

Toxoplasma gondii: I. Avaliação da virulência de oito amostras*

Toxoplasma gondii: I. Evaluation of the virulence of eight strains

Regina MITSUKA¹; Andrea Cristina BECKNER DA SILVA²; Itamar Teodorico NAVARRO³; José Wander BREGANÓ³; Odilon VIDOTTO³

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Odilon Vidotto
Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva
Universidade Estadual de
Londrina
Caixa postal 6001
86051-970 – Londrina – PR
e-mail: vidotto@npd.uel.br

1 - Universidade de Marília – SP
2 - Universidade Estadual de
Maringá – PR
3 - Universidade Estadual de
Londrina – PR

RESUMO

Oito amostras de *T. gondii* - LIV IV, LIV V e S 11 isoladas de suínos, RH e VPS de seres humanos, AS 28 de camundongo, HV III de cão e CN de gato - foram inoculadas em camundongos suíços albinos e em coelhos com o objetivo de avaliar a virulência e a patogenicidade. As oito amostras apresentaram-se altamente virulentas para camundongos, matando todos os animais que receberam inóculo, via intraperitoneal, de 10⁴ taquizoítas, entre 6,0 e 7,8 dias, em média, após a inoculação. As amostras isoladas mais recentemente, LIV V e HV III (DL₅₀ de 7 e 15 taquizoítas, respectivamente) foram as mais virulentas. A amostra RH foi a que apresentou a menor virulência, com DL₅₀ de 3.160 taquizoítas. A amostra LIV V também se mostrou mais virulenta para coelhos, porém, como foram inoculados apenas 2 animais, estudos posteriores devem ser realizados para confirmar este achado.

UNITERMOS: *Toxoplasma gondii*; Patogenicidade; Animais de laboratório.

INTRODUÇÃO

Membro do filo Apicomplexa, o *Toxoplasma gondii*¹⁸ é um protozoário intracelular obrigatório que invade as células somáticas de muitas espécies de mamíferos e aves, inclusive do homem, causando a toxoplasmose, uma das zoonoses mais difundidas no mundo.

Amostras de *T. gondii*, isoladas de diferentes espécies animais, apesar de morfológicamente indistintas, exibem considerável variação na virulência e patogenicidade para animais de laboratório^{11,9}. Não existe até o momento uma classificação imunológica ou molecular para as várias amostras de *T. gondii*. As amostras têm sido diferenciadas através da virulência¹³, normalmente estabelecida, determinando-se a morbidade e mortalidade em camundongos de laboratório¹⁴, embora a virulência do parasita seja alterada pela passagem contínua numa mesma espécie animal¹².

As variações de virulência são mais evidentes apenas nas condições extremas, seja de malignidade, como é o caso da amostra RH que mata camundongos no estágio agudo da doença, seja de benignidade, representada pelas amostras ditas não patogênicas que permitem a sobrevivência prolongada dos camundongos por ela infectados (amostra 76K isolada por Laugier; Quilici¹⁵). A patogenicidade varia com os hospedeiros^{9,22}, com o estágio do parasita, via de inoculação e dose infectante⁹.

Amostras de *T. gondii* de procedências variadas, mantidas biologicamente através de passagens em camundongos suíços albinos foram estudadas com o objetivo de avaliar a virulência e patogenicidade para camundongos suíços albinos. Adicionalmente avaliaram-se também a virulência e a patogenicidade dessas amostras em coelhos.

MATERIAL E MÉTODO

No Quadro 1, estão relacionadas as oito amostras de *Toxoplasma gondii* estudadas. Desde o isolamento, até o momento da utilização nas diferentes etapas do trabalho, essas amostras foram mantidas em laboratório, através de passagens sucessivas em camundongos suíços albinos pela via intraperitoneal.

Para a manutenção, obtenção de taquizoítas e avaliação da virulência das amostras de *T. gondii*, foram utilizados camundongos suíços albinos, fêmeas jovens, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, PR.

A suspensão de taquizoítas utilizada nos testes de virulência foi obtida através da lavagem da cavidade peritoneal, de camun-

Quadro 1

Amostras de *Toxoplasma gondii* utilizadas nos experimentos, segundo a espécie de origem, local de procedência e fonte de referência.

| Amostra | Origem | Isolamento | |
|---------|----------------|---------------|--|
| | | Local | Ref. bibliográfica |
| RH | humana | EUA | Sabin ²⁰ , 1941 |
| VPS | humana | São Paulo, SP | Ishizuka, 1982 [*] |
| CN | gato (oocisto) | São Paulo, SP | Ogassawara, 1988 [*] |
| LIV IV | suíno | Londrina, PR | Navarro <i>et al.</i> ¹⁷ , 1992 |
| LIV V | suíno | Londrina, PR | Navarro <i>et al.</i> ¹⁷ , 1992 |
| S 11 | suíno | Erechim, RS | Martins <i>et al.</i> ¹⁶ , 1989 |
| AS 28 | camundongo | São Paulo, SP | Deane <i>et al.</i> ⁶ , 1971 |
| HV III | canino | Londrina, PR | Tudury <i>et al.</i> ²¹ , 1991 |

*comunicação pessoal.

