

# COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DAS CEPAS 'P' E SERO-47 DO *Toxoplasma gondii* (APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE) EM UMA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CODORNAS (*Coturnix japonica*)

## Biological behavior of 'P' and Sero-47 strain of *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) in an experimental infection in japanese quail (*Coturnix japonica*)

ALBUQUERQUE<sup>1</sup>G.R., MUNHOZ<sup>1</sup>A.D., OLIVEIRA<sup>2</sup>F.C.R. & LOPES<sup>3</sup>C.W.G.

(1) Curso de Pós-Graduação em Ciência Veterinária – Parasitologia Veterinária/ UFRRJ. george@ufrj.br. 23890-000 Seropédica, RJ;

(2) Laboratório de Sanidade Animal CTAA, UENF, (3) Departamento de Parasitologia Animal/IV/UFRRJ, lopescw@ufrj.br. 23890-000 Seropédica, RJ

**SUMMARY:** One hundred and ten japanese quails were divided in four groups. Two groups of 30 animals each were inoculated with  $10^6$  and  $10^4$  tachyzoites/animal of SERO-47 strain of the *Toxoplasma gondii*. The third group consisted of 20 animals was also inoculated with  $10^5$  tachyzoites/animal of 'P' strain of the same parasite. The last group of 30 animals each was also inoculated with saline at 0.9% and left as control. Five japanese quails for each group were sacrificed at each determinate date. Tachyzoites were observed from the 7th DAI, with larger frequency in the liver, lungs and spleen, being more easily found in the animals infected with the 'P' strain. In 70<sup>th</sup> DAI parasites of SERO-47 strain were not observed in any animals while quails infected with 'P' strain had cysts without inflammatory reaction in brain and heart. Tachyzoites from 'P' strain measured  $5.81 \pm 0.53$  for  $2.29 \pm 0.29$  mm, much larger than those of the SERO-47 strain,  $3.57 \pm 0.44$  for  $1.73 \pm 0.31$  mm. In the bioassay, the animals infected with the SERO-47 strain were just positive in 3rd and 7th DAI, already infected them with the 'P' strain in the 3rd, 7th, 14th and 70th DAI. These results demonstrate a differentiated behavior of the two strains of the *T. gondii* in the same host.

**KEY WORDS:** *Toxoplasma gondii*, biological behavior, japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*, 'P' and SERO-47 strains.

## INTRODUÇÃO

Das muitas das amostras do *Toxoplasma gondii* que têm sido isoladas em diferentes hospedeiros vertebrados, embora com morfologia semelhante, apresentam variações biológicas, sorológicas e imunológicas (WARE & KASPER, 1987; VERHOFSTEDÉ *et alii*, 1988; CHARIF *et alii*, 1990). Além da inespecificidade de parasitismo, a caracterização deste protozoário deve ser feita tomando-se o cuidado de não confundir-lo com outros coccídios, principalmente com a *Neospora caninum*, que apresenta morfologia semelhante e algumas moléculas antigênicas, P17, P29 e P30, de mesma origem e peso molecular (BJERKÅS *et alii*, 1994).

Diferenças de perfis antigênicos de *T. gondii* têm sido descritas para cepas isoladas em vários hospedeiros, como

também de amostras intra-específicas (BLOONFIELD & REMINGTON, 1970; SIBLEY & SHARMA, 1987; FRENKEL, 1990; FLAUSINO *et alii*, 1998).

Embora a virulência das amostras seja caracterizada pelo seu efeito sobre camundongos (KAUFMAN *et alii*, 1958), a caracterização antigênica tem sido melhor identificada pelo perfil eletroforético (BLOONFIELD & REMINGTON, 1970; CHARIF *et alii*, 1990; FLAUSINO *et alii*, 1997 e 1998). As variações nas concentrações de proteínas confirmam coincidências com as características de virulência e antigenicidade das amostras de *T. gondii* analisadas (SANTORO *et alii*, 1985; FLAUSINO *et alii*, 1998).

