

PATOGENICIDADE PARA CAMUNDONGOS DO *TOXOPLASMA GONDII* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909 (APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE) ISOLADO DE GALINHAS NATURALMENTE INFECTADAS

CATHIA MARIA SERRA PEIXOTO¹ & CARLOS WILSON G. LOPES²

(1) Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil; (2) Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23.851-970 Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

SUMÁRIO: A maioria dos camundongos, nos quais obteve-se o isolamento do *Toxoplasma gondii* a partir do cérebro e coração de galinhas naturalmente infectadas, tiveram como sinais clínicos apatia, taquipnéia, dorso arqueado, pêlos arrepiados e morreram entre o 12º e o 21º dia pós-inoculação (DPI). A necropsia, o órgão mais afetado foi o pulmão. Cistos foram observados no cérebro desses animais após o 12º DPI. Taquizoítas foram vistos no pulmão dos camundongos que morreram naturalmente a partir do 12º DPI. No exame histológico, observou-se como lesão constante, pneumonia intersticial difusa, geralmente associada à presença do parasito. No cérebro não se encontrou qualquer reação inflamatória ao redor dos cistos, apesar de se observar em um dos camundongos pequenos focos de gliose. No fígado observaram-se microgranulomas, necrose e hemorragia acompanhada por infiltrado mononuclear.

PALAVRAS-CHAVE: Patogenicidade, *Toxoplasma gondii*, galinhas, camundongos.

INTRODUÇÃO

Na maioria das espécies infectadas pelo *Toxoplasma gondii*, raramente tem se observado doença clínica. No entanto, a toxoplasmose tem sido uma constante preocupação, em função da gravidade das lesões que podem ocorrer nas primoinfecções em fêmeas gestantes e, também, da grande capacidade que possui o parasito de se multiplicar em pacientes imunodeprimidos.

Surtos de toxoplasmose em galinhas já foram descritos (ERICHSEN & HARBOE, 1953; NÓBREGA *et alii*, 1955). Entretanto, nesta espécie animal o *T. gondii* raramente acha-se associado às manifestações clínicas (BICKFORD & SAUNDERS, 1966). Por outro lado, isto não exclui a possibilidade destes animais abrigarem o protozoário, já que tem sido reportada a persistência do mesmo em galinhas aparentemente saudáveis (FOSTER *et alii*, 1969; PEIXOTO & LOPES, 1990).

Estudos sobre a patogenicidade de cepas de *Toxoplasma* têm sido realizados em camundongos (DUBEY & FRENKEL, 1973; DUBEY, 1980). Algumas cepas tem sido fatais, mesmo em baixas doses, para camundongos, en-

quanto outras não causam doença aparente (BEVERLEY, 1976).

Este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento, bem como a patogenicidade para camundongos de amostras de *T. gondii* isoladas de órgãos de galinhas naturalmente infectadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas para o estudo amostras de *T. gondii* isoladas do cérebro e coração de 6 galinhas (*Gallus gallus*) naturalmente infectadas. Estas aves eram criadas livremente, alimentando-se no solo, em contato com outros animais, sendo provenientes do Município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Os animais utilizados para o isolamento eram camundongos albinos jovens, de ambos os sexos, procedentes do Biotério Central do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro foram acondicionados em caixas plásticas com água e ração *ad libitum*.

Para o isolamento do *T. gondii*, os fragmentos de cérebro e coração das galinhas foram isoladamente triturados em gral e pistilos estéreis, homogeneizados em 10 ml de solução salina estéril a 0,9% e filtrados através de gaze estéril de 4 camadas. A suspensão de cada órgão foi inoculada subcutaneamente nos camundongos. Foram utilizados 2 camundongos para cada suspensão de órgão, sendo que cada animal recebeu 1 ml de inóculo. Assim, 24 camundongos foram inoculados e outros 12 camundongos foram utilizados como controles.

