

Manutenção das características biológicas do *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) na eliminação de oocistos por gatos experimentalmente inoculados com cistos da cepa "P"

Maintenance of biological characteristics of *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) oocysts shedding by cats infected experimentally with "P" strain cysts

Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira,** Gustavo Adolfo Sabatini,*** Alvimar José da Costa****

Resumo

Seis gatos de ambos os sexos, com quatro semanas de idade, negativos para *T. gondii* ao RIFI, foram infectados com aproximadamente $1,5 \times 10^3$ cistos de *T. gondii*, provenientes de encéfalos de camundongos cronicamente infectados; outros três gatos, de mesma idade e também negativos, foram mantidos isolados e serviram como controle. Os felinos foram examinados clinicamente por três dias consecutivos antes da infecção experimental e até o término do experimento, pela manhã e à tarde. Os felinos infectados tiveram os seguintes sinais clínicos, entre o 4º e o 6º dias após infecção (DAI): pêlos arrepiados, secreção ocular bilateral de aspecto purulento e fezes de consistência pastosa. Os exames coprológicos foram realizados durante 15 dias consecutivos. Estes gatos eliminaram oocistos nas fezes, do 3º ao 8º DAI, com eliminação máxima no 5º DAI. O número total de oocistos recuperados foi de $2,5 \times 10^6$ do volume total de fezes eliminado. Nenhuma alteração foi observada nos animais do grupo controle.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; oocistos; gatos; cepa "P".

Abstract

Six kittens from both sex with four weeks old, and negatives for *T. gondii* by IFAT, were infected with approximately $1,5 \times 10^3$ cysts of *T. gondii*, originated from brains of albino mice chronically infected. Cats were clinically examined, twice a day, during three days before being infected experimentally and till the end of the experiment. They had the followed clinical signs as ruffled coat hair, bilateral ocular purulent secretion, and soften feces. Fecal examination was performed during 15 DAI, where kittens shed oocysts from three to eight DAI with greatest elimination at five DAI. Total oocysts counts was 2.5×10^6 of total feces eliminated during the experiment.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; oocysts; cats; "P" strain.

Introdução

Gatos e outros felídeos são os únicos hospedeiros definitivos do *T. gondii*, porque eliminam oocistos em suas fezes (Dubey e Beattie, 1988). Estes animais provavelmente adquirem a infecção naturalmente, pela ingestão de cistos teciduais presentes no hospedeiro intermediário, como pequenos mamíferos e pássaros (Davis e Dubey, 1995), podendo ser observada severa doença (Lindsay et al., 1997). Após a primária infecção gatos raramente eliminam oocistos, por ingestão de cistos teciduais (Frenkel e Smith, 1982).

Este trabalho objetivou avaliar as características biológicas na eliminação de oocistos de *T. gondii* por felinos, infectados experimentalmente com a cepa "P".

Material e métodos

Nove gatos SRD, de ambos os sexos, com aproximadamente quatro semanas de idade, formaram dois grupos; um, composto de três animais, foi mantido como controle e o outro, com os seis restantes, foi inoculado com $1,5 \times 10^3$ cistos do *T. gondii*. Estes animais foram mantidos em gaiolas individuais no "Centro de Pesquisas Parasitológicas - CPPAR" - UNESP/Jaboticabal. Água e alimentação foram fornecidos aos mesmos *ad libitum*.

Antes da inoculação do *T. gondii*, os felinos foram avaliados clinicamente, sendo considerados sadios. Estes animais, quando selecionados, estavam negativos coprológicamente e sorologicamente quanto à presença do *T. gondii*. Além dis-

*Sob os auspícios da CNPq/FAPESP.

**C.P.G.M.V.- Parasitologia Veterinária, BR-465, Km 7, CEP 23890-000 - Seropédica, RJ. E. mail: oliveira@ufrj.br.

***C.P.G.M.V.-Patologia Animal. FCAV, UNESP/Jaboticabal, SP.

****Departamento de Patologia, FCAV, UNESP/Jaboticabal, SP.

to, a partir de três dias consecutivos antes da infecção experimental até a data do término do experimento, pela manhã e à tarde, foram observados os seguintes dados clínicos: exame dos linfonodos, aspecto das conjuntivas, apetite e outras observações, quando pertinentes.

Nos soros de todos os felinos, obtidos nos dois dias anteriores à inoculação e no final do experimento, foram pesquisados anticorpos anti-*Toxoplasma*. Para tal, todas as amostras de soro colhidas foram estocadas no laboratório a -20°C, e posteriormente submetidas à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), conforme técnica preconizada por Camargo (1964).

Na presente pesquisa foi utilizada a cepa denominada "P", mantida junto ao Centro de Pesquisas Parasitológicas - CPPAR, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAVJ), UNESP, através de sucessivas passagens, em camundongos albinos. Esta cepa produz infecções letais em camundongos experimentalmente infectados com cistos por via intraperitoneal. Nos camundongos sobreviventes à infecção observam-se consideráveis quantidades de cistos encefálicos.

