

MARIA APARECIDA MOREIRA SCHENK

T636.089 69
S324f
1976

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



467308805

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

OK
02/03/04

OK/06


Freqüência e isolamento de *Toxoplasma gondii* em suínos
do Estado de Minas Gerais

Tese apresentada ao Departamento
de Medicina Veterinária Preventiva
da Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária.


Belo Horizonte
Minas Gerais - BRASIL
1976

Tese aprovada em 25/05/1976

BANCA EXAMINADORA



Professor JOSÉ DIVINO LIMA



Professor JOSÉ OSWALDO COSTA



Professor ÉLVIO CARLOS MOREIRA

A meu esposo, pelo apoio, carinho e dedicação.

Aos meus filhos, Luciana e Paulo Arthur, pelas horas de carinho e atenção que não lhes dediquei.

A minha mãe, pelo amor.

A meu pai, pelo exemplo (*in memoriam*)

Agradecimientos

Desejamos expressar nossos sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

De modo especial, agradecemos ao Professor JOSÉ DIVINO LIMA, pela amizade e eficiente orientação recebida.

Este trabalho teve apoio financeiro das seguintes Instituições:

- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA;
- CONSELHO NACIONAL DE PESQUISAS;
- FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISAS EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA;
- FUNDO DE DESENVOLVIMENTO TÉCNICO CIENTÍFICO.

1. Introdução	5
2. Revisão da Literatura	15
3. Material e Métodos	25
Resultados	35
Discussão	45
Conclusões	50
Bibliográficas	55

1. Introdução

A toxoplasmose é uma doença cosmopolita, que acomete o homem e várias espécies de animais domésticos e silvestres.

O *Toxoplasma gondii* agente da doença, foi descrito pela primeira vez por NICOLLE & MANCEAUX em 1908, quando isolaram esse parasita de um pequeno roedor norte-africano (*Ctenodactylus gondi*).

No Brasil os primeiros trabalhos sobre a doença em suínos, foram realizados no Estado de Minas Gerais por SILVA (1959) e em São Paulo por MONICI & RIBEIRO (1960).

A infecção pelo *T. gondii* é comum em suínos, sendo na maioria das vezes assintomática, ou causando sintomas brandos. No entanto, surtos da doença causando alta mortalidade, principalmente em leitões recém-nascidos, tem sido descrito por vários autores (COLE & cols., 1954; HARDING & cols., 1961; WORK & cols., 1970).

O isolamento de *T. gondii* de suínos aparentemente saudáveis, abatidos para o consumo humano, mostra a

importância das infecções assintomáticas nestes animais como fonte de infecção para o homem (WEISSTANNER, 1969).

O diagnóstico da doença geralmente é feito, tanto no homem como nos animais, através de reações sorológicas, entre elas a mais usada é a reação de Sabin-Feldman (RSF), devido a sua grande sensibilidade e especificidade. Mesmo assim, apresenta alguns inconvenientes quando empregada em larga escala: necessidade da obtenção de amostras de *T. gondii* em camundongos e o uso do "fator acessório". Estas limitações têm motivado a substituição deste método pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) que apresenta resultados semelhantes à RSF e que, gradativamente, vem sendo empregada como rotina no diagnóstico da doença no homem e em algumas espécies de animais.

Com a finalidade de estudar a frequência da infecção por *T. gondii* em suínos do Estado de Minas Gerais, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- 1) tentar o isolamento de *T. gondii* a partir de diafragmas e cérebro de suínos abatidos em matadouros de Belo Horizonte;
- 2) comparar os métodos de Sabin-Feldman e imunofluores-

cência indireta, para o diagnóstico da toxoplasmose em suínos;

- 3) determinar a frequência da infecção por *T. gondii* em alguns municípios do Estado de Minas Gerais.

2. Revisão da Literatura

A toxoplasmose em suínos foi diagnosticada pela primeira vez por FARREL & cols. em 1952 nos Estados Unidos, através de demonstração histopatológica em 8 suínos e isolamento de 2 amostras do parasita.

FELDMAN & MILLER (1956), estudando a prevalência da toxoplasmose no homem e animais através da RSF, examinaram 83 soros de suínos provenientes de duas áreas dos Estados Unidos e de Honduras. A frequência de animais positivos com títulos acima de 1:16 foi de 29% e 43% para os suínos das duas áreas dos Estados Unidos e de 11% para os de Honduras.

MOMBERG-JORGENSEN (1956) observou um surto de toxoplasmose em um rebanho suíno com mortalidade de 6 entre 11 leitões recém-nascidos. O *T. gondii* foi demonstrado, ao exame histopatológico, em todos os órgãos que tinham alterações patológicas e pela inoculação em camundongos. Ao exame sorológico, a maioria dos animais apresentaram títulos baixos e somente alguns apresentaram títulos de 1:256 à RSF.

JACOBS & cols. (1957), em Baltimore, (USA), inocularam 50 amostras de músculos diafragmáticos de suínos em camundongos e isolaram 8 (16%) amostras de *T. gondii*. A presença de *Sarcocystis* sp. foi observada ao exame direto em 43,7% de 39 diafragmas examinados. As amostras de *T. gondii* variavam de alta a baixa virulência matando, em algumas vezes, a maioria dos camundongos inoculados, a partir do 8º dia de inoculação.

SATO & cols. (1958), estudando a toxoplasmose em animais domésticos no Japão, observaram a necrópsia, lesões nos pulmões, fígado e linfonodos mesentéricos de 6 suínos examinados. *T. gondii* foi demonstrado em todas as lesões e em camundongos inoculados com material de suínos, foram isoladas 2 amostras do parasita.

EYLES & cols. (1959) estudaram a prevalência da toxoplasmose em animais selvagens e domésticos, da região de Memphis (USA). De 129 amostras do cérebro de suínos inoculados em camundongos, isolaram 1 (0,8%) amostra de *T. gondii*. Observaram ainda que no grupo de animais, provenientes de uma fazenda e de um abatedouro, a frequência de reações positivas ao teste do corante com títulos maiores ou iguais a 1:16 foi, respectivamente, de 19 e 26%.

SILVA (1959) diagnosticou, através de exame histopatológico, a toxoplasmose espontânea em suínos pela primeira vez no Brasil.

KOESTNER & COLE (1960) trabalharam na Universidade de Ohio (USA) com 32 suínos. Destes, 24 foram inoculados experimentalmente com *T. gondii* e 8 apresentavam toxoplasmose natural. À necrópsia, 17 animais mostraram lesões características de infecção por *T. gondii* em todo o sistema nervoso. Em 9, as lesões foram observadas somente no cérebro.

WENDE & DIENST (1961), estudando a toxoplasmose em rebanhos bovinos e suínos de Georgia (USA), encontraram entre 48 suínos examinados, 33 positivos à RSF com títulos iguais ou maiores que 1:16. Foi demonstrada a presença de *T. gondii* em 5 amostras de cérebro colhidas ao acaso entre 14 suínos abatidos.

