

INFECÇÃO "PER OS" DE GATOS COM FORMAS VEGETATIVAS DE "TOXOPLASMA GONDII" NICOLLE & MANCEAUX, 1909 SEM PRODUÇÃO DE OOCISTOS * 1

F. NERY-GUIMARAES ** e HELLY A. LAGE ***

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

(Com 17 figuras)

SUMÁRIO: Quatro grupos de 6 gatos (24 gatos) recém-nascidos e desmamados receberam "per os", respectivamente, suspensões de toxoplasmas de camundongos com 3-4 dias de infecção, de 4 amostras de *T. gondii*. Cada grupo teve um gato testemunha. Nenhum dos gatos de experiência eliminou oocistos atribuíveis a *T. gondii*, em períodos de observação de 6 a 20 dias; e suas fezes, conservadas 2-4 dias em bicromato de potássio a 2,5% e ministradas "per os" a camundongos, não induziram toxoplasmose nesses roedores. Com exceção dos que eram portadores de *Isospora*, os gatos não mostraram formas evolutivas de coccídios no epitélio intestinal. Em todos os grupos a infecção toxoplásmica foi comprovada pela positividade da reação de Sabin & Feldman (1:16 a 1:1024); e pelo isolamento de toxoplasmas pela inoculação de triturados dos seus principais órgãos em camundongos indicadores. De um modo geral, os gatos mais crescidos não mostraram sinais de doença, porém os outros, e principalmente os recém-nascidos adoeceram e vários morreram de toxoplasmose sistêmica: esplenite, hepatite, enterite, pneumonia e, mais raramente, miocardite e encefalite. Os toxoplasmas foram encontrados em todos esses órgãos e, também, nos rins e supra-renais.

A descoberta do ciclo sexuado do *Toxoplasma gondii* no gato (2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14) foi confirmada em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (1).

Experimentalmente, a produção de oocistos no gato ocorreria pela ministração "per os" tanto de cistos, como de formas vegetativas, embora irregu-

larmente como estas últimas, do mesmo modo que com oocistos (2, 3, 13, 14). Este trabalho relata os resultados negativos quanto à produção de oocistos em gatos infectados "per os" com formas vegetativas. A infecção toxoplásmica dos gatos de experiência, foi largamente demonstrada.

1 Recebido para publicação a 8 de dezembro de 1972.

* Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz.

** Chefe de Pesquisas do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq); do Quadro de Peritos da Organização Mundial de Saúde.

*** Pesquisador em Biologia e Medicina. Bolsista do CNPq.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras do "T. gondii" empregadas: a) "TC¹", paucicistogênica, isolada de toxoplasmose congênita; b) "Pombo", paucicistogênica, isolada de pombo, no Instituto Biológico de S. Paulo; c) "AS-28", cistogênica, isolada de um camundongo cinzento "selvagem" (*Mus musculus*) pela Dr.^a Maria P. Deane (1); d) "sonia", cistogênica, isolada de toxoplasmose congênita pelo Dr. Sérgio Coutinho. Todas são mantidas no laboratório por passagens em camundongos.

Inóculos: Suspensões de parasitos de líquido ascítico de camundongos com 3-4 dias de infecção, depois de lavados por centrifugação. A ministração oral dos inóculos aos gatos foi feita através de um tubo plástico. Este mesmo processo foi utilizado para ministrar aos camundongos as fezes conservadas dos gatos. Alguns gatos que receberam o inóculo de u'a amostra e resistiram, receberam depois inóculo de outra amostra.

Gatos de experiência: Foram usados 9 gatos desmamados (25-40 dias) e 19 recém-nascidos (3-15 dias), 4 destes servindo de testemunha. Deliberadamente foram usados quatro gatos com isosporoses. Os gatos foram colocados em gaiolas forradas com cartolina, os recém-nascidos ficando com as gatas-mães, todas aparentemente negativas para *Isospora*. O material para exame era conseguido pela aplicação de clisteres de salina e pipetagem da ampola retal. Não foram usados gatos jovens ou adultos porque eles, geralmente, resistem às inoculações de *Toxoplasma*, como também para evitar a possível interferência de toxoplasmose espontânea.