Cada animal foi observado durante um período de 30 dias pós-inoculação (DPI), anotando-se a sintomatologia e, em caso de morte neste período, foi realizada necropsia e pesquisa do protozoário. Esta última foi feita através dos exames a fresco e esfregaços de cérebro, principalmente para pesquisa de cistos e impressões de pulmão, com o objetivo de se visualizar taquizoítas. Tanto os esfregaços de cérebro como as impressões de pulmão foram secas ao ar, fixadas com álcool metílico por 3 minutos e coradas pelo Giemsa por 30 minutos.

Para o exame histológico, fragmentos de cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rim dos camundongos foram coletados, fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, cortados em micrótomo e corados pela hematoxilina-eosina (HE). Alguns cortes histológicos foram corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS).

Após o período de 30 dias de observação, todos os animais sobreviventes foram sacrificados e seus cérebros examinados como descrito acima, sendo que somente um deles foi sacrificado aos 92° DPI.

RESULTADOS

De um total de 24 camundongos inoculados obteve-se o isolamento de *T. gondii* em 20 camundongos. Apenas 4, inoculados com cérebro de 2 aves, bem como os controles, foram negativos.

A maioria dos camundongos adoeceu entre o 11° e o 20° DPI. Em 2 casos os animais morreram sem se observar sinais clínicos. Em todos os animais que adoeceram observou-se apatia, taquipnéia, dorso arqueado e pêlos arrepiados. Em quatro dos animais, o emagrecimento foi marcante e em somente um camundongo foi constatado abdômen dilatado.

A morte natural dos camundongos ocorreu, geralmente, entre o 12° e o 21° DPI. Apenas um camundongo morreu naturalmente no 27° DPI. Já 3 camundongos, apesar de terem sinais clínicos da doença, sobreviveram e foram então sacrificados, dois no 30° DPI e um no 92° DPI.

As principais alterações macroscópicas encontradas nos camundongos estavam localizadas no pulmão. Os pulmões apresentaram-se volumosos e com superfície translúcida. Em apenas dois camundongos verificou-se hemotórax com aderência à pleura parietal. De maneira geral, hepatoesplenomegalia fazia-se presente e o conteúdo do intestino delgado era líquido e de coloração alaranjada ou avermelhada. Apenas em um animal observou-se exsudato serofibrinoso na cavidade abdominal, estando a fibrina aderida à superfície do fígado e do baço.

Os cistos puderam ser visualizados no cérebro dos camundongos a partir do 13° DPI. Estas estruturas estavam ausentes em 5 camundongos, dos quais dois morreram no 12° DPI, 2 no 16° DPI e 1 no 17° DPI. Tanto no exame a fresco como no esfregaço de cérebro, os cistos eram esféricos ou subesféricos, de diferentes tamanhos contendo aglomerados de bradizoítas envoltos por uma fina membrana (Figura 1).

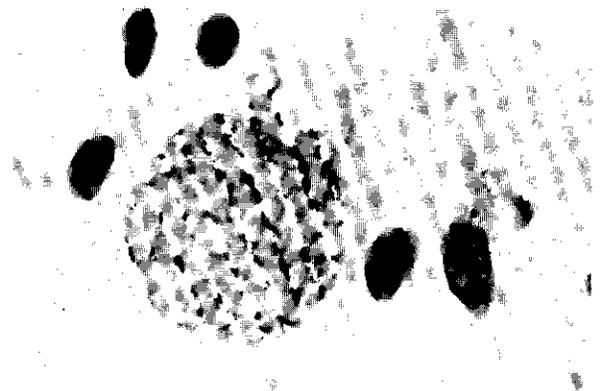


Fig. 1 - Cisto de *Toxoplasma gondii* em esfregaço de cérebro de um camundongo. Giemsa (1200X).

Os taquizoítas foram verificados no pulmão dos camundongos mortos naturalmente a partir do 12° DPI, estando ainda presentes em 2 camundongos que adoeceram e foram sacrificados no 30° DPI. Nos 2 camundongos que morreram no 27° DPI e 92° DPI não foram encontrados taquizoítas nos pulmões. Na maior parte dos casos das impressões de pulmão, o *T. gondii* foi verificado extracelularmente, podendo ser visto isoladamente ou formando pequenos ou grandes aglomerados de organismos. Porém, poucas vezes foi visto intracelularmente.

