

CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *TOXOPLASMA GONDII*, PELA TÉCNICA DE “WESTERN BLOTTING”, EM SOROS DE CÃES COM SINAIS CLÍNICOS SUSPEITOS DE TOXOPLASMOSE.

(CHARACTERIZATION OF ANTIGENS OF *TOXOPLASMA GONDII* BY WESTERN BLOTTING IN DOGS SERA PRESENTING CLINICAL SIGNS ASSOCIATED TO TOXOPLASMOSIS)

(CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE *TOXOPLASMA GONDII*, POR LA TÉCNICA DE “WESTERN BLOTTING”, EN SUEROS DE PERROS CON SIGNOS CLÍNICOS SOSPECHOSOS DE TOXOPLASMOSE)

C. R. FRESCHI¹, A. C. HIGA¹, M. TINUCCI COSTA², H. P. PANCRACIO³,
R. Z. MACHADO⁴

RESUMO

Soros de cães (n=28) com resultados concordantes (n=7) e discordantes (n=21) na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* pelas técnicas da RIFI e ELISA-teste foram analisados pelo “Western-blotting”, com o objetivo de caracterizar as bandas protéicas imunodominantes comigrantes. Soros positivos (n=7) diagnosticados pelas duas técnicas revelaram 16 bandas protéicas imunodominantes no antígeno total de *T. gondii*, variando de 220 kDa a 30 kDa. Dentre os 11 soros com padrão de fluorescência polar considerados negativos pela RIFI, porém positivos pelo ELISA-teste, 5 (25%) foram caracterizados como positivos pelo “Western-blotting”. Em relação aos soros considerados negativos pelo ELISA-teste e pela RIFI (n=10), 3 (10,71%) foram considerados positivos pelo “Western-blotting”. A técnica de “Western-blotting” evidenciou a presença de polipeptídeos imunodominantes, sugerindo que diferentes antígenos do *T. gondii* podem ser liberados na fase aguda ou crônica da toxoplasmose canina.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*. ELISA-teste. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). “Western blotting”. Anticorpos.

SUMMARY

The sera of dogs (n=28) presenting similar (n=7) or non-similar (n=21) results for anti-*T. gondii* antibody detection by IFAT and ELISA tests were evaluated by Western Blotting aiming at characterizing the immunodominant co-migrating protein bands. Sera diagnosed as positive (n=7) by both serological tests evidenced 16 immunodominant protein bands in the *T. gondii* antigen, with molecular mass varying from 220 kDa to 30 kDa. From eleven sera considered positive in ELISA test, but showing polar fluorescence patterns considered negative by IFAT, 5 (25%), were characterized as positive in Western-blotting. Among the negative sera tested in both ELISA and IFAT (n=10) tests, three sera (10.71%) were positive in Western Blotting. The Western Blotting technique showed the presence of immunodominant polypeptides, suggesting that different *T. gondii* antigens may be released in the acute or chronic phases of canine toxoplasmosis.

¹ Doutoranda em Clínica Médica Veterinária, Unesp - Jaboticabal - SP.

² Professora Doutora do Departamento de Clínica Cirúrgica Veterinária, Unesp - Jaboticabal - SP.

³ Médica Veterinária Autônoma.

⁴ Médica Veterinária. Professora Titular do Departamento de Patologia Veterinária, Unesp - Jaboticabal - SP. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº. CEP 14884-900. Jaboticabal - SP. E-mail: zacarias@fcav.unesp.br

KEY-WORDS: *Toxoplasma gondii*. ELISA-test. Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT). Western blotting. Antibody.
RESUMEN

Sueros de perros (n=28) con resultados concordantes (n=7) y discordantes (n=21) en la detección de anticuerpos anti-*T. Gondii* por las técnicas de RIFI y ELISA-teste, fueron analizados por medio del “Western-blotting”, con el objetivo de caracterizar las bandas proteicas inmunodominantes comigrantes. Sueros positivos (n=7) diagnosticados por las dos técnicas revelaron 16 bandas proteicas inmunodominantes en el antígeno total de *T. Gondii*, variando de 220 kDa a 30 kDa. Entre los 11 sueros con patrón de fluorescencia polar que fueron considerados negativos por la RIFI, pero positivos por el ELISA-teste, 5 (25%) fueron positivos en el “Western-blotting”. Con relación a los sueros considerados negativos por el ELISA-teste y por la RIFI (n=10), tres (10,71%) fueron considerados positivos pelo “Western-blotting”. La técnica de “Western-blotting” evidenció la presencia de polipéptidos inmunodominantes, sugiriendo que diferentes antígenos de *T. Gondii* pueden ser liberados en la fase aguda o crónica de la toxoplasmosis canina.

