vet. Brno.*, v.56, p.315-330, 1987.