* Trabalho financiado pelo CNPq e CPG/UDEL.

dongos que receberam, via intraperitoneal, inóculo de 0,2 ml de uma suspensão de taquizoítas vivos em solução fisiológica estéril.

Para a purificação da suspensão de taquizoítas, as amostras foram submetidas, primeiro, a uma centrifugação numa baixa rotação (1.000 rpm x 30 segundos em centrífuga clínica), após a qual os sobrenadantes foram filtrados em uma membrana de policarbonato - 3 µm (Nucleopore Corp.) e centrifugados 2 vezes a 2.500 rpm por 8 minutos. Os sedimentos foram então ressuspendidos em solução fisiológica e padronizados por contagem dos taquizoítas em câmara de Neubauer.

Cada amostra foi inoculada em grupos de 5 camundongos, fêmeas, de 45 dias, com inóculo de: 10, 10², 10³ e 10⁴ taquizoítas vivos, via intraperitoneal. O grupo controle recebeu apenas salina. Os animais foram mantidos numa sala fechada do setor de Isolamento do Hospital Veterinário da UEL. Foram feitas observações constantes e a hora da morte de cada camundongo foi observada. A DL₅₀ de cada amostra foi calculada segundo⁵. Os animais que sobreviveram foram sacrificados 50 dias após a inoculação, os cérebros foram macerados e examinados ao microscópio óptico para pesquisa de cistos e os soros submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta² (RIFI) para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

Foram inoculados 2 coelhos para cada amostra, fêmeas, com cerca de 90 dias de idade, provenientes de uma granja da região de Maringá, PR, sorologicamente negativos para toxoplasmose. Os coelhos receberam, via intraperitoneal, inóculo de 10⁶ taquizoítas vivos. Quando apareceram os sintomas da infecção, os animais foram tratados com sulfametoxazol (15 mg/kg) e trimetropim (3 mg/kg) durante 10 dias. As amostras que levaram os 2 coelhos a óbito foram inoculadas novamente em coelho com 10⁵ taquizoítas vivos. Quarenta e cinco dias após a inoculação, os animais foram sangrados através da punção cardíaca e o soro armazenado a -20°C até o momento do uso.

RESULTADOS

A mortalidade de camundongos e a DL₅₀ das amostras de *T. gondii* são apresentadas na Tab. 1. Todas as amostras mataram os 5 camundongos inoculados com 10⁴ taquizoítas, num período que variou, em média, de 6,0 dias para a LIV V e 7,8 dias para a RH. Nas demais concentrações de taquizoítas, os resultados variaram de amostra para amostra. A DL₅₀ variou de 3.160 taquizoítas para a amostra RH até 7 taquizoítas para a amostra LIV V.

Não foram observados cistos nos cérebros dos animais que sobreviveram à fase aguda da doença, nem mesmo foi possível a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* pela RIFI nos soros desses camundongos.

Os coelhos que receberam inóculo de 10⁶ taquizoítas vivos adoeceram dois a quatro dias após a inoculação, apresentando hipertermia, corrimento nasal, tosse, diarreia, conjuntivite, palidez de mucosas, anorexia e apatia, sintomas estes compatíveis com a toxoplasmose. Todos os animais foram tratados, mesmo assim os inoculados com as amostras RH, LIV IV, LIV V e VPS foram a óbito. Estas amostras que levaram os dois coelhos a óbito foram reinoculadas, na dose de 10⁵ taquizoítas por animal, utilizando-se um coelho por amostra. Nesta dose, apenas a amostra LIV V levou o animal a óbito, sendo novamente inoculada em mais um coelho, que por sua vez sobreviveu. Nas demais amostras (S11, HV III, CN e AS 28) dos dois coelhos inoculados por amostra, um foi a óbito e o outro sobreviveu.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Diferenças na virulência de amostras de *T. gondii* têm sido relatadas em vários estudos, através da inoculação em animais de laboratório. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a alta virulência das amostras analisadas, tanto em camundongos suíços albinos quanto em coelhos.

A inoculação de 10⁴ taquizoítas, em camundongos, foi letal para todos os animais inoculados entre 6,0 e 7,8, em média, após inoculação. As amostras mais virulentas foram LIV V, HV III e AS 28, que apresentaram DL₅₀ inferior a 50 taquizoítas, seguidas da LIV IV, S 11, VPS, sendo que as amostras CN e RH foram as menos virulentas, com DL₅₀ superior a 2 x 10³ taquizoítas (Tab. 1).