PALABRAS-CLAVE: *Toxoplasma gondii*. ELISA-teste. Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (RIFI). “Western blotting”. Anticuerpos.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário, parasito intracelular, que infecta qualquer célula nucleada de hospedeiros vertebrados (HOFF e CARRUTHERS, 2002), incluindo aves e mamíferos (DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000). Foi encontrado pela primeira vez no *Ctenodactylus gondii*, em um roedor norte-africano, por Nicolle e Manceaux e, simultaneamente, por SPLENDORE, em coelho, no Brasil, em 1908. O primeiro caso de toxoplasmose canina foi descrito por Mello (1910), na Itália, e por Carini (1911) no Brasil. A toxoplasmose tem ampla distribuição geográfica, tanto em relação ao homem como aos animais domésticos e silvestres. Os principais sintomas observados, quando o *T. gondii* acomete os cães, estão associados a problemas respiratórios, neurológicos e, eventualmente, digestivos (BOURDEAU, 1993).

As características de alta infectividade e baixa patogenicidade do *Toxoplasma gondii* justificam as pesquisas realizadas para a detecção de níveis de anticorpos, adicionalmente ao exame clínico (ISHIZUKA et al., 1974). A variabilidade dos quadros clínicos, facilmente confundidos com outras doenças com cinomose e hepatite viral canina, por exemplo, vem justificar, também, a importância do diagnóstico sorológico (VIDOTTO, 1992). O primeiro teste sorológico realizado no diagnóstico da Toxoplasmose foi o “dye test”, de Sabin e Feldman, em 1948. Desde então, análises comparativas entre testes sorológicos foram realizadas por vários autores, na tentativa de evidenciar qual o teste mais eficaz no diagnóstico da Toxoplasmose (ISHIZUKA et al., 1974, DUBEY, 1985, LOUGREN et al., 1987, ABATE et al., 1989, WILSON et al., 1990).

A padronização do ELISA-teste indireto, no diagnóstico da toxoplasmose canina, foi realizada por Domingues et al. (1998), que comparou os resultados aos

obtidos na RIFI. O ELISA-teste indireto evidenciou a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em 62,5% (n=169) dos soros testados, enquanto a RIFI apresentou evidenciação de 46,01% (n=127) da mesma amostra. Comparando-se os resultados obtidos pela RIFI e pelo ELISA-teste indireto, pode-se demonstrar que o ELISA-teste tem maior sensibilidade para detectar anticorpos anti-*T. gondii*, obtendo-se 64% de correlação entre as duas técnicas. Entretanto alguns soros podem ter reatividade positiva para o ELISA-teste e não para a RIFI, ou reatividade negativa para ambas as técnicas, embora a sintomatologia clínica observada nos animais indique um quadro de toxoplasmose.

As amostras de *T. gondii* têm sido definidas como de maior ou menor virulência. Seu poder de invasão na célula hospedeira está associado às proteínas de superfície da membrana de taquizoítos, sendo responsável pela fase aguda da doença, enquanto a fase crônica está associada, principalmente, a antígenos excretados/secretados (CHARIF et al., 1990).

Em trabalho realizado por Flausino et al. (1998), amostras acistogênicas do *T. gondii*, comparadas à cepa “C” isolada de um caso humano congênito, foram avaliadas por meio da eletroforese, em gel de poliacrilamida, revelando bandas protéicas distintas entre elas, embora compartilhassem oito polipeptídeos com pesos moleculares aparentemente idênticos (30; 34,7; 43; 50; 58; 67; 80 e 97 kDa). Por meio da análise densiométrica feita nas bandas protéicas, pode-se verificar que havia comigrações compatíveis na eletroforese, existindo, entretanto, diferenças na reatividade de cada banda. Essas variações observadas sugeriram uma possível adaptação do parasita ao hospedeiro. Lappin et al. (1994) mostraram uma variação na detecção de polipeptídeos de *T. gondii* pelo “Western-blotting”, durante o período de inoculação experimental em gatos com 10³ cistos teciduais, sendo analisados os perfis de bandas protéicas nas 2, 3, 4, 8, 12