HARDING & cols. (1961), na Inglaterra, estudando a toxoplasmose em suínos, observaram morte de 3 leitões de uma leitegada de 8 animais. O parasita foi

observado em lesões dos pulmões, fígado, linfonodos e rins de 2 leitões que morreram. A mãe dos leitões foi sacrificada e, após inoculação de amostras de vários órgãos em camundongos, conseguiram isolar o *T. gondii* de seu cérebro. Realizando sorologia no rebanho, encontraram títulos à RSF, que variavam de 0 a 1:72 em animais aparentemente sadios. Um desses animais, que apresentava sorologia mais elevada, foi sacrificado e seus órgãos inoculados em camundongos não resultando no isolamento de *T. gondii*.

ISHII & cols. (1962) inocularam em camundongos 61 amostras de diafragma de suínos aparentemente sadios, abatidos em matadouro de Tóquio. Isolaram 3 amostras que matavam os camundongos entre 10 e 20 dias após inoculação.

STUMM & cols. (1962) diagnosticaram clinicamente um surto de toxoplasmose em leitões do Estado de São Paulo. Os animais eram lactentes e apresentavam dispnéia intensa, corrimento nasal, paralisia, e morriam dentro de 2 a 4 dias após o aparecimento dos sinais clínicos. O diagnóstico clínico foi confirmado pela observação do parasita ao exame histopatológico.

KOSHIMIZU & cols. (1963) examinaram 317 soros

de suínos, aparentemente sadios, abatidos em matadouro de Shibaura, Tōquio. Destes, 80% foram reagentes ao teste de fixação de complemento com título de, pelo menos, 1:8. Das amostras positivas, 17% foram reagentes à RSF com títulos a partir de 1:16.

SUZUKI & cols. (1965), no Japão, trabalharam com 78 amostras de soros de suínos. Comparando a RIFI com a RSF concluíram que existe boa correlação entre as duas técnicas e que a RIFI tem grande valia no diagnóstico da toxoplasmose.

MAITANI & YOKOYAMA (1966) estudaram a toxoplasmose suína no Japão, através da inoculação de amostras de músculos diafragmáticos em camundongos. Através do método de digestão pela tripsina, isolaram 14 amostras de *T. gondii* de 108 amostras de tecido muscular e, em todos os casos positivos, encontraram cistos no cérebro de camundongos inoculados. De outras 39 amostras, encontraram sorologia positiva à RSF (título 1:16) no soro de camundongos inoculados com 6 delas, mas cistos só foram observados em 3 amostras, cujos títulos dos camundongos eram altos (1:256 e 1:1024).

RUIZ (1966) inoculou em camundongos 50 amostras de diafragmas de suínos abatidos em matadouros da cidade de São José (Costa Rica). Dos 50 diafragmas foram isoladas 6 (12%) amostras de *T. gondii*. Ao exame direto do diafragma 46 (92%) revelaram presença de *Sarcocystis* sp.

KANEKO & cols. (1967), trabalhando com suínos em matadouros de Saitana (Japão), observaram a relação entre os achados *post-mortem* em toxoplasmose suína e a detecção do parasita pela reação de imunofluorescência direta. Um total de 119.721 cabeças foram submetidas ao exame *post-mortem* e a frequência do parasita foi maior nos animais que apresentaram reação intradérmica positiva.

LALLA & cols. (1967) examinaram, em Siena (Itália), 432 soros de suínos aparentemente sadios abatidos em matadouros e encontraram 206 (47%) reagentes com títulos 1:10. Foram isoladas 17 amostras de *T. gondii*.

WORK (1967) estudou parasitológica e sorolô-

gicamente a toxoplasmose suína na Dinamarca e, de 29 diafragmas inoculados, isolou 10 amostras de *T. gondii*. Através da RSF, examinou 199 amostras de soros e encontrou 35,2% positivos com títulos que variavam de 1:10 a 1:256.

KATSUBE & cols. (1968), no Japão, estudaram a infecção latente por toxoplasmose em suínos, inoculando amostras de diafragma e olhos em camundongos. De 45 suínos abatidos, isolaram 5 amostras de *T. gondii*, sendo que 3 foram de 37 animais dos quais somente o diafragma foi examinado e 2 amostras de 8 suínos que tiveram olhos e diafragmas examinados.

AMARAL & MACRUZ (1969) trabalharam com 25 amostras de diafragma de suínos, clinicamente sadios, abatidos em matadouros do Estado de São Paulo e destinados ao consumo humano. Após inoculação em camundongos, foram isoladas 7 amostras do parasita e *T. gondii* foi observado em 1 caso ao exame histopatológico. A presença de *Sarcocystis* sp. foi observada em esfregaços corados pelo Giemsa, em 80% das amostras de diafragma.

CATAR & cols. (1969) na Bratislava (Tchecoslováquia) inocularam camundongos com cérebro e diafragma de suínos. Um grupo constituído de 75 amostras

foi dividido em 15 lotes de 5 diafragmas que, após inoculação em camundongos, resultaram no isolamento de *T. gondii* em 11 (73%) desses lotes. Do outro grupo constituído de 30 suínos, inocularam cérebro e diafragma de cada animal e conseguiram isolar o parasita de 13 animais, sendo que em 6 o isolamento foi somente de cérebro e em 7 foi de cérebro e diafragma. De 45 diafragmas, ao exame a fresco, 10 (20%) foram positivos para *Sarcocystis* sp. A sorologia dos suínos foi feita pela reação de fixação de complemento, sendo que 50 (46,6%) foram reagentes, principalmente com títulos de 1:8 e somente 1 com título 1:256.

JAMRA & cols. (1969) em São Paulo, examinando vários produtos de origem animal colhidos em açougues, isolaram o *T. gondii* nas seguintes percentagens: carne de porco, 6,8%; carne bovina, 8,1% e de ovos 1,9% após inoculação em camundongos.

WEISSTANNER (1969), em Zurich (Alemanha), inoculou 105 amostras de diafragma de suínos em camundongos e isolou 13(12,8%) amostras de *T.gondii*. O parasita foi isolado somente de animais positivos à RSF.

CREMERS (1970) examinou 50 soros de suínos

jovens pela RSF e 74% delas foram reagentes com títulos que variavam de 1:4 a 1:512.

FERNANDES & BARBOSA (1972) estudaram a ocorrência da toxoplasmose em animais domésticos, clinicamente sadios, da região Centro Oeste do Brasil. Examinaram 79 suínos pela RSF, dos quais 27 (34%) foram reagentes com títulos que variavam de 1:16 a 1:256. Através de inoculação em camundongos, isolaram uma amostra de *T. gondii* de 20 diafragmas inoculados. De cinco suínos submetidos a exame histopatológico, observaram grande quantidade de *T. gondii* no músculo estriado e miocárdio em dois animais.

SOGORB S, & cols. (1972) estudaram sorologicamente várias espécies de animais selvagens e domésticos provenientes de São Paulo. Entre 10 soros de suínos examinados pela RSF 6 (60%) foram reagentes.