Ao exame histológico, *T. gondii* foi encontrado no cérebro sob a forma de cistos e ao redor destes não se observou qualquer reação inflamatória (Figura 2). Em alguns ani-

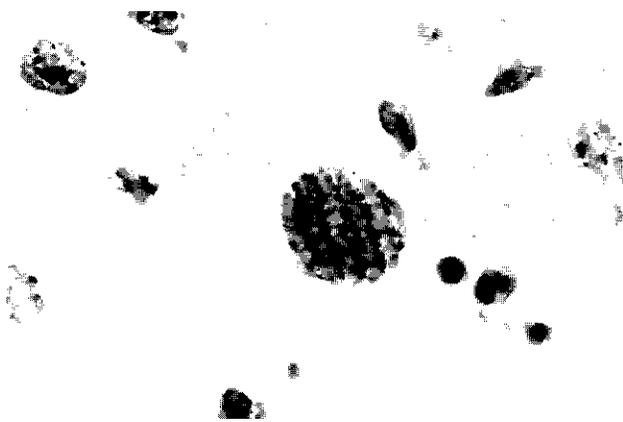


Fig. 2 - Cisto de *Toxoplasma gondii* em cérebro de um camundongo, sem reação inflamatória a seu redor. H.E. (1200X).

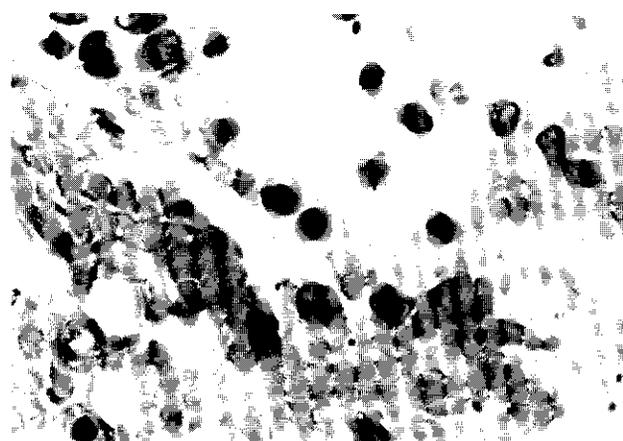
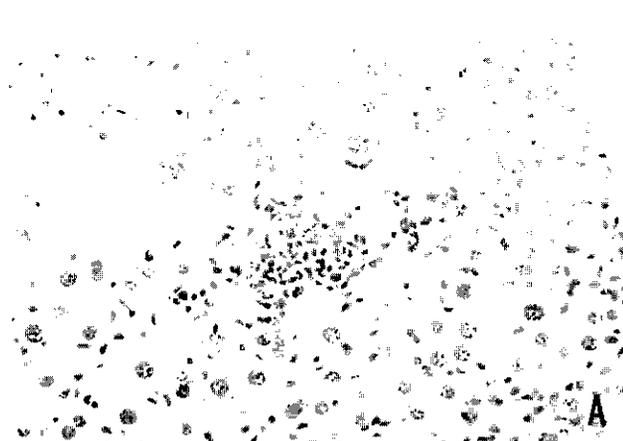
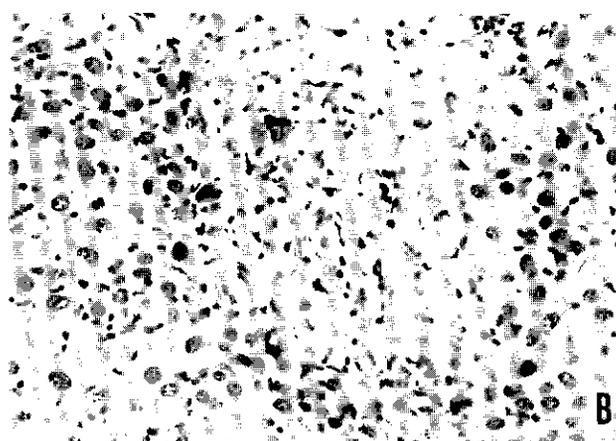