e 20 semanas pós-inoculação. Os resultados obtidos não demonstram claramente vantagem de um teste sobre o outro na comparação de reatividade do “Western-blotting” e ELISA-teste, para as classes de imunoglobulinas IgM e IgG, quando utilizado um antígeno único ao invés de antígenos múltiplos no diagnóstico de infecção recente. Villavedra et. al. (1998) demonstraram que a resposta imune humoral (IgG) contra o *T. gondii* na fase cística inicia-se precocemente na fase aguda, e a reatividade de anticorpos é forte contra antígenos de diferentes pesos moleculares. Seis bandas (82 kDa a 151 kDa) foram exclusivamente reconhecidas por soros da fase crônica, mas somente a banda de 132 kDa foi positiva em mais de 50% dos soros analisados. Antígenos reconhecidos por soros de fase aguda e fase crônica estão localizados em quatro grupos de 20-24 kDa; 34-39 kDa; 58-80 kDa e 105-130 kDa e, ainda, em dois antígenos adicionais de 18 kDa e 29 kDa. Pacientes infectados por *T. gondii* mostraram fraca resposta específica contra antígenos de cistos teciduais.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou caracterizar antígenos de *Toxoplasma gondii* pela técnica de “Western-blotting”, em soros de cães com reatividade negativa pela RIFI e reatividade positiva no ELISA-teste indireto, ou não reagentes a ambos os testes, mas com sintomatologia clínica compatível com a toxoplasmose canina.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do antígeno de *Toxoplasma gondii*

A amostra de *T. gondii* (cepa-N), existente no laboratório de Parasitologia Veterinária da FCAV/UNESP-Campus de Jaboticabal, foi gentilmente cedida pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, e mantida através de passagens sucessivas em camundongos *Mus musculus*, provenientes do Biotério Central da UNESP. A suspensão de taquizoítos foi obtida segundo Camargo (1973), porém com pequenas modificações. Essa suspensão foi filtrada em coluna compacta de náilon estéril, o que possibilitou a obtenção de uma suspensão de parasitas purificada. A suspensão de taquizoítos (10^7 - 10^8 /mL), em solução salina 0,85%, foi submetida a sete ciclos de congelamento à temperatura de -70 °C e descongelamento a 37 °C, em banho-maria, e sonificado em 3 ciclos de 1 minuto cada. A suspensão final foi centrifugada a 12.000 xg, por uma hora, à temperatura de 5 °C, e o sobrenadante recolhido, alicotizado e armazenado a -20 °C até o momento do uso. A concentração protéica do antígeno solúvel foi determinada pelo método de Hartree (1972).

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA-teste indireto

A RIFI utilizada para a detecção de anticorpos anti-

T. gondii, em soros de cães, foi realizada conforme descrito por Domingues et al. (1998). Foi utilizado como conjugado uma IgG de carneiro anti-IgG de cão, acoplada ao Isotiocianato de Fluoresceína (Affinity Purified Antibody to Dog IgG (g). N° 02-19-02. Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.), utilizado na diluição de 1:20 em solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2 (PBS), contendo Azul de Evans a 0,01%. Aos soros analisados na diluição única de 1:40 foram atribuídos escores de intensidade de fluorescência, distribuídos da seguinte forma: positivo fraco (1), médio (2) e forte (3), e os não reativos ou com fluorescência polar (0).

Na realização do ELISA-teste indireto, a concentração de antígeno (10 µg/mL) no preparo das placas, diluição dos soros (1:200), lavagens e incubação foi a mesma descrita por Domingues et al. (1998). Como conjugado foi empregada uma g - globulina de coelho anti-IgG de cão, acoplada à fosfatase alcalina (Sigma Immuno Chemicals Anti-dog IgG A-6042), na diluição 1:9000. A reatividade sérica foi analisada em termos de nível de ELISA (NE) de 0 a 9 (DOMINGUES et al., 1998).