MUNDAY (1975) coletou amostras de sangue de bovinos, ovinos e suínos em matadouros da Tasmânia. Utilizando a RIFI, observou que 16,9% dos cordeiros e 61,7% de outros carneiros eram positivos às diluições iguais ou maiores que 1:16 e que 23,3% dos leitões e 7,2% de outros suínos eram positivos às diluições iguais ou maiores que 1:8.

3. Material e Métodos

1. Material utilizado

1.1. Soros sanguíneos

Foram colhidas 900 amostras de sangue de suínos com idade variando de 6 a 12 meses em frascos de vidro de 100 ml previamente esterilizados e identificados. Esses animais eram provenientes de 28 municípios do Estado de Minas Gerais e foram abatidos nos diversos matadouros de Belo Horizonte. No laboratório, o sangue era mantido em estufa a 37°C durante uma hora e depois colocado em geladeira para obtenção de maior quantidade de soro. Após serem centrifugados (1500 rpm durante 10 minutos) eram estocados em frascos de 10 ml e mantidos até o momento do uso em congelador a -20°C.

1.2. Amostras de diafragma e de cérebro

Foram colhidas 159 amostras de diafragma e 98 de cérebro de suínos abatidos em Belo Horizonte e provenientes do Estado de Minas Gerais. As amostras eram acondicionadas em placas de Petri, previamente esterilizadas e identificadas.

As amostras de cérebro eram colhidas quando da abertura da carcaça ao meio e eram representadas pela metade do cérebro.

As amostras trabalhadas foram colhidas ao acaso e eram provenientes de animais que não tinham ainda sido submetidos a exames sorológicos para toxoplasmose.

1.3. Animais de laboratório

Os camundongos utilizados para isolamento, manutenção de amostras e produção de antígenos de *T. gondii* eram "Swiss", linhagem "Randon-CF-CPA", albinos, adultos, pesando entre 18 a 20 gramas.

Para obtenção da anti-gamaglobulina suína, foram imunizados coelhos adultos da raça Gigante Branco.

2. Técnicas empregadas

2.1. Isolamento de *T. gondii*

2.1.1. Diafragma

Cada amostra de diafragma pesando 30 gramas, em média, após retirada a gordura, era moída e submetida à digestão péptica segundo método descrito por JACOBS & MELTON (1957).

Após a digestão o material era filtrado em gaze e centrifugado a 2000 rpm durante 15 minutos. Ao sedimento adicionava-se salina fisiológica e centrifugava-se (1500 rpm durante 15 minutos) por duas vezes. Após a segunda centrifugação adicionava-se ao sedimento salina fisiológica contendo antibiótico (1000 UI de penicilina G-Potássica e 1 mg de estreptomicina por ml) até completar um volume de 5 ml, que representava a suspensão pronta para inoculação.

Cada amostra era inoculada em 2 camundongos que recebiam 2 ml de suspensão, por via intraperitoneal, sendo 1 ml logo após a preparação e 1 ml no dia seguinte.

2.1.2. Cérebro

As amostras eram constituídas de várias partes do cérebro (tronco encefálico, tálamo, encéfalo e cerebelo) e pesavam 30 gramas em média. Eram trituradas em gral esterilizado e após adição de salina fisiológica eram centrifugadas (1500 rpm 15 minutos) por duas vezes, e, o procedimento a seguir, era idêntico ao adotado anteriormente para as amostras de diafragma.

2.1.3. Exame dos animais antes da inoculação

Para cada grupo de camundongos utilizados para inoculação com amostras de diafragmas e de cérebro, sacrificava-se um grupo constituído de 10% dos animais, oriundos da mesma colônia. Destes retirava-se sangue e realizava-se reações sorológicas através da RSF e RIFI* para certificar-se da ausência de toxoplasmose na criação de camundongos.

2.1.4. Exame dos animais após inoculação

A partir do segundo dia após a inoculação, os camundongos eram examinados duas vezes ao dia. Dos que morriam a partir do terceiro dia de inoculados, retirava-se exsudato peritoneal que, após ser examinado a fresco, era inoculado em 2 outros camundongos.

Dos animais que sobreviviam, 4 semanas após inoculação, colhia-se sangue do retroorbitário utilizando pipetas de Pasteur umidecidas com heparina. 0

* O conjugado utilizado para esta reação foi obtido no Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

sangue era centrifugado para obtenção do plasma que, posteriormente, era examinado através da RSF ou de FIFI.

Os camundongos com reações positivas eram sacrificados e tinham seus cérebros triturados em gral e adicionado 2 ml de salina fisiológica. Esta suspensão de cérebro era examinada a fresco, em esfregaços corados pelo Giemsa como também era inoculada, por via intraperitoneal, em lotes de 2 camundongos. Esses eram examinados diariamente e, após 4 dias, eram sacrificados. Retirava-se exsudato peritoneal desses animais e, após exame a fresco, inoculava-se em outro lote de 2 outros camundongos. Esta operação era repetida tantas vezes fossem necessárias para isolamento de amostras de *T. gondii*.

As amostras isoladas eram mantidas por passagens seriadas através de inoculação, por via intraperitoneal, de exsudato retirado dos camundongos doadores. A virulência destas amostras era avaliada através de percentagem de mortalidade e tempo de sobrevivência dos camundongos.

2.2. Reação Sabin-Feldman

Utilizando a técnica proposta por BROOKE &

SULZER (1955) foram examinados soros de suínos, nos quais eram diluídos em salina tamponada (pH 7,2) na razão 4 a partir de 1:16. Para realização desta reação foi utilizado exsudato peritoneal de camundongos inoculados com *T. gondii** 48 horas antes da reação. Os camundongos eram do mesmo grupo usados na RIFI.

Ao exsudato peritoneal, depois de lavado várias vezes por centrifugação, adicionava-se "fator acessório" na proporção de 1/5. Após distribuía-se 0,1 ml desta mistura em cada um dos tubos contendo as diversas diluições do soro a serem examinados e aos soros controles assim como em um tubo que só continham salina. Agitava-se os tubos e incubava-os em estufa a 37°C por 1 hora. Ao final deste período os tubos eram retirados da estufa, sobre cada um pipetava-se 0,02 ml de solução alcalina de azul de metileno (pH 11), deixava-se

* Amostra cedida pelo Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

em repouso por alguns minutos e realizava-se a leitura ao microscópio, utilizando ocular 10 X e objetiva 40 X.

2.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para exame dos soros suínos utilizou-se a técnica da RIFI descrita por CAMARGO (1964) com algumas modificações. As etapas do preparo e execução da RIFI são descritas nos itens seguintes:

2.3.1. Preparo do antígeno

Foi utilizada amostra de *T. gondii* mantida em laboratório através de inoculações sucessivas (2 em 2 dias) em camundongos.