Este trabalho teve por objetivo observar as diferenças no comportamento biológico entre duas cepas do *T. gondii* em codornas experimentalmente infectadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 110 codornas fêmeas (*C. japonica*) com aproximadamente 30 dias de idade, obtidas de um criatório no município de Petrópolis, Rio de Janeiro. Destas, 30 receberam um inóculo contendo  $10^4$  taquizoítas e 30 um inóculo com  $10^6$  taquizoítas da cepa SERO-47, acistogênica, 20 receberam  $10^5$  taquizoítas da cepa 'P', cistogênica, e os outros 30 animais foram utilizados como controles, recebendo somente solução salina. Todos os animais foram inoculados por via subcutânea.

A cada grupo de animais, água e ração foram dadas *ad libitum* em recipientes adequados às gaiolas.

As codornas foram necropsiadas nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 70 após infecção (DAI), com exceção do grupo inoculado com a cepa 'P' que ocorreram ao 3°, 7°, 14° e 70° DAI. A cada dia cinco animais de cada grupo foram previamente anestesiados em câmara saturada de éter e sacrificados por degola.

Para pesquisa das formas endógenas de *T. gondii* foram feitos, impressões de cérebro, coração, pulmões, fígado, baço e rins, os quais foram secos ao ar, mantidos em metanol por três minutos e corados pelo Giemsa, na proporção de 1 ml de solução tampão pH 7,2 para três gotas do corante por 30 minutos.

As formas endógenas de *T. gondii* observadas nos esfregaços de cérebro, coração, pulmões, fígado, baço e rins, foram mensuradas com auxílio de ocular micrométrica K-15X, acoplada a um microscópio óptico triocular e objetiva de imersão.

Com a finalidade de se verificar o estabelecimento da infecção, fragmentos da musculatura peitoral de todas as codornas necropsiadas no 1°, 3°, 7°, 14° e 21° DAI e do fígado, baço, pulmões, cérebro, coração e músculo no 70° DAI foram coletados. A seguir, cada fragmento foi triturado em gral e pistilo estéreis, homogeneizados em 8 ml de solução salina 0,9% e filtrados através de gaze estéril de 4 camadas. A esse material foram adicionadas 1000 UI de penicilina G potássica e 100 mg de estreptomicina. A suspensão de órgãos foi inoculada intraperitoneal em camundongos albinos. Para cada suspensão de órgãos foi utilizado 3 camundongos, sendo que cada animal recebeu 2 ml de inóculo, perfazendo um total de 630 camundongos.

Com o objetivo de verificar a transmissão de *T. gondii* através dos ovos, foram inoculados 35 preparados tissulares de clara e gema de ovos oriundo de codornas infectadas e 5 de codornas do grupo controle em camundongos albinos, com a mesma metodologia descrita anteriormente, sendo utilizado 2 camundongos por inóculo, totalizando 80 animais.

Todos os camundongos utilizados no experimento foram procedentes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Os camundongos foram observados diariamente após a inoculação, durante trinta dias. Os animais que morreram ou que tiveram aumento de volume abdominal durante o experimento, foram examinados para averiguação da presença do parasito.

Aos trinta DAI, os camundongos sobreviventes foram anestesiados e amostras de sangue foram obtidas do plexo braquial. A seguir, este foi centrifugado e o soro retirado para realização de pesquisa de IgG anti-*T. gondii* pelo teste de hemaglutinação indireta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos esfregaços dos órgãos dos animais infectados, necropsiados no 1° e 3° DAI, não foram observados formas do parasita, assim como, em todos os esfregaços dos animais do grupo controle. Taquizoítas de *T. gondii* foram observados em maior número no 7° e 14° DAI e mais facilmente visualizados nos esfregaços de órgãos oriundos de codornas infectadas com a cepa 'P' (Figura 1 e 2). O parasito foi observado em todos os órgãos analisados, com exceção do cérebro e com maior frequência no fígado e baço (Tabelas 1 e 2). No 21° DAI raros parasitos foram vistos nos esfregaços dos animais inoculados com a cepa SERO-47.

No 70° DAI nenhuma forma do parasito foi observada em codornas infectadas com a cepa SERO-47, enquanto nas infectadas com a cepa 'P' foi possível observar cistos (Figura 3) do parasito no cérebro de três animais e no coração de um animal infectado.

Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por ALBUQUERQUE *et alii* (1996) que observaram taquizoítas

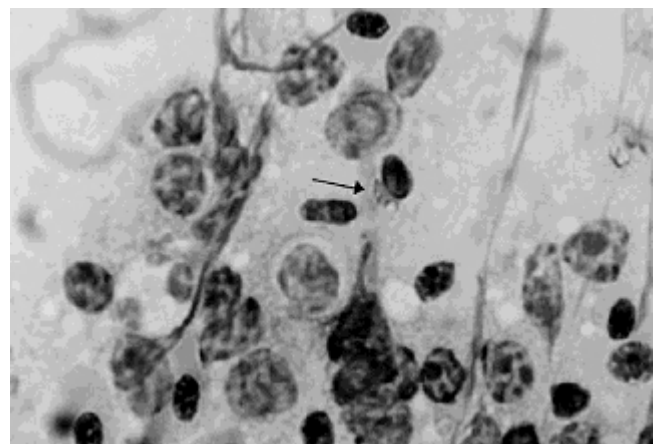


Figura 1. Infecção de uma codorna com  $10^6$  taquizoítas da cepa SERO-47 do *Toxoplasma gondii*. Taquizoíta (®) em esfregaço de fígado. Giemsa, 1000x

no coração, baço, rins, pulmões, fígado de camundongos inoculados com a cepa SERO-47 a partir do 7º DAI.

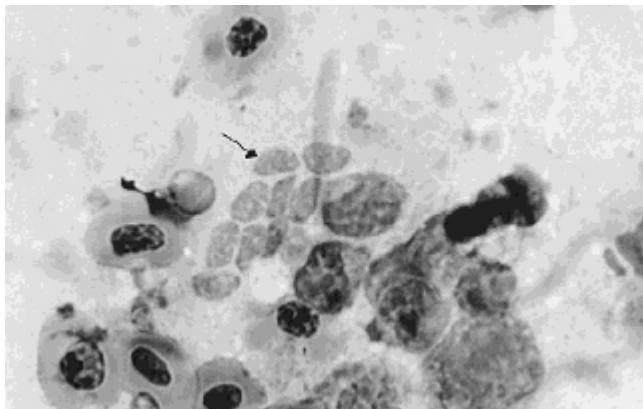


Figura 2. Infecção de uma codorna com  $10^5$  taquizoítas da cepa 'P' do *Toxoplasma gondii*. Taquizoíta (®) em esfregaço de pulmão. Giemsa, 1000x.

TABELA 1. Aspectos comparativos da presença de taquizoítas de duas cepas do *Toxoplasma gondii* em diferentes tecidos codornas, no 7º dia após infecção experimental.

Órgãos	Nº de taquizoítas/ml			Controle
	Cepa SERO-47 $10^6$	Cepa 'P' $10^4$	Cepa 'P' $10^5$	
Fígado	2 <sup>a</sup> /5 <sup>b</sup>	2/5	3/5	0/5
Baço	3/5	2/5	3/5	0/5
Rins	3/5	1/5	2/5	0/5
Coração	0/5	0/5	1/5	0/5
Cérebro	0/5	0/5	0/5	0/5
Pulmões	2/5	1/5	1/5	0/5
B. de Fabricius	0/5	0/5	0/5	0/5

<sup>a</sup>Número de animais positivos.

<sup>b</sup>Número total de animais infectados.

TABELA 2. Aspectos comparativos da presença de taquizoítas de duas cepas do *Toxoplasma gondii* em diferentes tecidos codornas, no 14º dia após infecção experimental.

Órgãos	Nº de taquizoítas/ml			Controle
	Cepa SERO-47 $10^6$	Cepa 'P' $10^4$	Cepa 'P' $10^5$	
Fígado	3 <sup>a</sup> /5 <sup>b</sup>	3/5	5/5	0/5
Baço	3/5	2/5	5/5	0/5
Rins	1/5	1/5	3/5	0/5
Coração	1/5	1/5	2/5	0/5
Cérebro	0/5	0/5	0/5	0/5
Pulmões	3/5	2/5	5/5	0/5
B. de Fabricius	1/5	0/5	4/5	0/5

<sup>a</sup>Número de animais positivos.

