

SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* EM GALINHAS “CAIPIRAS” COMERCIALIZADAS EM GOIÂNIA: HISTOLOGIA E ENSAIO EM CAMUNDONGOS.

ALVES¹, Eduardo da Costa; ALEIXO, Fabiana Santiago; VASCONCELOS, Fábio de Faria; HERZOG-SOARES, Joanna D'arc²

Palavras-chave: Toxoplasmose, galinhas, epidemiologia

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

A toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais comuns no mundo (TENTER *et al.*, 2000), seu agente causal é o protozoário *Toxoplasma gondii* um parasito que desenvolveu diversas vias potenciais de transmissão, podendo parasitar virtualmente todos os animais homeotérmicos e os mais diferentes tipos celulares. O ciclo assexual do *T. gondii* consiste em dois estágios conhecidos, os taquizoítas de rápida divisão e os bradizoítas que se dividem mais lentamente. Ambos são aplóides e crescem exclusivamente no interior de células. Através de anticorpos monoclonais, é possível se classificar os isolados em dois ou três grupos demonstrando a diversidade antigênica encontrada no *T. gondii* (JENSEN *et al.*, 1998). Análises isoenzimáticas, as quais utilizaram seis sistemas diferentes, propuseram que *T. gondii* exibe uma população basicamente clonal, similarmente a muitos outros protozoários parasitas. Análises baseadas no Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) de seis loci independentes, amplificados por PCR, indicam que o *T. gondii* consiste em apenas três linhagens clonais designadas tipo I, II, III, os quais apresentam notável homogeneidade dentro de uma mesma linhagem, e ocorrem tanto em animais como em humanos (HOWE & SIBLEY, 1995). Estas três principais linhagens diferem em apenas 1-2% ao nível de seqüência de DNA.

O homem pode adquirir a infecção ainda no ventre da mãe ou após o nascimento. As principais fontes de infecção são: cistos em alimentos mal cozidos, alimentos e água contaminados com oocistos e ingestão acidental de oocistos no ambiente. A prevalência de *T. gondii* em galinhas “caipiras” é um bom indicador da contaminação do solo por oocistos devido ao hábito geofágico destas (DUBEY *et al.*, 2005). Este trabalho objetivou determinar a soroprevalência para *T. gondii* de galinhas vendidas em feiras livres de Goiânia, investigar a viabilidade deste através do isolamento de cepas a partir de órgãos destas aves.

2. METODOLOGIA

2.1 – Amostragem.

Foram coletadas aleatoriamente amostras de 50 galinha “caipira” vendidas em feiras livres de Goiânia, representada pelo sangue, a cabeça e o coração da galinha. O material foi acondicionado em bolsa térmica com gelo, a uma temperatura de aproximadamente 4°C e transportado para o laboratório onde foi processado.

2.2 – Processamento das amostras

As amostras de coração foram processadas segundo DUBEY (1998) onde, o material foi macerado em solução péptica, levado para banho Maria a 37°C por uma hora, filtrado em gaze estéril e centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 3mL de salina e centrifugado. Após a terceira lavagem, o material foi inoculado via intraperitoneal em cinco camundongos Swiss com idade entre 30 e 45 dias, sendo 0,5 mL em cada

animal. O cérebro por sua vez foi macerado em salina e filtrado em gaze estéril, sendo o material obtido inoculado em camundongos seguindo a mesma metodologia utilizada para o coração. Amostras de coração e cérebro foram guardadas em formol 10% para posterior análise histológica.

2.3 - Observação dos animais e isolamento de cepas:

Os animais inoculados foram observados diariamente, os que apresentaram sintomas de toxoplasmose aguda foram sacrificados e feito o lavado intraperitoneal para a busca de taquizoítas. Os isolados obtidos foram mantidos em camundongos e posteriormente criopreservados. Os camundongos sobreviventes, foram sacrificados após 60 dias e coletadas amostras de soro.

2.4- Testes sorológicos

2.4.1- Pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* no soro das aves

Foram coletadas amostras de sangue das 50 aves. Após coagulação sanguínea, o soro retirado, identificado e armazenado à -20°C até o momento do uso. O soro foi analisado pelo Teste de Aglutinação Modificado (MAT) como descrito por DESMONTS and REMINGTON (1980) onde, taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) foram centrifugados e posteriormente suspensos em formalina diluída em PBS 1:5 (6% solução formaldeído). Após 16 horas, este antígeno foi lavado três vezes em PBS, o material ressuspenso em tampão alcalino (7,02g de NaCl, 3,09g de H₃BO₃, 24mL de 1N de NaOH, 4g de albumina do plasma bovino, e água destilada suficiente para completar 1L; pH 8,7) e complementado com Azida Sódica 0,1%. A concentração de parasitos foi ajustada para 2x10⁴/μL e preservado a 4°C até o momento do uso. Em microplacas de ELISA (fundo em U) foram distribuídos em cada poço 50 μL de 2-mercaptoetanol diluídos em PBS (14mL/1L). O soro das aves passou por duas diluições (1:5 e 1:10), em seguida, 50μL da suspensão do antígeno foi distribuído em cada poço. As placas foram gentilmente agitadas para completar a mistura e foram então encubadas por 24 horas a 30°C, sendo feita a leitura no dia seguinte. O resultado foi considerado positivo quando se formou uma malha/tapete no poço devido à aglutinação, e negativo quando se formou um depósito devido à sedimentação no fundo do poço.