Soros-controle e testes

Soros-controle negativos (n=5) foram obtidos de cães, SRDs, criados e mantidos no canil do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HVGLN)-Jaboticabal/UNESP. Os soros-teste (n=28), gentilmente cedidos por Domingues et al. (1998), pertenciam a uma amostra inicial de duzentos e setenta e seis soros utilizados na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* através das técnicas sorológicas RIFI e ELISA-teste. Vinte e um soros oriundos de animais com sintomatologia compatível com a toxoplasmose apresentavam resultados divergentes pelas técnicas de RIFI e ELISA-teste. Os soros-teste foram divididos da seguinte forma: **1-** soros positivos pelas técnicas de ELISA-teste e RIFI (n=7); **2-** soros positivos pela técnica de ELISA-teste e com padrão de fluorescência polar pela RIFI, considerados negativos (n=11); **3-** soros negativos por ambas as técnicas, ELISA-teste e RIFI (n=10).

“Western blotting”

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 12%, como descrito por Laemmli (1970). Em cada cavidade foram colocados 50 mg do antígeno de *T. gondii* e 8 mL de padrão de alto peso molecular (Amersham-Rainbow). A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (0,45mm) obedeceu à técnica preconizada por Towbin et al. (1979). Após o término da transferência, as tiras de papel de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de TBS-Tween (0,1 M Tris; 1,5 M NaCl; 0,5% Tween 20 – pH8) com leite em pó desnatado (MOLICO) (5%), por 3 horas, e incubadas com os soros-teste sob agitação constante por 6 a 8 horas, na diluição de 1:100. As tiras foram lavadas com solução de TBS-Tween e leite

em pó desnatado, por 10 minutos, e duas vezes com TBS-Tween, sem leite, por cinco minutos cada. Os anticorpos presentes nas cavidades foram detectados com IgG de coelho anti-IgG de cão, acoplado à Fosfatase Alcalina (SIGMA: 162-0115), com diluição de 1:10.000, por 90 minutos. Novamente foram realizadas três lavagens com solução de TBS-Tween com intervalos de 5 minutos cada. As tiras foram incubadas em temperatura ambiente com 0,22% de Nitroblue tetrazolium e 0,17% de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (NBT-BCIP) para a revelação, como descrito por Blake et al. (1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sinais clínicos de toxoplasmose canina estão associados com problemas respiratórios, neurológicos e eventualmente digestivos (BOURDEAU, 1993). No entanto, a confirmação da suspeita clínica deve ser feita por métodos diretos ou indiretos de detecção do parasita. Em um estudo realizado por Domingues et al. (1998), a frequência de anticorpos anti- *T. gondii*, em soros de cães suspeitos clinicamente de toxoplasmose, revelou soros positivos pelo ELISA-teste e RIFI, com nível de ELISA (NE) > 5 e log de diluição sérica entre 1,5 – 3,0, respectivamente. Todavia alguns animais com sinais clínicos sugestivos de doença aguda apresentaram resultados sorológicos conflitantes seja pela RIFI, seja pelo ELISA-teste, seja por ambos. Dentre os 28 soros de cães sob estudo e divididos em três grupos para a caracterização de polipeptídeos de *T. gondii* pelo “Western-blotting” (Tabela 1 e Figura 1), foi possível identificar a presença de, no máximo, 16 bandas protéicas imunodominantes em soros positivos para ambos os testes (n=7), as quais variaram de 220 kDa a 30 kDa (30; 34; 43; 58; 63; 67; 72; 76; 78; 87; 97,4; 122; 139; 147; 190; 220 kDa). Nos soros com reatividade para o ELISA-teste e padrão de fluorescência polar para a RIFI (negativos), evidenciaram-se a existência de, no máximo, 14 bandas protéicas imunodominantes (30; 43; 58; 63; 67; 72; 76; 78; 97,4; 122; 139; 147; 190; 220 kDa), enquanto nos soros que apresentavam sorologia negativa, tanto para o ELISA-teste como para a RIFI, foram notadas, no máximo, 10 bandas protéicas imunodominantes (58; 63; 72; 76; 78; 87; 97,4; 122; 139; 190 kDa), comigrantes com aquelas identificadas nos soros positivos para os dois testes utilizados (Figura 1).