Após 2 dias de inoculação retirava-se o exsudato peritoneal com solução de citrato de sódio (3,8%). Ao exsudato juntava-se igual volume de salina tamponada (pH 7,2) contendo 1% de formalina (40% p.a.). Este material era homogeneizado rapidamente por agitação, deixado à temperatura ambiente durante 30 minutos e em seguida centrifugado (10 minutos a 1500 rpm) para sedimentar os parasitas. Acrescentava-se ao sedimento salina tamponada suficiente para se obter um número ideal de toxoplasmas (10 a 15 por campo microscópico

com objetiva 40 X). A suspensão de toxoplasmas era então colocada em lâminas para imunofluorescência previamente delimitadas com pequenos círculos feitos com adesivo*.

As lâminas eram colocadas em estufa a 37°C durante um período de tempo suficiente para secagem do antígeno e após serem acondicionadas em folha aluminizada eram estocadas em congelador (-20°C) até o momento do uso.

2.3.2. Obtenção da anti-gamaglobulina suína

A anti-gamaglobulina suína destinada à conjugação foi obtida a partir de 2 coelhos imunizados de acordo com o seguinte esquema:

- a) cada coelho foi inoculado com 5 mg de gamaglobulina suína liofilizada dissolvidas em 0,5 ml de salina fisiológica. Adicionava-se a esta suspensão 1,5 ml de adjuvante completo de Freund;
- b) após emulsificação do material cada coelho foi inoculado com 0,8 ml em cada pata posterior e com 0,4 ml pela via subcutânea do abdômen;
- c) 21 dias após à inoculação verificava-se o estado de imunização dos coelhos, inoculando-se 1 mg de gamaglobulina suína diluída em 0,1 ml de salina, por via intradérmica, no abdômen de cada animal e para observar se havia a reação de Arthus. Além disso o estado de imunização foi avaliado, ainda, pela prova de precipitação em gel descrita por KUBES (1965)

* Araldite. BRASCOLA, S.A. - São Paulo.

utilizando a mesma solução usada para a reação intradérmica. Quando a reação de Arthus era positiva ou o título na prova da precipitação em gel era igual ou maior que 1:64 os animais eram sangrados;

- d) o sangue dos coelhos era colhido na veia marginal da orelha, colocado em estufa e posteriormente em geladeira, para obtenção do soro;
- e) colocava-se o soro em geladeira e sob agitação magnética adicionava-se igual volume de solução de sulfato de amônia 3,52 M, onde permanecia por 24 horas;
- f) a solução era centrifugada a 3000 rpm durante 30 minutos. Ao sedimento resultante adicionava-se um volume de água destilada aproximadamente a metade do soro original e homogeneizava-se gentilmente com uma pipeta para que fosse obtida uma solução homogênea;
- g) a suspensão de gamaglobulina era novamente precipitada como descrito acima (itens e e f) mas empregando um volume de solução de sulfato de amônia 3,52 M igual ao volume da água adicionada no item f;
- h) a solução de gamaglobulina mantida entre 2-6°C era dialisada com salina fisiológica, frequentemente trocada até remoção completa do sulfato de amônia.

2.3.3. Conjugação da anti-gamaglobulina

A concentração da anti-gamaglobulina suína foi determinada utilizando-se refratômetro manual*.

A solução de gamaglobulina foi colocada em geladeira e sob agitação magnética foi adicionada, isotiocianato de fluoresceína na proporção de 1 mg desta substância para 40 mg de gamaglobulina. O isotiocianato foi diluído em solução tampão de carbonato (pH 9,0) cujo volume era de 10% do volume de solução de gamaglobulina. A conjugação foi processada em geladeira (2-6°C) sob agitação magnética, o conjugado foi passado em coluna de DEAE celulose**, montada no dia anterior e mantida em geladeira (4-5°C).

O conjugado foi colhido em pequenas frações conforme a tonalidade da cor, para posterior titulação.

Para titulação do conjugado foram feitas as seguintes diluições: 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:40 e

* Atago Serum Protein Refractometer; Atago Optical Works Com. Ltd. Japan.

** DEAE-celulose-Mesh medium; capacity 0,80 meg/mg. Sigma Chemical Co.

1:80, em salina tamponada (pH 7,2) contendo Tween 80 a 2%. O conjugado foi titulado pela RIFI, utilizando-se soros controles positivos testados anteriormente pela RSF.

O conjugado foi mantido em congelador (-20°C).

2.3.4. Reação de Imunofluorescência Indireta

Os soros a serem testados eram diluídos do mesmo modo empregado anteriormente na RSF. De cada diluição retirava-se 0,01 ml e colocava-se sobre cada área delimitada contendo antígeno, nas lâminas preparadas anteriormente. Estas, antes de serem usadas, eram retiradas do congelador e expostas ao ventilador para secarem.

Em seguida, as lâminas eram colocadas em câmara úmida e mantidas em estufa a 37°C durante 40 minutos. Transcorrido esse período eram lavadas com salina tamponada (pH 7,2) e cobertas pela mesma solução por 5 minutos. Depois eram lavadas com água destilada e expostas ao ventilador para secarem. O conjugado, após ser diluído em Tween 80 a 2%, era depositado em cada área delimitada da lâmina. As lâminas eram colocadas no-

vamente em estufa a 37°C durante 40 minutos, lavadas e colocadas para secarem conforme já descrito. Depois de secas, corava-se as lâminas com azul de Evans, na diluição 1:5000 em salina tamponada (pH 7,2), durante 5 minutos. Eram lavadas em água destilada e, depois de secas, cobertas com glicerina tamponada (pH 7,2) e lamínulas (32 x 24 mm). A leitura da reação era feita utilizando-se um microscópio binocular, objetiva de imersão 40 X provida de diafragma, ocular 10 X condensador de campo escuro a óleo, iluminação com lâmpada ultravioleta HBO-200, filtro de excitação 4 G-2 e de barreira 0/41.

4. Resultados

1. Demonstração de *T. gondii* em amostras de diafragma e de cérebros de suínos

1.1. Exame direto

Em nenhuma das amostras de diafragma examinadas foi demonstrada a presença de *T. gondii* através do exame a fresco ou em esfregaços corados pela solução de Giemsa. A presença de *Sarcocystis* sp. foi observada em 30% das amostras de diafragma.

1.2. Isolamento de *T. gondii* através de inoculação em camundongos

As amostras de *T. gondii* foram isoladas a partir de cérebro de camundongos anteriormente inoculados com cérebro ou diafragma de suínos e que apresentavam reações sorológicas positivas à RIFI.

De 20 lotes de camundongos inoculados com amostras de diafragmas, 2 foram positivos à RSF com título igual a 1:16. Entretanto, não foram sacrificados para exame direto de cérebro e/ou tentativa de isola-

mento de *T. gondii*. De outros 139 lotes de camundongos inoculados com o mesmo material, 6 foram positivos à RIFI com títulos 1:16 (3 lotes), 1:64 (2 lotes) e 1:1024 (1 lote). Nesses lotes positivos foi demonstrada a presença de cistos de *T. gondii* no cérebro dos camundongos em 1 lote (1:64), do qual foi isolado uma amostra do parasita (Quadro I). Desta forma, entre 159 amostras de diafragmas inoculados, 8 (5%) foram positivas à sorologia para toxoplasmose, sendo isolada uma amostra de *T. gondii*.