Controle da produção de oocistos pelos gatos: a) Cóproscopias diárias, após flutuação pelo sulfato de zinco, a partir do 3.^o dia pós-infecção com ocular 10x e objetiva 40x; b) Coproscopia de fezes depois de conservadas por 2-4 dias no bicromato de potássio a 2,5%; c) Ministração das fezes conservadas "per os" a camundongos indicadores; d) Pesquisa de formas evolutivas semelhantes às de *Isospora* no epitélio do intestino delgado dos gatos.

Controle da infecção toxoplásmica: a) Pela reação de Sabin-Feldman (R.S.F.); b) Pela microscopia de cortes em parafina e de preparados por impressão dos principais órgãos corados, respectivamente pela hematoxilina-eosina (H-E) e pelo Giemsa; c) Pela inoculação no peritônio a grupos de 3 camundongos e, separadamente, de triturados de baço, fígado, pulmão, coração e cérebro, na maioria dos gatos.

Sangue para R.S.F. foi retirado do coração, na autópsia, quando da morte ou sacrifício dos gatos. A punção cardíaca "in vivo", foi abandonada por causa de acidentes fatais, quando do estudo das isosporoses (10).

RESULTADOS

Amostra "TC¹"

O inóculo foi ministrado a 6 gatos: 2 avulsos e 4 de uma ninhada de 5 (de 8 dias de vida) ficando um de testemunha. Nenhum dos 6 gatos de experiência eliminou oocistos atribuíveis a *T. gondii*, em períodos de observação de 5 a 20 dias. Suas fezes não provocaram toxoplasmose em camundongos. Cinco gatos tiveram R.S.F. positiva; todos adoeceram, morrendo 3 deles de toxoplasmose. De 5 gatos foram isolados toxoplasmas em camundongos. O gato testemunha teve R.S.F. negativa. Um dos gatos avulsos tinha oocistos de *I. felis* e *I. rivolta*.

Amostra "Pombo"

O inóculo foi ministrado a 6 gatos: 3 avulsos e 3 de uma ninhada de 4 (de 3 dias de vida) ficando um de testemunha. Nenhum dos 6 gatos de experiência eliminou oocistos atribuíveis a *T. gondii*, em períodos de observação de 6 a 20 dias. Suas fezes não provocaram toxoplasmose em camun-

dongos. Um dos gatos morreu aos 6 dias, de intercorrência. Dos 5 restantes, 4 tiveram R.S.F. positiva, e de 3 deles foram isolados toxoplasmas em camundongos. Dois gatos adoeceram e 1 deles morreu de toxoplasmose. Um dos gatos avulsos tinha oocistos de *I. felis*. O gato testemunha teve R. S. F. negativa.

Amostra "AS-28"

O inóculo foi ministrado a 6 gatos: 2 avulsos e 4 de uma ninhada de 5 (de 15 dias de vida) ficando 1 de testemunha. Nenhum dos 6 gatos de experiência eliminou oocistos atribuíveis a *T. gondii*, em períodos de observação de 8 a 18 dias. Suas fezes não provocaram toxoplasmose em camundongos. Todos os 6 gatos tiveram R.S.F. positiva; de 5 deles foram isolados toxoplasmas em camundongos; 5 adoeceram e 3 deles morreram de toxoplasmose. Um dos gatos avulsos tinha oocistos de *I. felis* e *I. rivolta*. O gato testemunha teve R. S. F. negativa. Aos 11 dias da experiência um dos gatos da ninhada eliminou oocistos de "*I. felis*".

Amostra "Sonia"

O inóculo foi ministrado a 6 gatos: 2 avulsos e 4 de uma ninhada de 5 (de 10 dias de vida) ficando 1 de testemunha. Nenhum dos 6 gatos eliminou oocistos atribuíveis a *T. gondii*, em períodos de observação de 10 a 20 dias. Suas fezes não provocaram toxoplasmose em camundongos. Todos tiveram R. S. F. positiva; 4 adoeceram

e 2 deles morreram de toxoplasmose. De 4 gatos foram isolados toxoplasmas em camundongos. Um gato avulso tinha oocistos de *I. felis*. O gato testemunha teve R. S. F. negativa. Aos 10 dias da experiência um dos gatos da ninhada eliminou oocistos de *I. felis*.