Em gatos experimentalmente infectados e na fase crônica da toxoplasmose, os antígenos reconhecidos por IgG sérica foram de 65 kDa, 55 kDa, 51 kDa, 33 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 26 kDa e 19 kDa (LAPPIN et al., 1994). Em humanos com toxoplasmose crônica, 6 bandas (entre 82 kDa a 151 kDa) foram exclusivamente reconhecidas pela IgG sérica, e somente a banda de 132 kDa foi reconhecida em mais que 50% dos soros analisados (VILLAVEDRA et

al., 1998). Antígenos de *T. gondii* reconhecidos por IgG sérica das fases aguda e crônica de humanos situavam-se nos intervalos de 20 kDa a 24 kDa, 34 kDa a 39 kDa, 58 kDa a 80 kDa e 105 kDa a 130 kDa, bem como dois antígenos adicionais de 18 kDa e 29 kDa (VILLAVEDRA et al., 1998). Esses resultados não podem ser correlacionados diretamente com aqueles citados acima, mas é assumida a indicação de antígenos imunodominantes situados nos intervalos de 30 kDa a 43 kDa, 58 kDa a 78 kDa, 87 kDa a 122 kDa, reconhecidos pela IgG sérica dos cães naturalmente infectados por *T. gondii*, positivos pela RIFI e pelo ELISA-teste. Nos soros que constituíram o segundo grupo (ELISA - teste positivo e RIFI negativo), os polipeptídeos de 220 kDa, 76 kDa, 63 kDa e 30 kDa são indicados como de valor diagnóstico e, no terceiro grupo (ELISA – teste e RIFI negativos), apenas os polipeptídeos de 122 kDa, 63 kDa e 58 kDa auxiliariam o diagnóstico diferencial correspondendo àqueles também caracterizados para o primeiro grupo analisado.

Assim sendo, em relação aos soros com padrão de fluorescência polar e ELISA-teste positivo, 7 (25%) dos soros foram reconhecidos como positivos para *T. gondii* e, dentre os soros negativos por ambos os testes, apenas 3 (10,71%) foram considerados também positivos.

A proteína de 30 kDa do *T. gondii* é reconhecida como de superfície de taquizoítos, de natureza glicoprotéica e envolvida no processo de aderência junto a outras, bem como a de 54 kDa relacionada à motilidade e invasão, a de 34,7 kDa, também de superfície, relacionada à proteção, e as de 32 kDa e 97 kDa são observadas no interior do citosol. Ainda as proteínas de 28 kDa, 35 kDa e 43 kDa são caracterizadas como de superfície, e a de 58 kDa e 67 kDa como oriundas do citosol (JOHNSON et al., 1983, SIBLEY e SHARMA, 1987, BLANCO et al., 1992). Neste trabalho, é interessante verificar que as proteínas de 58 kDa e 67 kDa foram as reconhecidas pela IgG sérica pela técnica do “Western-blotting”, com percentuais de 71,4% e 85,7%, respectivamente, nos soros de cães positivos para *T. gondii* em ambos os testes sorológicos utilizados. Vale aqui ressaltar que em uma amostra de 276 soros analisados por Domingues et al. (1998), tanto pela RIFI como pelo ELISA-teste, 21 soros de cães com sintomatologia compatível com a toxoplasmose apresentaram resultados sorológicos discordantes entre as duas técnicas. Esses dados levam a inferir a participação dos seguintes fatores: **1** - cães imunossuprimidos por doenças virais poderiam reativar a toxoplasmose preexistente, refletindo em uma menor capacidade de produção de anticorpos contra antígenos de superfície e/ou do citosol de bradizoítos; **2** - ocorrência de variação antigênica do *T. gondii* dependente de sua capacidade cistogênica ou mesmo da apresentação de epítopos imunodominantes; **3** - diferentes antígenos podem ser apresentados na fase aguda e/ou crônica da toxoplasmose canina, interferindo na avaliação da

Tabela 1 – Percentual de polipeptídeos de *T. gondii* identificados pelo “Western-blotting” em três grupos de soros caninos com suspeita clínica de toxoplasmose.

Polipeptídeos PM (kDa)	Reatividade dos soros / Percentual %		
	ELISA-teste (1)	ELISA-teste (1)	ELISA-teste (2)
	RIFI (3) (n=7)	RIFI (*) (n=11)	RIFI (*) (n=10)
220	42,8%	36,3%	-
190	28,5%	9,1%	14,2%
147	42,8%	18,2%	-
139	28,5%	9,1%	10,0%
122	57,1%	9,1%	30,0%
97,4	42,8%	18,2%	20,0%
87	42,8%	-	10,0%
78	28,5%	18,2%	20,0%
76	28,5%	36,3%	10,0%
72	42,8%	18,2%	20,0%
67 (69-66)	85,7%	9,1%	-
63	57,1%	36,3%	40,0%
58	71,4%	27,2%	40,0%
43	42,8%	9,1%	-
34	42,8%	-	-
30	28,5%	27,2%	-

1 – Reatividade sérica com nível de ELISA e” 5.