Dos 98 lotes de camundongos inoculados com amostras de cérebro de suínos, 7 (7,1%) foram positivos à RIFI com títulos 1:16 (2 lotes), 1:64 (4 lotes) e 1:257 (1 lote). Em 4 desses lotes positivos (título 1:64) foi demonstrada a presença de cistos de *T. gondii* no cérebro de camundongos e foram isoladas 4 amostras do parasita (Quadro I).

O número de passagens necessárias para o isolamento de *T. gondii* variou de 2 a 6 e as amostras levaram de 10 a 20 dias para matar os camundongos. Após adaptarem-se aos novos hospedeiros todas as amostras mostraram-se virulentas para os camundongos, matando-os na maioria das vezes, 2 a 3 dias após inoculação. Os

títulos obtidos pela RIFI, nos soros dos suínos, dos quais foram isoladas as amostras, variaram de 1:16 a 1:256.

Com a finalidade de se determinar de qual órgão era mais fácil isolar *T. gondii*, amostras de diafragma e cérebro, provenientes de 90 suínos, tiveram seus resultados comparados (Quadro II). As amostras de cérebro apresentaram maior percentagem de isolamento (4,4%) do que os diafragmas (1,1%).

2. Reações sorológicas

2.2. Comparação da reação de Sabin-Feldman com a reação de Imunofluorescência Indireta

Os resultados obtidos em 57 soros de suínos examinados simultaneamente pela RSF e RIFI foram comparados e houve concordância em 48 (84,2%) soros. As concordâncias obtidas de acordo com os títulos foram as seguintes: ao título 1:16, (93,3%); a 1:64, (100%); a 1:256, (75%) e a 1:4096, (100%). Em 25 soros não reagentes à RSF, a concordância foi de 80% e 5 (20%) tiveram título de 1:16 na RIFI.

2.3. Imunofluorescência Indireta

Das 900 amostras de soro examinadas, 269

(29,9%) foram reagentes à RIFI com títulos que variaram de 1:16 a 1:4096. Entre as reações positivas, 214(23,8%) tiveram títulos iguais a 1:16, 48 (5,3%) iguais a 1:64, 5 (0,6%) iguais a 1:256 e 2 (0,2%) iguais a 1:4096. A frequência de anticorpos dos suínos provenientes de 29 municípios do Estado de Minas Gerais se encontra no Quadro III.

QUADRO I

Isolamento de *T. gondii* a partir da inoculação em camundongos de 139 diafragmas e 98 cérebros de suínos abatidos em matadouros de Belo Horizonte, MG, 1975

RIFI TÍTULO	Diafragma		Cérebro	
	Reagentes	Isolamento	Reagentes	Isolamento
1:16	3	0	2	0
1:64	2	1	4	4
1:256	-	-	1*	0
1:1024	1*	0	-	-
Total	6	1	7	4

* Não foi tentado isolamento.

QUADRO II

Isolamento de *T. gondii* através de inoculação em camundongos de 90 amostras de cérebro e de diafragma de suínos abatidos em matadouros de Belo Horizonte, MG, 1975-

	Diafragma		Total
Cérebro	Positivo	Negativo	
Positivo	1	3	4
Negativo	-	86	86
Total	1	89	90

QUADRO III

Frequência de anticorpos pela RIFI, em soros de suínos abatidos em matadouros de Belo Horizonte, provenientes de 29 municípios do Estado de Minas Gerais, 1974/75

Municípios	Nº de exami- nados	Diluições				Reagentes	
		1:16	1:64	1:256	1:4096	Nº	%
Áraxã	18	6	1	-	-	7	39,0
Betim	22	8	1	-	-	9	40,0
Carmo do Paranaíba	38	10	3	-	-	13	34,0
Conceição das Alagoas	36	11	6	2	-	19	52,8
Contagem	3	-	-	-	-	-	-
Corinto	29	5	-	-	-	5	17,3
Coromandel	37	6	6	-	-	12	32,5
Cruzeiro da Fortaleza	18	3	1	-	-	4	22,3
Entre Rios de Minas	16	-	-	-	-	-	-
Esmeraldas	42	6	-	-	-	6	14,3
Felixlândia	37	11	1	-	-	12	32,5
Formiga	28	12	1	-	-	13	46,5
Guapé	16	2	-	-	-	2	12,5
Guimarânia	20	7	7	-	-	14	70,0
Ituiutaba	68	22	2	1	-	25	36,8
Jequeri	16	2	-	-	-	2	12,0
João Pinheiro	17	8	1	-	-	9	53,0
José de Melo	16	2	-	-	-	2	12,0
Lagoa Formosa	23	5	2	-	-	7	30,5
Luz	16	1	1	1	-	3	18,8
Montes Claros	25	6	-	-	1	7	28,0
Pains	24	12	1	-	-	13	54,2
Patos de Minas	126	13	4	-	-	17	13,5
Ponte Nova	16	4	3	1	1	9	56,3
Ribeirão das Neves	51	13	-	-	-	13	25,5
Santa Luzia	20	6	4	-	-	10	50,0
São Pedro do Suaçui	24	12	1	-	-	13	54,2
Santa Vitória	82	21	2	-	-	23	28,1
Vespasiano	16	-	-	-	-	-	-
Total	900	214	48	5	2	269	29,9

5. Discussão

A toxoplasmose é estudada através do isolamento de *T. gondii* ou pela determinação de anticorpos no soro sanguíneo. Clinicamente, a doença em suínos é de difícil diagnóstico porque os sinais clínicos apresentados são muito variáveis, embora determinadas manifestações (dispnéia intensa, paralisia e morte precoce) tenham sido observadas por alguns autores (HARDING & cols., 1961; STUMM & cols., 1962) em casos de toxoplasmose natural.

O método mais utilizado para o isolamento do parasita a partir de animais é o da inoculação em camundongos, de órgãos submetidos ou não à digestão péptica ou de líquidos tissulares (JACOBS & cols., 1957; KATSUBE & cols., 1968). O parasita pôde ser demonstrado através do exame direto feito em esfregaços de tecidos, digeridos ou não, corados pela solução de Giemsa ou pela imunofluorescência direta ou através de exames histopatológicos (FARREL & cols., 1952; MOMBERG-JORGENSEN, 1956; SATO & cols., 1958; SILVA, 1959; KOESTNER & COLE, 1960; KANEKO & cols., 1967).