Tabela 1

DL₅₀ e mortalidade de camundongos suíços albinos que receberam inóculo de diferentes amostras de *Toxoplasma gondii*, Londrina – PR, 1994.

| Amostras | DL ₅₀ | nº de taquizoítas inoculados por camundongo* | | | | | | | |
|----------|------------------|--|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
| | | D m/s | | D m/s | | D m/s | | D m/s | |
| RH | 3160 | 7,8 | 5/0 | 0 | 0/5 | 0 | 0/5 | 0 | 0/5 |
| CN | 2370 | 7,4 | 5/0 | 9,4 | 1/4 | 0 | 0/5 | 0 | 0/5 |
| VPS | 315 | 6,4 | 5/0 | 8,4 | 5/0 | 0 | 0/5 | 0 | 0/5 |
| S 11 | 315 | 7,2 | 5/0 | 9,1 | 5/0 | 0 | 0/5 | 0 | 0/5 |
| LIV IV | 150 | 7,4 | 5/0 | 10,0 | 5/0 | 8,8 | 2/3 | 0 | 0/5 |
| AS 28 | 30 | 7,4 | 5/0 | 7,7 | 5/0 | 9,1 | 4/1 | 8,7 | 1/4 |
| HV III | 15 | 7,6 | 5/0 | 8,9 | 5/0 | 8,2 | 5/0 | 8,6 | 2/3 |
| LIV V | 7 | 6,0 | 5/0 | 8,8 | 5/0 | 7,6 | 5/0 | 8,6 | 3/2 |

* = cinco camundongos foram inoculados, intraperitonealmente, para cada concentração de taquizoítas; d = média do dia da morte; m/s = camundongos mortos/sobreviventes.

A amostra RH é a mais comumente utilizada em vários laboratórios de pesquisa no mundo. Esta amostra é conhecida pela sua alta virulência^{14,19} e incapacidade de produzir cistos e oocistos¹⁰. No presente trabalho, a amostra RH não matou os camundongos em doses inferiores a 10⁴ taquizoítas (DL₅₀ 3160). Enquanto De La Cruz *et al.*⁷ determinaram a DL₅₀ para camundongos CF1 e Balbc de 18 e 32 taquizoítas respectivamente, Darde *et al.*⁴ observaram que a inoculação de apenas 10 taquizoítas levou a óbito camundongos suíços fêmeas em 8,9 dias em média. Derouin; Garin⁸ observaram que 10⁴ taquizoítas levaram à morte camundongos suíços entre 6 e 8 dias, enquanto com 10² as mortes ocorreram entre 7 e 9 dias. Essas diferenças provavelmente se devem a variações intrínsecas na relação parasita-hospedeiro, entre as diversas linhagens dos hospedeiros utilizados nos diferentes experimentos⁵. Recentemente foi demonstrado o controle genético da indução de encefalite toxoplásmica pela ativação de cistos, por Brown; McLeod¹, provavelmente essa regulação localiza-se na região H-2D do gene do Complexo de Histocompatibilidade (MHC) classe I²⁰. Este controle genético poderia explicar as diferenças encontradas entre os diversos estudos.

Nos camundongos sobreviventes não foram encontrados cistos cerebrais 50 dias após a inoculação, embora algumas das amostras tenham sido isoladas a partir de cistos em tecidos de suínos, como a LIV IV, LIV V e S 11. Isto poderia ser explicado devido à perda da cigotogenicidade, que se deve à prolongada passagem em camundongos¹², uma característica conhecida da amostra RH. No entanto, os ani-

mais que sobreviveram não produziram níveis de anticorpos detectáveis através da RIFI, indicando que talvez o número de taquizoítas inoculadas não tenha sido suficiente para causar a infecção.

Em coelhos, a concentração de 10^6 taquizoítas foi capaz de levar a óbito alguns dos animais mesmo com a administração de quimioterápicos. Aparentemente a amostra LIV V também foi a mais virulenta para coelhos, como observado em camundongos, o que poderá ser confirmado com estudos posteriores com maior número de animais.

Atualmente, estão sendo utilizadas técnicas de biologia molecular para a caracterização de amostras. Cristina *et al.*³, analisando seqüências de DNA de várias amostras de *T. gondii*, confirma-

ram a existência de variação genética, a qual parece não estar associada com a patogenicidade.

Nas condições que os experimentos foram realizados e com base nos resultados, pode-se concluir que: 1) Utilizando-se como critério de virulência a capacidade de matar os hospedeiros, as 8 amostras de *T. gondii* inoculadas intraperitonealmente mostraram-se igualmente virulentas para o inóculo de 10^4 taquizoítas. 2) A inoculação em camundongos mostrou que as amostras isoladas mais recentemente, como a LIV V e HV III (DL₅₀ de 7 e 15 taquizoítas respectivamente), foram mais virulentas do que aquelas isoladas há mais tempo. 3) Em coelhos a amostra LIV V também mostrou-se mais virulenta.