2 – ELISA-teste negativo.

3 – Reatividade sérica pela RIFI calculada em Log da diluição de cada soro (1,5 – 3,0).

* – RIFI (Polar) – negativo.

PM – Peso molecular.

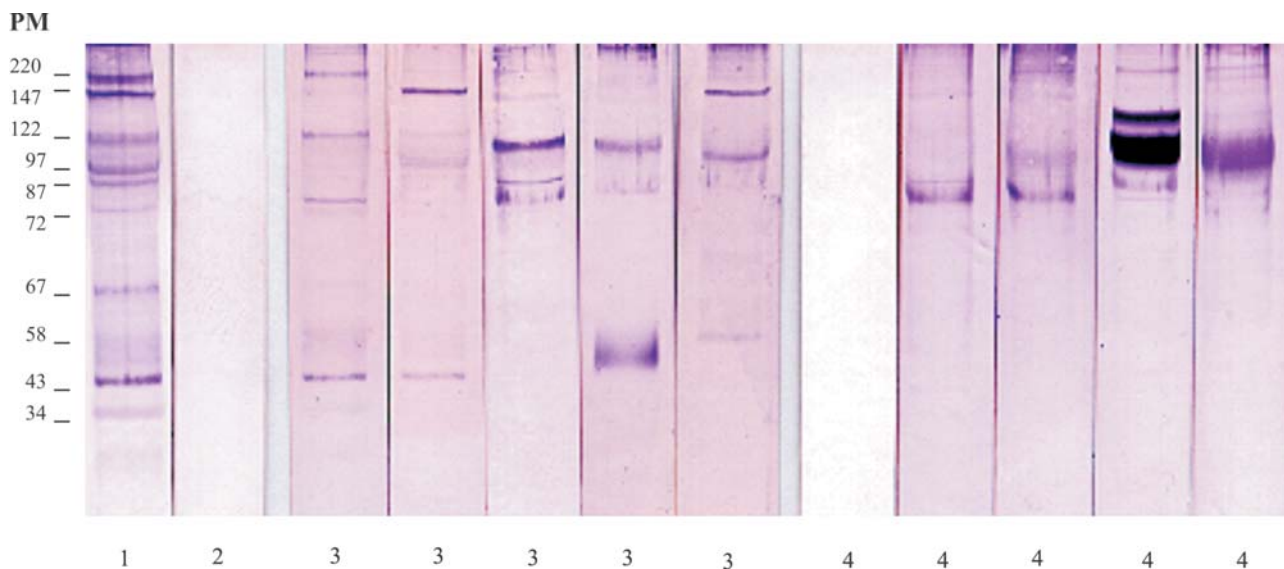


Figura 1 - Polipeptídeos de taquizoítas de *T. gondii* reconhecidos pela técnica de “Western blotting” por soros de cães naturalmente infectados. Soro controle positivo pelo ELISA-teste e pela RIFI (coluna 1); soro controle negativo pelo ELISA-teste e pela RIFI (coluna 2); soros-teste positivos pelo ELISA-teste e negativos pela RIFI (coluna 3); soros-teste negativos pelo ELISA-teste e positivos pela RIFI (coluna 4).

resposta imune humoral pelos testes utilizados; 4 - presença de reatividade antigênica cruzada entre parasitas filogeneticamente próximos. É interessante ressaltar que *Toxoplasma*, *Neospora*, *Besnoitia* e *Hamondia* encontram-se na mesma subfamília Toxoplasmatinae. Portanto, devem existir, em cães, coinfeção com dois ou mais gêneros desta subfamília. Mineo et al. (2001) demonstraram que, entre 11 soros positivos para *Neospora caninum* analisados pelo “Western blotting”, cinco demonstraram forte reatividade a antígenos de *T. gondii*, especialmente ao polipeptídeo p30 (TgSAG1).

Dessa forma, conclui-se que, em cães com sintomatologia compatível com a toxoplasmose, desde que sejam observados resultados conflitantes entre os testes sorológicos comumente utilizados, a técnica de “Western blotting” pode ser utilizada como um terceiro teste diferencial de diagnóstico, embora não se apresente com 100% de segurança. As presenças de sinais clínicos compatíveis com a toxoplasmose devem ser sempre analisadas juntamente com resultados de detecção direta e/ou indireta do parasita e a possibilidade de coinfeção com outras espécies de protozoários intracelulares e filogeneticamente próximos.