O exame direto realizado no sedimento de 159 amostras de diafragma após digestão péptica foi negativo para *T. gondii*, concordando com os resultados obtidos por vários autores (JACOBS & cols., 1957; AMARAL & MACRUZ, 1969; CATAR & cols., 1969; JAMRA & cols., 1969) e positivo para *Sarcocystis* sp. em 30% das amostras. A percentagem de *Sarcocystis* sp. encontrada por vários autores é variável sendo, às vezes, maiores, como as observadas por JACOBS & cols. (1957); RUIZ (1966) e AMARAL & MACRUZ (1969) que encontraram respectivamente 43,2%, 80% e 92% de diafragmas infectados, ou menores, como 20,2% encontradas por CATAR & cols. (1969) que as encontradas neste trabalho. Sendo o *Sarcocystis* sp. facilmente visualizável ao exame direto devido ao seu tamanho, essas diferenças de positividade não dependem da metodologia empregada pelos diversos autores mas, provavelmente, das variações de prevalência do parasita nas diversas áreas estudadas.

A percentagem (0,6%) de amostra de *T. gondii*, isolada de diafragma dos 159 suínos, é relativamente baixa se comparada às obtidas por vários autores que utilizaram a mesma técnica e o mesmo órgão utilizados no presente trabalho. Essas diferenças de isolamento

são provavelmente devido a varios fatores como, por exemplo, quantidade de amostra empregada, sorologia dos suínos e procedência dos animais. JACOBS & cols. (1957) e WORK (1967) utilizaram, respectivamente, em média 91g e 100 g de diafragma, quantidades superiores às aqui utilizadas (30 g), justificando em parte, as maiores taxas de isolamento (16% e 34%) por eles obtidas. Entretanto, ISHII & cols. (1962) utilizando 10 g do mesmo material, isolaram o *T. gondii* de 32% dos suínos estudados. Estes resultados provavelmente são devido às diferenças de prevalência da toxoplasmose, pois, como observaram FELDMAN & MILLER (1956) para várias espécies animais procedentes de diferentes áreas geográficas ela variou de acordo com a região.

Além do isolamento de 1 amostra de *T. gondii* 7 outras amostras de diafragma induziram formação de anticorpos nos lotes de camundongos inoculados. Em 2 lotes examinados pela RSF o título foi igual 1:16 e em outros 5 lotes examinados pela RIFI, apresentaram títulos de 1:16 (3 lotes), 1:64 (1 lote) e 1:1024 (1 lote). Considerando que a amostra isolada o foi a partir de subinoculação de camundongos que apresentavam títulos 1:64 à RIFI e que alguns lotes de camundongos com sorologia positiva (1:16 à RSF e 1:1024 à RIFI) foram sa-

crificados sem subinoculação correspondente para isolamento. É perfeitamente aceitável considerar as amostras de diafragma inoculadas nestes lotes de camundongos como positivas para *T. gondii*. Os outros 2 lotes que apresentaram título igual 1:16 à RIFI poderiam, também, ser considerados como provenientes de diafragmas positivos se se considerar que CATAR & cols. (1969) encontraram cistos de *T. gondii* no cérebro de camundongos de pelo menos 2 entre 5 camundongos que apresentavam à RIFI títulos que variavam de 1:2 a 1:256 e que tinham sido inoculados com diafragma e cérebro de suínos. A partir deste raciocínio deve ser considerado que apesar de ter sido isolada apenas 1 amostra de *T. gondii*, 8 diafragmas estariam parasitados e o percentual de suínos positivos seria de 5% e não 0,6%, obtidas por isolamento. Esse percentual de positividade se assemelha aos obtidos por ISHII & cols. (1962) e FERNANDES & BARBOSA (1972) que encontraram, respectivamente, 4,9% e 5% de diafragmas positivos para *T. gondii*. Esses autores trabalharam com animais escolhidos ao acaso, como aqui trabalhados, inoculando amostras de diafragma de suínos com sorologia positiva ou negativa. Deve ser ressaltado que FERNANDES & BARBOSA (1972) observaram o parasita em músculo estriado e miocárdio de 2 entre 5 animais submetidos ao exame histopatológico.

Amostras de carne de suínos destinadas ao consumo humano, e que foram utilizadas por alguns autores, forneceram taxas de isolamento maiores que as obtidas aqui com amostras de diafragma, pois, MAITANI & YOKAYAMA (1966) e JAMRA & cols. (1969) obtiveram, respectivamente, 12,9% e 6,8% de isolamento do parasita. Como esses resultados foram obtidos em regiões diferentes, é provável que as diferenças não sejam devidas exclusivamente ao material utilizado mas, também, à prevalência da doença na área de procedência dos animais.

Outro fator, que provavelmente teve grande influência na taxa de isolamento, foi a percentagem de suínos reagentes para toxoplasmose levando-se em consideração que as possibilidades de isolamento são maiores em animais com sorologia positiva, pois, segundo alguns autores (WORK, 1967; CATAR & cols., 1969), à medida que aumenta o título nos suínos aumenta a possibilidade de isolamento de *T. gondii*.

Se se considerasse somente os 28 suínos sorologicamente positivos, o percentual de diafragmas parasitados por *T. gondii* neste trabalho seria de 28,5% e não de 5% e se assemelharia aos resultados obtidos por

outros autores, pois, se WORK (1967) tivesse trabalhado com diafragma de 199 suínos estudados sorologicamente, a taxa de isolamento seria de 5% enquanto que, trabalhando com 29 suínos positivos, obteve 34%. Da mesma forma LALLA & cols. (1967) trabalharam sō com animais positivos e isolaram 8,2% enquanto que se tivessem inoculado material de todos os 432 suínos examinados sorologicamente, obteriam uma taxa de 3,9%. O mesmo argumento ē vāldo ao se considerar que o percentual de 12,8% de isolamento obtido por WEISSTANNER (1969) pois utilizou diafragmas de suínos que apresentavam RSF positiva.

O percentual de (4,1%) de isolamento de *T. gondii* a partir de amostras cērebro de suínos foi maior que as taxas obtidas por EYLES & cols. (1959) e menor que as obtidas por WENDE & DIENST (1961) e CATAR & cols. (1969) que obtiveram, respectivamente, 35% e 43,3%. Esta discordāncia de dados provavelmente possa ser atribuída a vārios fatores, como a quantidade de cērebro utilizada e percentual de reagentes. Embora EYLES & cols. (1959) tenham trabalhado com amostras provenientes de suínos com 83% de reagentes, nāo citam a quantidade de cērebro utilizada, enquanto que, CATAR & cols.

(1969) colheram amostras de suínos com 47,6% de reagentes e utilizaram todo o cérebro o que, certamente, foi a causa de maior percentagem de isolamento obtida por esses autores, apesar de WENDE & DIENST (1961) terem utilizado 30 g de cérebro, quantidade igual a usada no presente trabalho, as amostras foram colhidas de um rebanho com 68% dos animais reagentes enquanto que nesse experimento, somente 29,9% dos animais eram positivos e, dessa forma, a chance de isolamento foi menor.