Cada felídeo recebeu aproximadamente 1500 cistos de *T. gondii*, provenientes de encéfalos de camundongos. Para obtenção destes cistos, alguns camundongos foram sacrificados e seus encéfalos foram removidos e triturados em gral, com solução salina a 0,9%. A contagem de cistos foi realizada em pequenas alíquotas de 0,1 ml de suspensão.

O inóculo padronizado foi dado aos gatos com auxílio de uma seringa de 5 ml (adaptada a uma sonda uretral nº 6A), a qual foi introduzida na luz do esofágica de cada animal, onde foi depositado o inóculo. A seguir, solução salina foi administrada para a retirada dos eventuais cistos aderidos ao equipamento utilizado.

Os exames coprológicos, utilizando-se todo volume de fezes emitido durante 24 horas pelos gatos, foram realizados, diariamente, durante 15 dias consecutivos. O material de cada dia foi estocado em frascos individuais, imerso em ácido sulfúrico a 2% e mantidos em temperatura ambiente durante 15 dias. Os frascos foram agitados, durante alguns minutos, diariamente, para acelerar a esporulação (Dubey et al., 1972). Decorrido este período, os oocistos esporulados foram lavados em água destilada, para remoção do ácido sulfúrico, através de sucessivas centrifugações e estocados em geladeira a 4°C imersos em solução salina a 0,9%. A identificação morfológica dos oocistos foi efetuada através dos critérios estabelecidos por Zaman (1970), e através de inoculações intraperitoneais em camundongos (Dubey et al., 1972). A contagem dos oocistos foi efetuada em câmara de Neubauer, de acordo com a técnica adotada por Costa (1979).

Os camundongos albinos suíços utilizados neste experimento foram provenientes das colônias de criação do Biotério Central da UNESP, localizado em Botucatu, SP. Periodicamente, foram realizados exames sorológicos para toxoplasmose, em amostras aleatórias de camundongos de diferentes ninhadas.

Resultados e discussão

Os camundongos das amostras tiveram negatividade de 100% aos exames sorológicos para toxoplasmose, o que permite supor que os camundongos utilizados não tiveram contato prévio com o *T. gondii*.

Durante a semana que antecedeu a inoculação, tempo em que os animais passaram por um período de adaptação em gaiolas de contenção, nenhuma alteração clínica pôde ser observada com relação ao estado geral dos animais.

Os felinos inoculados tiveram os seguintes sinais clínicos, entre o 4º e o 6º dias após infecção (DAI): pêlos arrepiados, secreção ocular purulenta bilateral e fezes de consistência pastosa. Dubey e Carpenter (1993) observaram esses sinais clínicos e também febre (40,0 a 41,7°C), dispnéia, icterícia e desconforto abdominal em 100 casos de toxoplasmose em gatos. Além disto, os mesmos autores relataram como comum ao gato, uveíte e retinocoroidite. Os animais deste experimento eliminaram oocistos nas fezes, do 3º ao 8º DAI, com eliminação máxima de oocistos no 5º (DAI) (Figura 1). O número total de oocistos recuperados foi de $2,5 \times 10^6$. Os animais controle não tiveram alterações clínicas e nem eliminaram oocistos das fezes. Os felinos experimentalmente infectados com cistos de *T. gondii* neste tra-

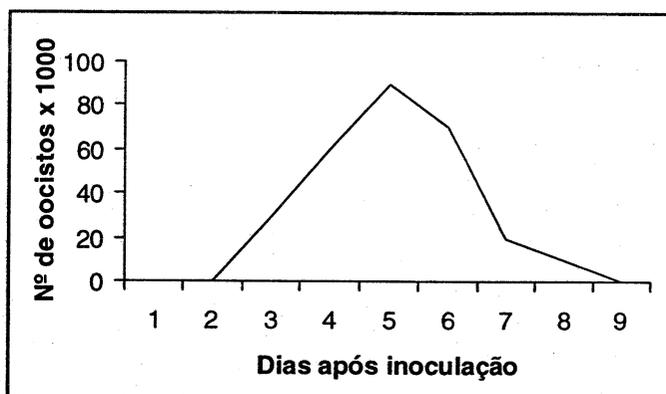


Figura 1: Curva de eliminação de oocistos de *Toxoplasma gondii* (Cepa P) por gatos inoculados, com 1.500 cistos por via oral

balho demonstraram comportamento biológico semelhante aos resultados obtidos por Frenkel et al. (1970) em gatos domésticos e Jewell et al. (1972) em outras espécies da família Felidae, ambos usando a cepa M-7741. Produção de oocistos, período pré-patente e eliminação máxima de oocistos foram parecidos aos de Costa et al. (1977), Vidotto et al. (1987), Kaneto et al. (1997) e Bresciani (1997), que utilizaram a mesma cepa deste experimento caracterizando que a cepa "P" continua mantendo o mesmo comportamento e as mesmas características da espécie. Os critérios utilizados na identificação taxonômica desses oocistos (Zaman, 1970 e Dubey et al., 1972), eliminaram quaisquer dúvidas quanto à sua etiologia. Tal identificação é de suma importância, uma vez que outros coccídios utilizam felídeos como hospedeiros definitivos (Dubey, 1977).