ARTIGO RECEBIDO: Julho / 2004
APROVADO: Janeiro / 2005

REFERÊNCIAS

- ABATE, O., GASBARRA, S., DOTTA, U. Toxoplasmosis study of antibody titres in health and diseased dogs and cats. **Veterinaria Cremona**, v.3, n.2, p.19-24, 1989.
- BLAKE, M. S., JOHNSTON, K. H., RUSSELL-JONES, G. L., GOTSCHLICH, E. C. A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugate anti-antibody on Western blots. **Analytical Biochemistry**, v.136, p.175-179, 1984.
- BLANCO, J. C., ANGEL, S. O., MAERO, E., PSZENNY, V., GARBERI, J. C. Cloning of repetitive DNA sequences from *Toxoplasma gondii* and their usefulness for parasite detection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.46, n.3, p.350-357, 1992.
- BOURDEAU, P. La toxoplasmose des carnivores. **Recueil de Medicine Veterinaire**, v.169, n.5/6, p.457-472, 1993.
- CAMARGO, M. E. **Introdução às Técnicas de Imunofluorescência**. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical, 1973, p.89-91.
- CHARIF, H., DARCY, F., TORPIER, M. F. C. D., CAPRON, A. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. **Experimental Parasitology**, v.71, p.114-124, 1990.
- DOMINGUES, L. M., MACHADO, R. Z., TINUCCI COSTA, M., CARVALHO, C., COSTA, A. J., MALHEIROS, E. B. Canine toxoplasmosis: A comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and the indirect immunofluorescence reaction (IIF). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, p.79-85, 1998.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in dog. **Canine Practice**, p.7-28, 1985.
- FLAUSINO, W., SOARES, C. O., FREIRE, R. B., LOPES, C. W. G. Variações intra-específicas de taquizoítos do *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) isolados de uma infecção natural e comparadas frente a cepa congênita. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 63-67, 1998.
- FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 2.ed. Porto Alegre: Editora Sulina, 1993. p. 114-118.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p.422-427, 1972.
- ISHIZUKA, M. M., MIGUEL, O., BROGLIATO, D. F. Estudo comparativo das provas de Sabin-Feldman (SF) e Imunofluorescência Indireta (IFI) com a Hemaglutinação (HÁ) para a avaliação de anticorpos antitoxoplasma em soros de cães. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.11, p.115-125, 1974a.
- ISHIZUKA, M. M., MIGUEL, O., BROGLIATO, D. F. Prevalência de anticorpos antitoxoplasma em soros de cães do município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.11, p.115-125, 1974b.
- JOHNSON, A. M., McDONALD, P. J., NEOH, S. H. Molecular weight analysis of soluble antigens from *Toxoplasma gondii*. **Journal Parasitology**, v.69, n.3, p.459-464, 1983.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAPPIN, M. R., BUSH, D. J. and REDUKER, D. W. Feline Serum antibody responses to *Toxoplasma gondii* and characterization of target antigens. **Journal Parasitology**, v.80, n.1, p.73-80, 1994.

LOUGREN, K., UGGLA, A., MOREIN, B. A new approach to the preparation of a *Toxoplasma gondii* membrane antigen for use in ELISA. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v.34, n.4, p.274-282, 1987.

MINEO, T. W. P., SILVA, D. A. O., COSTA, G. H. N., VON ANCKEN, A. C. B., KASPER, L. H., SOUZA, M. A., CABRAL, D. D., COSTA, A. J., MINEO, J. R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.98, p.239-245, 2001.

SIBLEY, L. D., SHARMA, S. D. Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induce protection in mice. **Infection and Immunity**, v.55, n.9, p.2137-2141, 1987.

TOWBIN, H., STALHELM, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.76, p.4350-4354, 1979.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: Epidemiologia e Importância da doença na saúde animal. **Seminários de Ciências Agrárias**, v.13, n.1, p.69-75, 1992.

VILLAVEDRA, M., CAROL, H., NIETO, A. Evolution of IgG antibody response against *Toxoplasma gondii* tissue cyst in acute and chronic human infections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.40, n.2, p. 1-13, 1998.

WILSON, M., WARE, D. A., JURANEK, D. D. Serologic aspects of toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 277-281, 1990.