A comparação entre 90 amostras de cérebros e 90 de diafragmas colhidas do mesmo animal mostraram que a taxa de isolamento foi maior no cérebro (4,4%) do que (1,1%) em diafragma. Essa diferença foi, também, observada por CATAR & cols. (1969) quando compararam 30 amostras de cérebro e diafragma e isolaram 43% amostras de *T. gondii* de cérebro. Acreditam esses autores que os cistos do parasita estão em maior número no cérebro ou persistem por mais tempo nesse órgão do que no diafragma. Entretanto, EYLES & cols. (1959) concluíram que a baixa percentagem de isolamento por eles obtida em cérebro de suínos é devido a maior persistência do parasita no diafragma, embora não seja excluído o fator diferenças geográficas.

Todas as amostras isoladas mostraram-se virulentas para camundongos, matando-os entre 10 a 20 dias após a primeira passagem, fato esse também observado por JACOBS & cols. (1957), ISHII & cols. (1962) e por AMARAL & MACRUZ (1969). Esses últimos autores observaram que somente 1 das 7 amostras por eles isoladas, o foi na primeira passagem enquanto que as restantes necessitaram de 3 a 7 passagens para matar os camundongos.

A comparação das técnicas de RSF e RIFI em 57 soros de suínos mostrou uma concordância de resultados em 84,2%. SUZUKI & cols. (1965) comparando as mesmas técnicas em 78 soros de suínos, verificaram concordância de títulos em 50% das amostras e recomendam o emprego da reação para o diagnóstico da toxoplasmose em suínos. Em soros humanos esta comparação foi feita por CAMARGO (1964) e por WALTON & cols. (1966) que encontraram, respectivamente, 97,7% e 95% de concordância de títulos, sendo que ambos trabalharam com 1000 soros. A técnica de imunofluorescência indireta vem sendo largamente empregada no diagnóstico da toxoplasmose humana, porém, ainda é pouco utilizada em suínos.

Os resultados obtidos no presente experimento sugerem que esta reação possa substituir a RSF, devido as vantagens que ela apresenta, tais como: evitar o uso

do "fator acessório", diminuir os riscos operacionais e apresentar maior rapidez na leitura.

O estudo sorológico de 900 suínos demonstrou uma frequência de 29,9% de reagentes à RIFI, com títulos que variaram de 1:16 a 1:4096, sendo que a maioria apresentou títulos na diluição 1:16. Levantamentos semelhantes têm sido feitos por diversos autores, em vários países, embora utilizados diferentes técnicas (KOSHIMIZU & cols., 1963; KANEKO & cols., 1967; CREMERS, 1970; MUNDAY, 1975).

No Brasil, FERNANDES & BARBOSA (1972) examinaram pela RSF, 79 soros de suínos e obtiveram uma taxa de 34,2% de reagentes, enquanto que SOGORB, S. & cols. (1972) utilizaram a mesma técnica e verificaram 60% de reagentes em 10 suínos examinados. Em outros países como Dinamarca, WORK (1967) obteve 35,2% de positivos à RSF em 199 soros examinados, enquanto que WEISSTANNER (1969) na Alemanha, utilizando a mesma técnica, encontrou 12,3% entre 105 suínos examinados e KOSHIMIZU & cols. (1963), no Japão, examinando 317 soros de suínos encontraram 80% de positivos na reação de fixação de complemento. Provavelmente, as diferenças existentes entre as taxas obtidas nesse trabalho e a dos demais

autores, sejam devido ao fator amostragem, a não ser com a obtida por KOSHIMIZU & cols. (1963) que parece ser devido ao tipo de reação, pois eles verificaram que entre os 80% positivos, somente 17% foram reagentes à RSF.

Deve ser salientado que, nos matadouros onde foram colhidas as amostras de sangue, a maioria dos suínos tinham, em média, 6 a 12 meses de idade. Esse fato provavelmente explique a maior percentagem de baixos títulos obtidos pela RIFI. Possivelmente, em muitos desses animais, a presença de anticorpos seja de caráter passivo, transferidos da mãe aos filhos, como explica EYLES & cols. (1959).

6. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1. o isolamento de *T. gondii* é mais fácil a partir de cérebro do que de diafragmas;
2. a reação de imunofluorescência indireta pode substituir, com vantagens, a reação de Sabin-Feldman no diagnóstico da toxoplasmose em suínos;
3. a frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* é bastante difundida entre as criações de suínos do Estado de Minas Gerais.

O isolamento de *T. gondii* foi feito a partir de 159 amostras de diafragma e 98 de cérebros de suínos. Do total de diafragmas inoculados em lotes de camundongos, 8 foram reagentes à RSF e/ou RIFI, com títulos entre 1:16 a 1:1024, sendo que 1 amostra do parasita foi isolada. Dos 98 cérebros inoculados em lotes de camundongos, 7 foram positivos à RIFI com títulos 1:16 a 1:256, sendo que 4 amostras de *T. gondii* foram isoladas.

As amostras isoladas mostraram-se patogênicas para camundongos. A presença de *Sarcocystis* sp. foi observada em 30% dos diafragmas estudados.

A comparação em 57 soros examinados pela RSF e RIFI, mostrou concordância de títulos em 48 (84,2%) soros. A frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em 900 soros de suínos examinados pela RIFI mostrou 269 (29,9%) reagentes, com títulos que variaram entre 1:16 a 1:4096.

8. Referências Bibliográficas

- AMARAL, V. & MACRUZ, R., 1969. *Toxoplasma gondii* isolamento de amostras a partir de diafragmas de suínos clinicamente sadios abatidos em matadouros de São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 36:47-51.
- BROOKE, M.M. & SULZER, A.J., 1955. Directions for performing Sabin-Feldman cytoplasm modifying (methylene blue dye) test for toxoplasmosis. Public Health Lab. Rockville, 13:136-47.
- CAMARGO, M., 1964. Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 1000 soros humanos, comportamento anômalo de alguns soros. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 24:1-26.
- CATAR, G.; LAWRENCE, L. & HOLKOVÁ, R., 1969. Isolations of *Toxoplasma gondii* from swine and cattle. J. Parasit., Lawrence, 55:952-5.

- COLE, C.R.; SANGER, V.L.; FARRER, L.; KORNDER, J.D., 1954. The present status of toxoplasmosis in veterinary medicine. North Am. Vet., Copenhagen, 35: 265-70.
- CREMERS, F.X.M.M., 1970. The value of the Sabin-Feldman dye test for the diagnosis of toxoplasmosis in pig, cattle and sheep. Neth. J. Vet. Sci., Utrecht, 3:19-27.
- EYLES, D.E.; GIBSON, C.L.; COLEMAN, N.; SMITH, C.S.; JUMFER, J.R.; JONES, F.E., 1959. The prevalence of toxoplasmosis in wild and domesticated animals of the Memphis region. Am. J. Trop. Med. Hyg., Baltimore, 8:505-10.
- FARREL, R.L.; DOCTON, F.L.; CHAMBELAIN, D.M.; COLE, C. R., 1952. Toxoplasmosis. I. Toxoplasmas isolated from swine. Am. J. Vet. Res., Chicago, 13:181-5.
- FELDMAN, H.A. & MILLER, L.T., 1956. Serological study of toxoplasmosis prevalence. Am. J. Hyg., Baltimore, 64:320-35.