2.4.2- Pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* no soro dos camundongos

Os camundongos sobreviventes, foram sacrificados após 60 dias e tiveram seu soro retirado, este foi analisado pela Reação de Imunofluorescência indireta segundo CAMARGO (1973) para detecção de anticorpos antitoxoplasma. Foram considerados positivos, camundongos que apresentavam títulos iguais à 1:16, títulos menores foram considerados negativos.

2.5- Exame histológico

As amostras de coração e cérebro das galinhas foram retiradas do formol, em seguida passaram em bateria crescente de álcool para desidratar, diafanizados em xilol, impregnados e emblocados em parafina quente. Posteriormente foram confeccionados cortes com 5/μm de espessura e então corados com hematoxilina eosina (HE).

Foram realizados dez cortes histológicos do material em cada experimento com o objetivo de detectar formas de *T. gondii* nos tecidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Dos 50 soros de galinha testados, 27(54%) eram positivos (MAT \geq 1:5). Através da histologia dos órgãos das galinhas, foi possível identificar em dez amostras, a presença de estruturas morfológicamente compatíveis com cistos de *T. gondii*, sendo seis em amostras de cérebro e quatro em amostras de coração. Dos 54 experimentos com inóculo de órgãos de galinha soropositivas, em 20 (37%), houve a soroconversão de pelo menos um camundongo (RIFI \geq 1:16). Das 27 galinhas positivas, em duas (7,40%) foi feito o isolamento de *T. gondii*.

Dados sorológicos sobre a contaminação de galinha “caipira” por *T.gondii* vêm se acumulando na literatura. Na América do Sul foi encontrada taxa de positividade de 44% das aves estudadas na Colômbia (DUBEY *et al.*, 2005a), 26% no Peru (DUBEY *et al.*, 2004), 32% na Venezuela (DUBEY *et al.*, 2005b), na Argentina a taxa foi de 40% (DUBEY *et al.*, 2005c), enquanto que no estado do Paraná a taxa encontrada foi de 40%(Dubey *et al.*, 2003) e no estado do Amazonas 66%(DUBEY *et al.*, 2006). Todos os estudos foram realizados com o MAT sendo considerados positivos, os soros com títulos \geq 1:5. Concomitante ao estudo sorológico, tem sido realizado o isolamento de cepas através do inóculo do coração e cérebro destas galinhas, porém muitos fatores podem interferir no sucesso do isolamento, entre eles, o estágio do parasita inoculado, a via de inoculação/infecção, a dose, o tipo de camundongo utilizado e a cepa do parasito (DUBEY *et al.*, 2005). Embora o *T. gondii* tenha sido isolado de algumas galinhas com títulos através do MAT de 1:5, a probabilidade do isolamento aumenta com títulos mais elevados (DUBEY *et al.*, 1993).

Neste trabalho, a presença de camundongos soropositivos (RIFI \geq 1:16), mas que não apresentaram sintomas de infecção aguda, indica uma baixa virulência da cepa ou um baixo inóculo.

4.CONCLUSÕES:

Este trabalho encontrou uma alta taxa de positividade para *T. gondii* nas galinhas estudadas, isto sugere não apenas um papel importante destas como fonte de infecção, mas também aponta para um alto nível de contaminação do solo com oocistos de *T. gondii*. O isolamento de cepas demonstrou a infectividade destes parasitos em galinhas.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.10, p.143-71, 1973.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.*, v.11, n.6, p.562-68, 1980.

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.*, v.74, p.75-77, 1998.

DUBEY, J.P.; RUFF, M.D.; CAMARGO, M.E.; SHEN, S.K.; WILKINS, G.L.; KWOK, O.C.; THULLIEZ, P. Serologic and Parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, n.10, p.1668-72, 1993.

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; PRUDENCIO, L.B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M.C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.117, n.3, p.229-34, 2003.

DUBEY, J.P.; LEVY, M.Z.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; DAHL, E.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. Tissues distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *J. Parasitol.*, v.90, n.5, p.1015-18, 2004.

DUBEY, J.P.; GOMEZ-MARIN, J.E.; BEDOYA, A.; LORA, A.; VIANNA, M.C.; HILL, D.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; MARCET, P.; LEHMANN, T. Genetic and Biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colômbia, South América. *Vet. Parasitol.*, v.134, n.1-2, p.67-72, 2005a.

DUBEY, J.P.; LENHART, A.; CASTILLO, C.E.; ALVAREZ, L.; MARCET, P.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in chicken from Venezuela: isolation, tissue distribution and molecular characterization. *J. Parasitol.*, v. 91, n.6, p.1332-4, 2005b.

DUBEY, J.P.; MARCET, P.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Argentina. *J. Parasitol.*, v.91, n.6, p.1335-9, 2005c.

DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.; VIANNA, M.C.; MARCET, P.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon. *J. Parasitol.*, v.92, n.1, p.36-40, 2006.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal Diseases. *J. Infect. Dis.*, v.172, p.1562-66, 1995.

JENSEN, L.; PETERSON, E.; HENRIKSEN, S. A.; DIETZ, H. H.; LIND, P. Monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii* strain 119 identify isolated Danish strains as one group. *Int. J. Parasitol.*, v.28, p.1305-1313, 1998.

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

SU, C.; HOWE, D. K.; DUBLEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, S. D. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proceedings. National Ac. Sc.*, v. 99, p.10753-58, 2002.

6-Fonte financiadora: Cnpq

¹Bolsista de mestrado, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- IPTSP,
baggiobio@yahoo.com.br

²Orientador/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- IPTSP,
joanna@iptsp.ufg.br