<sup>b</sup>Número total de animais infectados.

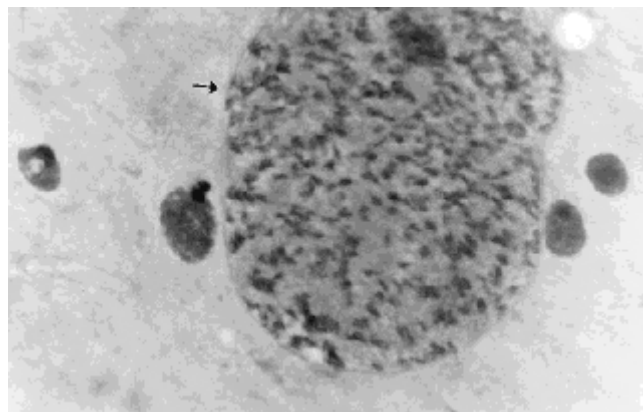


Figura 3. Codorna infectada com  $10^5$  taquizoítas da cepa 'P' do *Toxoplasma gondii*. Cisto (®) bem diferenciado em esfregaço de cérebro. Giemsa, 1000x.

TABELA 3. Variação das medidas dos taquizoítas do *Toxoplasma gondii* de duas cepas distintas, em codornas infectadas experimentalmente.

Medidas (mm) <sup>1</sup>	Cepa SERO-47	Cepa 'P'
Diâmetro maior	$3,57 \pm 0,44^a$	$5,81 \pm 0,53$
Diâmetro menor	$1,73 \pm 0,31^a$	$2,29 \pm 0,29$
Índice morfométrico	$2,10 \pm 0,18^b$	$2,58 \pm 0,30$

<sup>a</sup>P ≤ 0,01. Teste t de Student.

<sup>b</sup>P ≤ 0,05. Teste t de Student.

KINJO (1961) e JACOBS & MELTON (1966) observaram que a parasitemia em galinhas aparecia rapidamente, mas que só ocasionalmente, persistia por mais de duas semanas, mesmo quando se empregava inóculos, que variavam de  $10^5$  a  $10^8$  taquizoítas de *T. gondii*. Semelhança esta observada neste trabalho, onde a partir do 14º DAI raras formas do parasito puderam ser observadas.

Os taquizoítas observados nas impressões de órgãos das codornas infectadas com a cepa SERO-47, apareceram de maneira esparsa e menores do que os obtidos das codornas infectadas com a cepa 'P'. Nos órgãos das codornas infectadas com a cepa SERO-47 predominaram as formas pequenas e finas, enquanto na cepa 'P' existiam grande quantidade de formas largas. (Tabela 3).

Na literatura, pouca ênfase tem sido dada ao tamanho dos taquizoítas encontrados. Somente MEDEIROS & LOPES (1996) enfatizaram a importância destes, quanto ao tamanho em relação ao órgão parasitado. Assim sendo, as formas oriundas da cepa 'P', foram semelhantes em tamanho aos encontrados pelos autores acima citados para as formas isoladas em camundongos provenientes de uma galinha de fundo de quintal, já as formas da cepa SERO-47 foram semelhantes às encontradas por FLAUSINO (1999) também em codornas.

Desta maneira, pode-se afirmar que as modificações acentuadas deste parasito podem ser observadas com maior clareza, quando estas passam de um vertebrado para outro, conforme FLAUSINO (1999) ou quando cepas diferentes estão sendo utilizadas em um mesmo hospedeiro, o que ocorreu neste trabalho. Já que foram comparadas formas oriundas de uma cepa acistogênica (SERO-47) e outra cistogênica (cepa 'P').