A identificação definitiva desses oocistos, previamente classificados como de *T. gondii*, segundo critérios morfológicos (Zaman, 1970), foi efetuada através da inoculação dos mesmos, via intraperitoneal em camundongos isentos de infecção pelo *T. gondii*. Estes animais apresentaram taquizoítos no exsudato recolhido da cavidade abdominal, entre o 11^a e o 14^a dias após a inoculação. Os animais sobreviventes à infecção, ou seja, decorridas seis semanas da inoculação, tiveram cistos de *T. gondii* no encéfalo.

Os exames clínicos e sorológicos, realizados nos dois dias anteriores à inoculação de *T. gondii*, não deixam dúvidas quanto à sanidade dos animais utilizados experimentalmente. Portanto, estes animais, além de não terem tido contato prévio com *T. gondii*, não tiveram qualquer outra infecção que pudesse alterar o processo evolutivo do parasito no hospedeiro. Tal procedimento experimental, obviamente, possibilita

inferir que cada um dos felinos inoculados poderia constituir-se em um controle dele próprio. A resposta humoral dos gatos não-inoculados e de todos os soros obtidos antes da inoculação, através da RIFI, mostrou títulos (<1:64). Todos os felídeos inoculados tiveram título (>1:64) ao final do experimento, 20 dias após a inoculação, confirmam que todos os animais inoculados foram sensíveis ao *T. gondii* e estes não haviam tido contato prévio com o parasito, principalmente com cistos, visto que somente esta forma evolutiva confere imunidade aos gatos e a não-eliminação de oocistos pelos mesmos (Frenkel e Smith, 1982).

Conclusão

Não ocorreu modificação biológica na eliminação de oocistos da cepa "P" do *T. gondii* por gatos.

Referências bibliográficas

- BRESCIANI, K. D. S. *Toxoplasmose experimental em cadelas gestantes*. FCAVJ, UNESP, Jaboticabal 113 p., 1997. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Área de Concentração em Patologia Animal).
- CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 3, p. 117-118, 1964.
- COSTA, A. J. *Toxoplasmose congênita natural em bovinos e infecção experimental de vacas gestantes com oocistos de T. gondii*. São Paulo. F.M.V.Z., U.S.P., 1979. 88 p. Tese (Doutorado).
- COSTA, A. J., ARAUJO, F. G., COSTA, J. O., LIMA, J. D., NASCIMENTO, E. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, v. 2, p. 212-214, 1977.
- DAVIS, S. W., DUBEY, J. P. Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. *J. Parasitol.*, v. 81, p. 882-886, 1995.
- DUBEY, J. P., BEATTIE, C. P. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Boca Raton, CRC Press, p. 117-125, 1988.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming Coccidia. In: KREIR, J.P. (Ed.) *Plasmodia and Haemoproteids*. Academic Press, London, v. 3, p. 102-219, 1977.
- DUBEY, J. P., CARPENTER, J. L. Histologically confirmed clinic. Toxoplasmosis in cats: 100 cases (1952-1990). *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 203 p. 1556-1566, 1993.
- DUBEY, J. P., SWAN, G. V., FRENKEL, J.K. A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* from the faeces of cats. *J. Parasitol.*, v. 5, p. 1005-1006, 1972.
- FRENKEL, J. K., SMITH, D. D. Immunization of cats against shedding of *Toxoplasma* oocysts. *J. Parasitol.*, v. 68, p. 744-748, 1982.
- FRENKEL, J. K., DUBEY, J. P., MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, v. 167, p. 893-896, 1970.
- JEWELL, M. L., FRENKEL, J. K., JOHNSON, K. M., REED, V., RUIZ, A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical Felidae. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, v. 21, p. 512-517, 1972.
- KANETO, C. N., COSTA, A. J., PAULILLO, A. C., MORAES, F. R., MURAKAMI, T.O., MEIRELES, M. V. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet. Parasitol.*, v. 69, p. 203-210, 1997.
- LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B., DUBEY, J. P. Feline Toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. *J. Parasitol.*, v. 4, p. 448-461, 1997.
- VIDOTTO, O., COSTA, A. J. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. I. Observações clínicas e hematológicas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 39, p. 623-639, 1987.
- ZAMAN, V. Morphology of *Toxoplasma* oocysts and its comparison with the cat coccidia. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health.*, v. 3, p. 329-335, 1970.