Fig. 3 - Pulmão de um camundongo inoculado com *Toxoplasma gondii*. Presença de intensa reação inflamatória, H.E. (1200X).

menores, focos de gliose foram observados. Os cistos, quando corados com HE, apareceram como estruturas bem definidas e quando corados com PAS foram facilmente visíveis em pequeno aumento, com os bradizoítas corando-se de vermelho brilhante com grânulos PAS positivos no seu interior. Em todos os casos examinados o pulmão ficou comprometido, sendo bastante freqüente a presença do parasito neste órgão. A lesão observada no pulmão foi constante e constituiu-se de pneumonia intersticial difusa (Figura 3). O interstício encontrava-se infiltrado por macrófagos e neutrófilos e os espaços alveolares preenchidos por macrófagos, neutrófilos, células epiteliais descamadas e algumas vezes por algumas hemácias e por substância eosinofílica. O *T. gondii* pôde ser visto livremente no interior dos alvéolos, ou intracelularmente dentro de macrófagos soltos no espaço alveolar, ou em células endoteliais ou pneumócitos. Estruturas semelhantes a cistos também foram visualizadas e quando corados pelo PAS foram positivas. Constantemente havia infiltrado mononuclear com presença de alguns neutrófilos entre as fibras cardíacas e, algumas vezes, a lesão estava associada à degeneração de fibras cardíacas. Em um caso, estruturas semelhantes a cistos com formas do *T. gondii* bem definidas puderam ser vistas parasitando fibras cardíacas. Apesar de não haver alterações microscópicas aparentes no baço, o parasito foi visto em células reticulares em um dos animais. Em geral, o fígado foi um órgão bastante alterado, onde observou-se microgranulomas disseminados por todo o parênquima e infiltrado inflamatório constituído principalmente por células mononucleares no interior dos sinusóides (Figura 4). Algumas vezes foram notados focos de necrose acompa-



(A)



(B)

Fig. 4 - Fígado de um camundongo inoculado com *Toxoplasma gondii*. (A) Presença de microgranulomas; (B) Necrose. H.E. (400X).

nhados de hemorragia e acúmulos de células mononucleares em volta dos vasos sanguíneos. No rim somente havia pequenos infiltrados de células mononucleares.

DISCUSSÃO

Provavelmente as galinhas não são consideradas animais importantes na transmissão da toxoplasmose humana, já que geralmente são consumidas fritas ou bem cozidas (BOCH, 1980; DUBEY, 1986). No entanto, as galinhas podem funcionar como hospedeiros intermediários, até mesmo para filhotes de gatos, uma vez que é comum as pessoas oferecerem vísceras e cabeça de galinhas a gatos e cães (RUIZ & FRENKEL, 1980).

BEVERLEY (1976) relatou que a maioria das cepas do *T. gondii* que ocorre na natureza é de baixa virulência, pois se encista e freqüentemente não mata o animal. No entanto, DUBEY (1980) considerou que, em infecções experimentais, as cepas patogênicas matam o camundongo dentro de 15 dias, enquanto cepas pouco patogênicas podem determinar a morte dentro de 1 a 2 meses. Geralmente, o tempo de morte é menor após inoculação intraperitoneal do que após inoculação subcutânea (FRENKEL, 1973). Desta maneira, o parasito isolado das galinhas utilizadas neste trabalho foi fatal para a maioria dos camundongos, nos quais obteve-se o isolamento, após inoculação subcutânea, matando 17 dos 20 camundongos, sendo que 16 animais morreram entre o 12° e o 21° DPI. Apenas um morreu no 27° DPI.