O parasito foi possível ser isolado da musculatura peitoral dos animais infectados com a cepa SERO-47 no 3º e 7º DAI, independente da dose utilizada, e nos infectados com a cepa 'P' no 3º, 7º e 14º DAI. No 70º DAI nenhum dos órgãos das codornas infectadas com a cepa SERO-47 inoculados em camundongos albinos foram positivos, enquanto que somente um baço, dois corações, quatro cérebros, um pulmão e quatro musculaturas peitorais das cinco codornas infectadas com a cepa 'P' foram positivos. Da mesma maneira, DUBEY *et alii* (1994), isolaram o parasito do cérebro, músculo e coração de codornas infectadas experimentalmente aos 63 DAI. KANETO *et alii* (1997), ao utilizarem também a cepa 'P' em frangos, isolaram o parasito do cérebro, retina, pâncreas, baço, rins, coração, proventrículo, fígado, intestinos, pulmões e músculo já aos 35 DAI, e DUBEY *et alii* (1993), isolaram aos 68 DAI do cérebro, coração e músculo.

Entretanto, o desaparecimento do *T. gondii* dos tecidos de galinhas foi observado por JONES *et alii* (1959), quatro semanas após infecção. Justificativa ao acontecimento foi apresentada por KINJO (1961), onde afirmou que galinhas tem a tendência de eliminar o parasito dos seus tecidos 1 a 2 meses após a infecção. Resultado semelhante ocorreu com as codornas infectadas com a cepa SERO-47 onde não foi possível isolar o parasito aos 70º DAI.

Em nenhum dos 70 camundongos inoculados com os preparados tissulares de ovos das codornas infectadas foi observado qualquer sinal indicativo da presença do *T. gondii*, assim como também não foram observadas quaisquer formas do parasito nos lavados peritoneais desses animais. O mesmo acontecendo com os ovos das codornas controles. Resultado semelhante foi descrito por PARENTI *et alii* (1986), que não conseguiram isolar *T. gondii* em camundongos inoculados com ovos de canários com toxoplasmose. Entretanto, KINJO (1961) e JACOBS & MELTON (1966), assinalaram a presença do parasito em ovos de galinhas inoculados em camundongos. Apesar de não ser observado neste trabalho, o consumo de ovo cru continua sendo considerado como fonte de infecção do *T. gondii* não só para os animais, mas também para o homem.

Todos os camundongos inoculados com órgãos de codornas infectadas com a cepa SERO-47 foram negativos sorologicamente para IgG no teste de hemaglutinação indireta.

Quatro animais inoculados com a cepa 'P', previamente considerados positivos na bioprova e que sobreviveram a infecção, foram sorologicamente positivos para IgG (1:16) no teste de hemaglutinação indireta. Por outro lado, todos os animais negativos na bioprova também foram negativos na sorologia.

## SUMÁRIO

Cento e dez codornas foram divididas em quatro grupos. Dois grupos, com 30 animais cada, foram inoculados com  $10^4$  e  $10^6$  taquizoítas/animal da cepa SERO-47 do *Toxoplasma gondii*. O terceiro grupo consistia de 20 animais que foram inoculados com  $10^5$  taquizoítas/animal da cepa 'P' do mesmo parasito. O último grupo, com trinta animais, foi inoculado com solução salina 0,9%, controle. Cinco codornas por grupo foram sacrificadas nas datas determinadas. Taquizoítas foram observados a partir do 7º DAI, com maior frequência no fígado, pulmões e baço, sendo mais facilmente encontrados nos animais inoculados com a cepa 'P'. No 70º DAI não foram observados parasitos em nenhuma das codornas infectadas com a cepa SERO-47, enquanto que as codornas infectadas com a cepa 'P' apresentaram cistos sem reação inflamatória no cérebro e coração. Taquizoítas da cepa 'P' mediram  $5,81 \pm 0,53$  por  $2,29 \pm 0,29$ , mais largos que os da cepa SERO-47, que mediram  $3,57 \pm 0,44$  por  $1,73 \pm 0,31$ . No biensaio, os animais infectados com a cepa SERO-47 foram positivos apenas no 3º e 7º DAI, enquanto os infectados com a cepa 'P' no 3º, 7º, 14º e 70º DAI. Esses resultados demonstraram as diferenças comportamentais das duas cepas no mesmo hospedeiro.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Toxoplasma gondii*, comportamento biológico, codorna, *Coturnix coturnix japonica*, cepa 'P' e SERO-47.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, G.R., MUNHOZ, A.D., MEDEIROS, S.M. de, FLAUSINO, W. & LOPES, C.W.G. (1996). Distribuição do *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) em órgãos de camundongos albinos inoculados com uma amostra acistogênica: Dados preliminares. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 3:67-68.
- BJERKÅS, I., JENKINS, M.C. & DUBEY, J.P. (1994). Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clinical Diagnostic Laboratorial Immunology*. 1: 214-221.



