

## Isolamento de *Toxoplasma gondii* a partir de cérebro e músculo de gatos serologicamente positivos utilizando culturas celulares

Waap, H.<sup>1</sup>, Ângelo, H.<sup>2</sup>, Vilares, A.<sup>2</sup>, Cortes, H.<sup>3</sup>, Meireles, J.<sup>4</sup>, Leitão, A.<sup>5</sup>

1 Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (INRB IP / LNIV), Lisboa, Portugal

2 Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

3 Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro (ICAAM), Universidade de Évora

4 CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa (TULisbon), Portugal

5 CVZ, Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa e CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, UTL (TULisbon), Portugal

O isolamento de *Toxoplasma gondii* é imprescindível quer para efeitos de diagnóstico definitivo da infecção, quer para estudos visando a genotipagem de estirpes circulantes, tanto nos animais como no ser humano. O bioensaio é presentemente considerado o método de eleição para isolamento de *T. gondii* de amostras biológicas, no entanto, para além de eticamente questionável, a inoculação em ratinho é dispendiosa e laboriosa. O ensaio *in vitro* utilizando culturas celulares é frequentemente mencionado como alternativa, contudo o investimento nesta área tem sido diminuto, sendo raros os trabalhos que referem o recurso a este método para isolamento de *T. gondii* a partir de tecidos animais. Este estudo teve como objectivo testar diferentes métodos de isolamento de *T. gondii* em culturas de células. Para a preparação dos inóculos, colhemos amostras de tecido cerebral e muscular (coração e membros) de 16 gatos serologicamente positivos, durante a necrópsia. O tecido cerebral foi homogeneizado com agulha e seringa em meio de cultura e o tecido muscular digerido numa solução de ácido clorídrico e pepsina. A inoculação dos homogeneizados de cérebro e músculo em culturas de células Vero resultou, respectivamente, numa taxa de isolamento de 37,5% (6/16) e 62,5% (10/16). A visualização microscópica de taquizoítos nas culturas celulares foi possível 5-14 dias pós-inoculação, utilizando homogeneizados de cérebro e 7-32 dias pós-inoculação, utilizando homogeneizados de tecido muscular. Todos os isolados foram confirmados por n-PCR visando a região ITS1 do rDNA de *T. gondii*.

Financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, projecto FCT – PTDC/SAL/ESA/70388/2006.

### [Isolation of *Toxoplasma gondii* from brain and muscle of seropositive cats using cell cultures]

Isolation of *Toxoplasma gondii* is essential for definitive diagnosis of infection as well as for studies aiming genotyping of circulating strains, both in animals and humans. Bioassay is presently considered the most sensitive method for isolating *T. gondii* from biological samples, however, besides ethically questionable, mice inoculation is expensive and time consuming. *In vitro* assay using cell cultures is frequently mentioned as an alternative, but investments made in this field have been diminute and there are only a few studies employing *in vitro* methods for the isolation of *T. gondii* from animal tissues. The aim of the present work was to test different methods of *T. gondii* isolation in cell cultures. Samples of brain and muscle tissue (heart and limb muscle) were collected from 16 seropositive cats, during necropsy. Inocula were prepared by syringing of brain tissue in cell culture medium and artificial digestion of muscle samples in acid peptic solution. Isolation rates obtained with brain and muscle homogenates were 37.5% (6/16) and 62.5% (10/16), respectively. Time to microscopic detection of tachyzoites ranged between 5-14 days post-inoculation, when using brain tissue and 7-32 days post-inoculation, when using muscle homogenates. Confirmation of isolates was carried out by n-PCR amplification targeting the rDNA ITS1 region of *T. gondii*.