SUMMARY

In order to evaluate the virulence and pathogenicity of tachyzoites, eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from different animal species and humans - LIV IV, LIV V e S 11 isolated from swine, RH e VPS from humans, AS 28 from mice, HV III from dog and CN from cat - were inoculated in mice and rabbits. All the strains were strongly virulent for mice. Groups of mice inoculated, intraperitoneally, with 10^4 tachyzoites died in an average of 6.0 to 7.8 days, after inoculation. The strains isolated more recently, LIV V and HV III (LD₅₀ of 7 and 15 tachyzoites, respectively) were the most virulent. The RH strain showed the lowest virulence, with LD₅₀ of 3,160 tachyzoites. The LIV V strain also seems to be most virulent to rabbits.

UNITERMS: *Toxoplasma gondii*; Pathogenicity; Laboratory animals.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BROWN, C.; McLEOD, R. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, v.145, p.3438-41, 1990.
- 2- CAMARGO, M.E. **Introdução às técnicas de imunofluorescência**. São Paulo : Instituto de Medicina Tropical, 1973. 112p.
- 3- CRISTINA, N.; LIAUD, M.F.; SANTORO, F. A family of repeated DNA sequence in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis and use in strain characterization. **Experimental Parasitology**, v.73, p.73-81, 1991.
- 4- DARDE, M.L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isozymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by electrofocussing in polyacrilamid gels. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.39, p.551-8, 1988.
- 5- DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N. *et al.* In: DULBECCO, D. **Microbiology**. Philadelphia : J.B. Lippincott, 1991. p.790.
- 6- DEANE, M.P.; SOGORB, S.; JAMRA, L.F. *et al.* On the gametogenic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.13, n.2, p.110-3, 1971.
- 7- DE LA CRUZ, A.A.; DREESSEN, D.W.; EVANS, D.L. Western blot analysis and LD₅₀ determinations of *Toxoplasma gondii* isolates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.23, n.3/4, p.355-64, 1989.
- 8- DEROUIN, F.; GARIN, Y.J.F. *Toxoplasma gondii*: Blood and kinetics during acute and chronic infections in mice. **Experimental Parasitology**, v.73, p.460-8, 1991.
- 9- DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. **Journal of Parasitology**, v.59, p.505-12, 1973.
- 10- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N. *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. **Science**, v.164, p.432-3, 1969.
- 11- HARBOE, A.; ERICHSEN. A comparative study of the length of the parasite of four strains of *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v.37, p.31, 1955.
- 12- JACOBS, L.; MELTON, M.L. Modification in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various host. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.3, p.447-57, 1954.
- 13- KAUFMAN, H.E.; MELTON, M.L.; REMINGTON, J.S. *et al.* Strains differences in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v.45, n.2, p.189-90, 1959.
- 14- KAUFMAN, H.E.; REMINGTON, J.S.; JACOBS, L. Toxoplasmosis: The nature of virulence. **American Journal of Ophthalmology**, v.46, p.255-61, 1958.
- 15- LAUGIER, M.; QUILICI, M. Interêt. expérimental d'une souche de toxoplasme peu pathogène pour la souris. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v.45, n.4, p.389-403, 1970.
- 16- MARTINS, M.C.; SILVEIRA, C.; JAMRA, L.F. *et al.* Isolamento de *Toxoplasma gondii* de carnes e derivados e olhos humanos, provenientes de região endêmica de toxoplasmose ocular-Erechim-RS. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.52, p.148, 1989.
- 17- NAVARRO, I.T.; BEKNER DA SILVA, A.C.; VIDOTTO, O. *et al.* Immunogenic and antigenic aspects from different *Toxoplasma gondii* strains inoculated in cats and evaluated by indirect immunofluorescence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, p.253, 1992. Suplemento II.
- 18- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondii. **Comptes Rendus de L'Academie des Sciences**, Paris, v.147, p.763-6, 1909.
- 19- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalites in children. **Journal of the American Medical Association**, v.116, p.801-7, 1941.
- 20- SUZUKI, Y.; JOH, K.; ORELLANA, M.A. *et al.* A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. **Immunology**, v.74, p.732-9, 1991.
- 21- TUDURY, E.A.; VIOTTI, N.M.A.; BRACARENSE, L. *et al.* Diferentes quadros neurológicos provocados pelo *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) em 5 cães e 1 gato. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 46., São Paulo, 1991. **Anais. São Paulo : Sociedade Paulista de Veterinária**, 1991. p.31.
- 22- WILLIAMS, D.M.; GRUMET, F.C.; REMINGTON, J.S. Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.19, p.416-20, 1978.

Recebido para publicação: 26/06/1995

Aprovado para publicação: 25/06/1997