

## **ISOLAMENTO E ESTUDO BIOLÓGICO DE CEPAS DE *Toxoplasma gondii* DE CARNE DE GALINHAS PROVENIENTES DA REGIÃO URBANA DE GOIÂNIA.**

**VASCONCELOS**, Fábio Faria<sup>1</sup>; **ALVES**<sup>2</sup>, Eduardo da Costa; **ALEIXO**<sup>3</sup>, Fabiana Santiago; **HERZOG-SOARES**, Joanna D'arc Aparecida<sup>4</sup>

Palavras-chaves: *Toxoplasma gondii*, galinhas, isolamento, biologia.

### **1. INTRODUÇÃO**

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns mundialmente. A sua prevalência pode variar de região, conforme hábitos socioculturais, fatores geográficos e climáticos (TENTER et al., 2000). Os seres humanos infectam-se principalmente ingerindo cistos de carne mal cozida, além do alimento ou água contaminados com os oocistos liberados nas fezes do gato contaminado (DUBEY, 2002). O presente trabalho tem como objetivo pesquisar a presença do *T. gondii* em amostras de carne de aves para consumo provenientes da região urbana de Goiânia, determinar a capacidade de infectividade e virulência dos isolados, bem como, obter conhecimentos que possam subsidiar as autoridades de Vigilância Sanitária e demais autoridades da saúde no controle da toxoplasmose no Estado.

### **2. METODOLOGIA**

**2.1 – Amostragem:** Foram avaliadas 100 amostras, (50 cérebros e 50 corações) de 50 galinhas “caipira”, obtidas em cinco feiras da região urbana de Goiânia.

**2.2 – Processamento das amostras e inoculação:** As amostras de coração (15g), foram cortadas e submetidas à digestão péptica. Desta solução 0,5 ml foi inoculado por via intraperitoneal em cinco camundongos Swiss, com média de dois meses de idade e pesando aproximadamente 25g. As amostras de cérebro foram maceradas em solução salina, sendo o produto filtrado em gaze estéril e centrifugado a 4000rpm durante 10 minutos e o sedimento foi ressuspensionado em 5 ml de salina.

**2.3 – Isolamento dos parasitas:** Os camundongos foram observados diariamente, sendo sacrificados após 60 dias, realizada punção cardíaca e o soro separado para teste sorológico. Os animais foram necropsiados o cérebro e o coração retirados, macerados (separadamente) diluídos em 2,5 ml de solução salina e inoculados em cinco camundongos. Os camundongos que apresentaram sinais clínicos da doença foram sacrificados e feito pesquisa de taquizoítas no exsudado peritoneal. Confirmada a presença de taquizoítas, o exsudado foi inoculado em camundongos (0,5ml/animal) que foram observados diariamente, e sacrificados quando apresentaram sinais da infecção.

**2.4- Criopreservação dos parasitas:** Após cinco reinoculações em camundongos, o exsudado peritoneal contendo os taquizoítas foi centrifugado à 3000rpm por cinco minutos, o sedimento ressuspensionado em 9ml de salina, adicionado 1ml de DMSO e homogeneizado lentamente. O material foi acondicionado em criotubos, congelados em freezer à -80°C e após 18 horas, transferido para o nitrogênio líquido.

**2.5- Estudo da virulência dos isolados 33A, 33B e 41A:** Foi realizado o estudo da virulência dos isolados 33A, 33B e 41A assim como da cepa controle RH. Esses foram inoculados i.p. em grupos de cinco camundongos nas diluições de  $1 \times 10^1$ ;  $1 \times 10^2$ ;  $1 \times 10^3$ ;  $1 \times 10^4$ ;  $1 \times 10^5$  parasitas. Os camundongos que não morreram até

sessenta dias foram sacrificados. Após a morte os animais foram necropsiados, e o cérebro e os órgãos retirados para análise histopatológica.

**2.6- Soroprevalência de *T. gondii* em *G. domesticus*:** A sorologia foi realizada através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT). Taquizoítas foram suspensos em formalina (6%) diluída em PBS 1:5. Em microplacas de ELISA foi distribuído em cada poço 50 µL de 2-mercaptoetanol diluído em PBS. O soro foi diluído em 1:10 e 1:20. Os parasitas em formaldeído 6% foram ressuspensos em tampão alcalino (7,02g de NaCl , 3,09g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> , 24ml de 1N de NaOH , e 4g de albumina do plasma bovino, e água destilada suficiente para completar 1L; pH 8,7). A concentração deles foi ajustada em 2 x10<sup>4</sup> parasita/µL. Depois de diluir o soro, 50µL da suspensão do antígeno foi distribuído em cada poço. As placas foram gentilmente agitadas para completar a mistura encubada por 12 horas a 30°C.

**2.7- Soroprevalência de *T. gondii* em camundongos:** A sorologia foi realizada através da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI). A técnica foi realizada com soros diluídos em PBS 0.01M pH 7.2, testando-se diluições de 1:16 e 1:32. Foi usado soro conjugado fluorescente anticamundongo na diluição de 1:200 para os conjugados anti-IgM e anti-IgG de camundongo. O soro foi considerado positivo quando mostrou uma fluorescência completa do parasita em diluições iguais ou superiores a 1:16.