- BLOOMFIELD, M.M. & REMINGTON, J.S. (1970). Comparison of Three Strains of *Toxoplasma gondii* by Polyacrilamide-Gel Electrophoresis. *Tropical Geography Medicine*. 22:367-370.
- CHARIF, H., DARCY, F., TORPIER, M.F.C.D. & CAPRON, A. (1990). *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Experimental Parasitology*. 71:114-124.
- DUBEY, J.P., GOODWIN, M.A., RUFF, M.D., KWOK, O.C.H., SHEN, S.K., WILKINS, G.C. & THULLIEZ, P. (1994). Experimental toxoplasmosis in japanese quail. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 6:216-221.
- DUBEY, J.P., RUFF, M.D., CAMARGO, M.E., SHEN, S.K., WILKINS, G.L., KWOK, O.C.H. & THULLIEZ, P. (1993). Serological and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *American Journal Veterinary Research*. 54: 1668-1672.
- FLAUSINO, W. (1999). Infecção experimental em codornas (*Coturnix coturnix japonica*) com endozoítas de *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). Seropédica, Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 92 p. (Tese de Doutorado).
- FLAUSINO, W., SOARES, C.O., FREIRE, R.B. & LOPES, C.W.G. (1997). Caracterização protéica de uma amostra acistogênica de *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) isolado de galinha naturalmente infectada. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 19:110-112.
- FLAUSINO, W., SOARES, C.O., FREIRE, R.B. & LOPES, C.W.G. (1998). Variações intraespecíficas de taquizoítos do *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) isolados de uma infecção natural e comparadas frente a cepa congênita. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 5:63-67.
- FRENKEL, J.K. (1990). Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 196:233-240.
- JACOBS, L. & MELTON, M.L. (1966). Toxoplasmosis in chickens. *Journal Parasitology*. 52:1158-1162.
- JONES, F.E., MELTON, M.L., LUNDE, M.N., EYLES, D.E. & JACOBS, L. (1959). Experimental toxoplasmosis in chickens. *Journal Parasitology*. 45:31-37.
- KANETO, C.N., COSTA, A.J., PAULILLO, A.C., MORAES, F.R., MURAKAMI, T.O. & MEIRELES, M.V. (1997). Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Veterinary Parasitology*. 69:203-210.
- KAUFMAN, H.E., REMINGTON, J.S. & JACOBS, L. (1958). Toxoplasmosis: the nature of virulence. *American Journal Ophthalmology*. 46:255-261.
- KINJO, T. (1961). Studies on experimental toxoplasmosis in chickens. *Japanese Journal Veterinary Research*. 9:125-126.
- MEDEIROS, S.M. de & LOPES, C.W.G. (1996). Pleomorfismo de uma amostra acistogênica de *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) isolado de uma galinha naturalmente infectada. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 18:71-73.
- PARENTI, E., CERRUTI, S.S., TURILLI, C. & CORAZZOLA, S. (1986). Spontaneous toxoplasmosis in canaries (*Serinus canaria*) and other small passerine cage birds. *Avian Pathology*. 15:183-197.
- SANTORO, F., AFCHAIN, D., PIERCE, R., CESBRON, Y., OVLAQUE, G. & CAPRON, A. (1985). Serodiagnosis of *Toxoplasma* Infection Using a Purified Parasite Protein (P30). *Clinical Experimental Immunology*. 62:262-269.
- SIBLEY, L.D. & SHARMA, S.D. (1987). Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infection and Immunity*. 55:2137-2141.
- VERHOFSTEDE, C., VAN GELDER, P. & RABAEY, M. (1988). The infection-stage-related IgG response to *Toxoplasma gondii* studied by immunoblotting. *Parasitology Research*. 74:516-520.
- WARE, P.L. & KASPER, K.H. (1987). Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*. 55:778-783.