Após a inoculação intraperitoneal com a cepa GT-1 do *T. gondii*, isolada da musculatura de caprino, DUBEY (1980) encontrou taquizoítas no pulmão dos camundongos mortos entre o 16° e o 22° e mesmo no 34° DPI, resultados que se assemelham aos dados obtidos, em que os taquizoítas foram observados no pulmão dos camundongos sacrificados entre o 12° e o 30° DPI. Por outro lado, DUBEY & FRENKEL (1973), com a cepa M7741 deste parasito, isolada do diafragma de ovino, observaram que os taquizoítas começavam a desaparecer do pulmão entre o 14° e o 16° DPI.

Com relação aos cistos do *T. gondii*, verificou-se que estes cistos foram facilmente observados no cérebro a partir do 13° DPI, na maioria dos camundongos. DUBEY & FRENKEL (1973), utilizando a cepa M7741, encontraram os cistos no cérebro dos camundongos, principalmente durante a 3ª semana de infecção; já com a cepa GT-1, DUBEY (1980) observou que a maioria dos camundongos morreu antes que os cistos pudessem ser encontrados nos cérebros e, mesmo naqueles camundongos que morreram tardiamente, entre o 21° e o 30° DPI, não foram observados cistos no cérebro.

O achado histopatológico mais constante foi um quadro de pneumonia intersticial difusa. FRENKEL (1973) também descreveu quadro semelhante, verificando que após inoculação subcutânea do *T. gondii*, o parasito se dissemina, atingindo os pulmões, resultando em pneumonia significativa e finalmente acometendo praticamente todos os órgãos, podendo ser fatal.

SUMMARY

Most of the mice infected from *Toxoplasma gondii* by feeding the brain and heart of the chicken naturally infected with that protozoan, showed apathy, tachypnea, crooked back and erected hairs. They died between 12 and 21 days after inoculation. At necropsy, the lung was the most affected organ. Cysts were observed in the brains of these animals after the 12th day post inoculation. Tachizoites were seen in the lungs of mice that died naturally after the 12th day post inoculation. Histological examinations showed as a constant lesion, a diffuse interstitial pneumonia that was generally associated with the presence of the parasites. In the brain, no inflammatory reaction was found around cysts, although small foci of gliosis were detected in one mouse. In the liver some micro-granulomes were observed, also necrosis, and hemorrhage accompanied by mononucleosis infiltration.

KEY WORDS: Pathogenicity, *Toxoplasma*, mice, chickens.

REFERÊNCIAS

- BEVERLEY, J.K.A. (1976). Toxoplasmosis in animals. *Vet. Rec.*, 99:123-127.
- BICKFORD, A.A. & SAUNDERS, J.R. (1966). Experimental toxoplasmosis in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 27:308-318.
- BOCH, J. (1980). Die Toxoplasmose der Haustiere-Vorkommen, Diagnose und hygienische Bedeutung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 93:395-391.
- DUBEY, J.P. (1980). Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from a goat. *Am. J. Vet. Res.*, 41:427-429.
- DUBEY, J.P. (1986). Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189:166-170.
- DUBEY, J.P. & FRENKEL, J.R. (1973). Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J. Parasitol.*, 59:505-512.
- ERICIASEN, S. & HARBOE, A. (1953). Toxoplasmosis in chickens. I. An epidemic outbreak of toxoplasmosis in a

- chicken flock in South-eastern Norway. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 33:56-71.
- FOSTER, B.G., FORREST, R.G. & BLANCO, J.K. (1969). Isolation of *Toxoplasma gondii* from naturally infected chickens. *Texas J. Sc.*, 20:323-328.
- FRENKEL, J.K. (1973). Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: HAMMOND, D.M. & LONG, P.L. *The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and Related Genera*. University Park-Press. Baltimore, USA. 482 p.
- NÓBREGA, P., TRAPP, E.E. & GIOVANNONI, M. (1955). Toxoplasmose espontânea de galinha. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, 22:43-49.
- PEIXOTO, C.M.S. & LOPES, C.W.G. (1990). Isolamento do *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) em galinhas naturalmente infectadas. *Univ. Fed. Rur. Rio de J.*, 13:105-111.
- RUIZ, A. & FRENKEL, J.R. (1980). Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29:1161-1166.

(Received 01 March 1994, Accepted 17 August 1995)