Todas essas experiências estão, em sinopse, no Quadro I.

Tentativas de Superinfecção

Um dos gatos que recebeu o inóculo da amostra "pombo", 20 dias depois recebeu o inóculo da amostra "sonia" e continuou negativo; e do mesmo modo, 1 gato que recebeu o inóculo da amostra "AS-28" e 19 dias depois recebeu o inóculo da amostra "TC¹". Esses gatos não eliminaram oocistos atribuíveis a *T. gondii*, e não adoeceram; mas, a inoculação dos seus órgãos (baço e fígado) em camundongos foi positiva, e, também, foi positiva a sua R.S.F.

Comportamento dos Gatos

Os gatos mais crescidos não demonstraram sinais de doença e resistiram à inoculação. Os outros gatos, principalmente os recém-nascidos, mostraram sinais de doença a partir dos 6-8 dias: diarreia, conjuntivite, emagrecimento, perda progressiva de movimentos, mais de um terço morrendo de toxoplasmose aos 6-14 dias de inoculados. Além da pneumonia, com derrame pleural hemorrágico e ascite, alguns animais apresentavam macroscopicamente áreas esbranquiçadas no fígado.

Q U A D R O I
GATOS QUE RECEBERAM "PER OS" — FORMAS VEGETATIVAS DE "TOXOPLASMA GONDII"

Amostras de "T. gondii"	Nº experimentado	Nº que eliminou oocistos	Reação de Sabin-Feldman		Comportamento dos gatos			Isolamento de parasitos por inoculação em camundongos		
			Nº	Resultados	Aspecto* sadio	Doentes**	Mortos**	Órgãos	Nº de experimentados	Nº de positivos
"TC-1"	§ 6	0	5	1:64 1:256 1:256 1:1024 1:64	0	3	3	baço fígado pulmão coração cérebro	5 5 5 4 3	5 5 4 3 2
"Pombo"	§ 6	0	4	1:64 1:64 1:1024 1:256	4	1	1	baço fígado pulmão coração cérebro	3 3 3 3 3	3 3 3 2 1
AS-28	§§ 6	0	6	1:256 1:64 1:64 1:64 1:1024 1:1024	1	2	3	baço fígado pulmão coração cérebro	5 5 5 5 4	5 5 5 3 2
"Sonia"	§§ 6	0	6	1:16 1:256 1:1024 1:1024 1:64 1:64	2	2	2	baço fígado pulmão coração cérebro	4 4 3 3 3	4 4 3 3 2
—	24	0	—	—	7	8	9	—	—	—

* Gatos desmamados

** Gatos recém-nascidos

§ Um dos gatos tinha oocistos de "I. felis" e/ou I. rivolta antes das experiências

§§ Um dos gatos eliminou oocistos de "I. felis" durante as experiências.

Microscopicamente, em gatos sacrificados com sinais de doença, eram vistos pequenos focos necróticos no fígado e baço e focos de pneumonite. Nos animais sacrificados “in extremis” ou mortos, extensos focos necróticos eram encontrados no fígado, baço e pulmão; e pequenos focos inflamatórios no coração e cérebro. Em todas essas lesões os toxoplasmas eram numerosos, principalmente, nas 3 primeiras vísceras. Nos animais francamente doentes ou mortos de toxoplasmose foram constatados extensos processos de enterite com focos necróticos e com toxoplasmas esparsos na submucosa. Pequenos focos necróticos e parasitos foram encontrados nos gânglios mesentéricos.

Com exceção daqueles com *Isospora*, antes e/ou durante as experiências, não foram vistas formas evolutivas de coccídios no epitélio do intestino delgado dos gatos. Os gatos recém-nascidos com *Isospora* infectam-se muito cedo, a partir das gatas-mães que podem ter infecção inaparente⁽¹⁰⁾.