**2.8- Análise histológica do cérebro e coração de *G. domesticus*:** Foram realizados cortes histológicos de cérebro e coração das aves. A coloração empregada foi a hematoxilina-eosina (HE). Foram feitas a desparafinização em xilol, hidratação em uma bateria de álcool decrescente até água destilada, coloração com hematoxilina, lavagem em água corrente, Coloração com eosina, desidratação em bateria de álcool crescente, diafanização em xilol, montagem da lâmina.

### 3 – RESULTADO E DISCUSSÃO

Das 50 galinhas estudadas, foram encontrados anticorpos para *T. gondii* no soro de 27(54%), sendo observados títulos de 1:10 em 10 e 1:20 em 17 galinhas. Foi possível identificar em 9 amostras, a presença de estruturas morfológicamente compatíveis com cistos de *T. gondii* , sendo 6 em amostras de cérebro e 3 em amostras de coração. Das 54 amostras positivas, em seis (11,1%) os camundongos apresentaram sintomas de fase aguda da doença, sendo em todos observado a presença de taquizoítas no lavado peritoneal. Do total de isolados positivos, quatro (66,7%) eram provenientes de coração e duas (33,3%) de cérebro de galinha. Anticorpos para *T. gondii* foram encontrados em camundongos inoculados provenientes de 21 amostras das 54 amostras de galinhas soropositivas para *T. gondii*. Na soroprevalência de *T. gondii* nesses camundongos foram observados os títulos 1:16 (03) e 1:32(03) para IgM e o título 1:16 (14) e 1:32 (1) para IgG. As cepas isoladas 33A e 33B apresentaram uma virulência bastante semelhante à apresentada pela cepa RH, o isolado 41A apresentou uma menor virulência visto que a média de tempo de mortalidade foi maior e a mortalidade foi menor em relação à cepa RH.

Em nossos estudos o *T. gondii* foi isolado de quatro amostras de coração e duas de cérebro de galinha de um total de 54 amostras de aves soropositivas corroborando com os relatos da literatura (Dubey *et al.*, 2004, Dubey *et al.*, 2005b). No entanto o número de camundongos e a quantidade das amostras utilizadas pode ter afetado os resultados, visto que apenas 2/3 dos cérebros e corações foram

utilizados no bioensaio. O sucesso do isolamento depende do número de camundongos inoculados, da quantidade de tecido no bioensaio e da concentração de parasitas na amostra de tecido. Nos experimentos em que houve o isolamento de *T. gondii* não houve a mortalidade de todos animais, o que pode ser justificado pela presença de poucos parasitas no tecido inoculado. Isso pode significar que apenas uma porção de bradizoítas foi liberada do cisto durante a digestão péptica (coração) ou maceração com salina (cérebro) e continuou mantendo-se viável para infectar (Dubey *et al.*, 2005a). Segundo Dubey e Beattie (1988), a virulência do *T. gondii* depende de vários fatores, incluindo o estágio do parasita inoculado, a via de inoculação/ infecção, a dose, o tipo de camundongo utilizado e a cepa do parasita.

#### 4- CONCLUSÃO

Nas 50 aves estudadas foi encontrada uma prevalência para toxoplasmose de 54%. Destas foram isolados parasitas em seis amostras (11,1%), o que sugere baixa infectividade das amostras estudadas. A curva de parasitemia dos isolados estudados demonstrou que dois deles se apresentaram muito virulentos para camundongos, porém sendo capaz de cronificar (cistogênico) com baixo inóculo, demonstrando comportamento semelhante a cepas RH já caracterizada na literatura. Esse estudo aponta a galinha caipira como potencial transmissora da toxoplasmose para o homem no estado de Goiás, visto que obtivemos uma soroprevalência considerável para toxoplasmose nas aves estudadas.

#### 5- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1-220pp, 1988.

DUBEY J.P.; SAVILLE W.J.; STANEK J.F.; REED S.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. *J Parasitol.*, p.802-803, 2002.

DUBEY, J.P.; MORALES, E.S.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J. Parasitol.*, v.90, n.2, p.411-3, 2004.

DUBEY, J.P.; BHAIYAT, M.I. ; DE ALLIE, C. ; MACPHERSON, C.N.L. ; SHARMA, R.N. ;SREEKUMAR, C. ; VIANNA, M.C.B. ; SHEN, S.K. ; KWOK, O.C.H. LEHSMAN, T. isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens from Grenada, West Indies. *J. Parasitol.*, v.86, p. 960-971, 2005a.

DUBEY, J.P.; EDELHOFER, R. ; MARCET, P.L.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; LEHSMAN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. *Vet. Parasitol.*, v.97, p. 257-262, 2005b.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *J. Parasitol.*, v.30, n.12, p.217-258, 2000.

6- Fonte financiadora: Cnpq/ PIBIC

---

<sup>1</sup> Bolsista de Iniciação Científica. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- IPTSP, [ffv15@yahoo.com.br](mailto:ffv15@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Mestrando/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-IPTSP, [baggiobio@yahoo.com.br](mailto:baggiobio@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Mestranda/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-IPTSP, [fabialeixomestrado@yahoo.com.br](mailto:fabialeixomestrado@yahoo.com.br)

<sup>4</sup> Orientador/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- IPTSP, [joanna@iptsp.ufg.br](mailto:joanna@iptsp.ufg.br)