- FERNANDES, W.J. & BARBOSA, W., 1972. Toxoplasmose - Notas sobre sua ocorrência em animais domésticos em Goiânia (1970). Rev. Patol. Trop., Goiânia, 2(1):259-65.
- HARDING, J.D.J.; BEVERLEY, J.K.A.; SHAW, I.G.; EDWARDS, B.L.; BENNETT, G.H., 1961. *Toxoplasma* in English pigs. Vet. Rec., London, 73:3-6.
- ISHII, T.; KOBAYASHI, A.; KOYAMA, T.; KUMADA, M.; KOMIYA, Y.; FUKAZAWA, T.; SAITO, M.; KOSHIMIZU, K., 1962. /Studies on *Toxoplasma*. VI: A survey of pork meat for the presence of *Toxoplasma*/. Jap. J. Parast., Tokyo, 11:184-91.
- JACOBS, L. & MELTON, M.L., 1957. A procedure for testing meat samples for *Toxoplasma* with preliminary results of a survey of pork and beef samples. J. Parasit., Lawrence, 43(5, sec.2):38-9. (abstract).
- JACOBS, L.; REMINGTON, J.S. & MELTON, M.L., 1957. A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. J. Parasit., Lawrence, 46:23-8.
- JAMRA, L.F.; DEANE, M.P. & GUIMARÃES, E.C., 1969. On the isolation of *Toxoplasma gondii* from human food of animal origin. Partial results in the city of São

- Paulo (Brazil). Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 11 (3):169-76.
- KANEKO, N.; KOSUGE, G.; IWASAKI, H.; SUZUKI, M.; TOMIOKA, H.; NAITO, H.; KINOSHITA, O.; ITO, R., 1967. Relationship between *post-mortem* findings of toxoplasmosis and protozoal detection observed in meat inspection. J. Jap. Vet. Med. Ass., Tokyo, 20: 151-4.
- KATSUBE, Y.; HAGIWARA, T.; MIYAKAWA, H.; MUTO, T.; IMAIZUMI, K.; MASUDA, K.; MIYAKE, I., 1968. Latent infection of *Toxoplasma* in swine eyes and diaphragm. J. Med. Sci. Biol., Tokyo, 21:427-30.
- KOESTNER, A. & COLE, C.L., 1960. Neuropathology of porcine, toxoplasmosis. Cornell Vet., Ithaca, 50:362-84.
- KOSHIMIZU, K.; FUKAZAWA, T.; KANAI, T.; HARADA, T., NAKAMURA, T.; SAITO, K.; SUGAYA, S.; TOKUTOMI, G.; AKAO, Y., 1963. Distribution of *Toxoplasma* antibodies in slaughtered hogs and workers of a Tokyo abattoir. J. Jap. Vet. Med. Ass., 16:460-64.
- KUBES, V., 1965. El metodo de la precipitacion en gelosa y el diagnostico de la rabia. Bol.Ofic.Sanit. Panamer, Washington, 59:298-312.

- LALLA, F.; BECHELLI, G.; CAVALLINI SANPIER, L.; CAVALLINI, F., 1967. Serological and parasitological observations on the incidence of Toxoplasmosis among pigs in the Siena area of Italy. Clinica Vet., Milano, 90:439-54.
- MAITANI, T. & YOKOYAMA, M., 1965. /Isolation Results of *Toxoplasma gondii* from the ground pork meat on the market/. Jap. J. Parasitol., Tokyo, 15:110-5.
- MOMBERG-JORGENSEN, H.C., 1956. Toxoplasmose in pigs. Nord. Vet. Med., Copenhagen, 8:227, apud WORK, K., 1967. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the flesh sheep, swine and cattle. Acta Path. et Microbiol. Scandinav., Copenhagen, 71:296-306.
- MONICI, N. & RIBEIRO, L.D.C., 1960. Constatação da toxoplasmose em suínos. Biológico, São Paulo, 26:210.
- MUNDAY, B.L., 1975. The epidemiology of toxoplasmosis with particular reference to the tasmanian environment, Melbourne, University of Melbourne, 95 p. (Tese).
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L., 1909. Sur un protozoaire nouveau du *gondi*, *Toxoplasma*. Arch. Inst. Pasteur, Tunis, 2:97-103.

- RUIZ, A., 1966. Isolation of *Toxoplasma gondii* from swine in Costa Rica. Ann. Trop. Med. Parasit., Liverpool, 60:429-31.
- SATO, H.; SAHERKI, Y.; MUTO, T.; OISHI, I.; KOBAYASHI, S.; MIYAMOTO, Y.; OCHI, Y., 1958. Studies on Toxoplasmosis in domestic animals. I. Isolation of *Toxoplasma gondii* from porcine and canine cases. Jap. J. Vet. Sci., Tokyo, 20:213-21.
- SILVA, J.M.L., 1959. Sobre um caso de Toxoplasmose espontânea em suínos. Arq. Esc. Sup. Vet., Belo Horizonte, 12:425-8.
- SOGORB, S, T.; JAMRA, L.F.; GUIMARÃES, E.C.; DEANE, M.P., 1972. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 14:314-20.
- STUMM, E.V.; SILVA, D.A.; AMARAL, L.B.; NETTO, L.Z.; VALENTE, F.A.T., 1962. Sobre um surto de Toxoplasmose em leitões no Estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 29:47-54.
- SUZUKI, K.; SUTO, T.; FUJITA, J., 1965. Serological diagnosis of Toxoplasmosis by the indirect immunofluorescent staining. Natl. Inst. Anim. Health Q., Tokyo, 5:73-85.

- WALTON, B.C.; BENCHOFF, B.M. & BROOKS, W.H., 1966 .
Comparison of the indirect fluorescent antibody
test and methylene blue dye test for detection of
antibodies to *Toxoplasma gondii*. Am. J. Trop. Med.
Hyg., Baltimore, 15:149-52.
- WENDE, N.M. & DIENST, R.B., 1961. Endemic toxoplasmosis
in isolated swine and cattle herds and its relation-
ship to a human population. Proc. Soc. Exp. Biol.
Med., New York, 106:400-1.
- WEISSTANNER, T.H., 1969. /Nachweis von *Toxoplasma*
gondii in der zwerchfellmuskulatur des schweines.
Ein Beitrag zur Epidemiologie der Toxoplasmosis/.Path.
Microbiol., Basel, 33:44-56
- WORK, K., 1967. Isolation of *Toxoplasma gondii* from
the flesh of sheep, swine and cattle. Acta Path.
Microbiol. Scandinav., Copenhagen, 71:296-306.
- WORK, K.; ERIKSEN, L.; FENNESTAD, K.L.; MOLLER, R.R. &
SIIM, I.C., 1970. Experimental Toxoplasmosis in
pregnant sow. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B.,
Copenhagen, 78:129-39.