Isolamento de *Toxoplasma*

Pela inoculação, em grupos de camundongos indicadores, de triturados dos principais órgãos, inclusive de animais que não mostraram sinais de doença, foram isolados toxoplasmas de 17 gatos. Vinte e um gatos sangrados apresentaram R. S. F. positiva. Em 3 gatos não foi feita essa reação; e nos 4 gatos testemunhas essa reação foi negativa.

O Quadro I resume os diferentes aspectos das experiências.

DISCUSSÃO

Em um total de 24 gatos desmamados e recém-nascidos, não foi observada a produção de oocistos pela infecção oral com 4 amostras de *T. gondii*. Não foram usados gatos jovens ou adultos visando prevenir a possível interferência de toxoplasmose espontânea nos animais de experiência e pelo conhecimento prévio de que eles, geralmente, não mostram sinais de doença pela inoculação de toxoplasmas.

Estes resultados nos surpreenderam porque, embora em menor percentual do que com cistos, outros autores conseguiram a produção de oocistos com formas vegetativas.

Por outro lado, praticamente todos os gatos se infectaram, como prova a positividade da R.S.F., o isolamento de toxoplasmas em camundongos pela inoculação dos principais órgãos e a morte de vários animais por toxoplasmose sistêmica.

Com base na morbidade e na mortalidade dos gatos, a maior virulência foi observada com a amostra “TC¹” e a menor virulência com a amostra “pombo”. Quadro I.

De vinte gatos com isosporose, apenas 2 deram R.S.F. positivas,⁽¹⁰⁾ e 4 gatos testemunhas das experiências tiveram R.S.F. negativas.

Infecção de gatos “per os” sem produção de oocistos já fora observada por diversos autores (Frenkel & al, 1970; Piekarski & Witte, 1971; Dubey & Frenkel, 1972) mas, não sistematicamente.

Muito antes da descoberta do ciclo sexuado do *T. gondii*, nós mesmos

conseguimos infecções de gatos “per os”. A toxoplasmose espontânea ativa com lesões e parasitos é rara no gato. São poucas as comunicações depois do trabalho pioneiro de **Olafson & Monlux** (1942); vinte anos depois, **François** (1963) coligiu apenas 7 publicações; e nos últimos sete anos as publicações sobre o assunto também são escassas. Porém, a infecção crônica tem sido largamente demonstrada pela sorologia, principalmente o “dye test”. Depois dos trabalhos de **Hutchison** (1967-1968) sobre a transmissão dos toxoplasmas pelas fezes dos gatos infectados, o interesse por esses felinos, na toxoplasmose, aumentou grandemente. Recentemente, infecções experimentais foram estudadas por **Werner & Janitscke** (1970), **Dubey & Frenkel** (1972) e outros. Nossas observações não se afastam das desses autores quanto às lesões e distribuição parasitária.

SUMMARY

Oral infections of domestic cats with vegetative forms of Toxoplasma gondii Nicolle & Manceaux, 1909 without oocyst production.

Vegetative forms of 4 strains of *Toxoplasma* from peritoneal fluid of mice with 3-4 days of acute infection were orally administered to 4 groups of 6 newborn and wealing kittens respectively. Each group had a con-

trol kitten. All kittens were observed for periods of 6-20 days and never passed in their faeces oocysts attributable to *T. gondii*. On the other hand, their faeces after 2-4 days in potassium dichromate at 2.5% inoculated orally in mice didn't produce *Toxoplasma* infection in these animals; and with exception of the cats that have had spontaneous isosporosis (*I. felis* and/or *I. rivolta*) we didn't see evolutive forms of *Coccidia* in the intestinal wall of the cats. In all cat groups the toxoplasmic infection was comproved by the positivity of the dye-test (1:16 to 1:1.024) and by the isolation of toxoplasms in indicator mice inoculated with material from cat's principal organs.

Several of the wealing and newborn kittens were diseased and some died of sythemic toxoplasmosis: splenitis, hepatitis, pneumonitis, miocarditis and encephalitis, with numerous parasites.

AGRADECIMENTOS

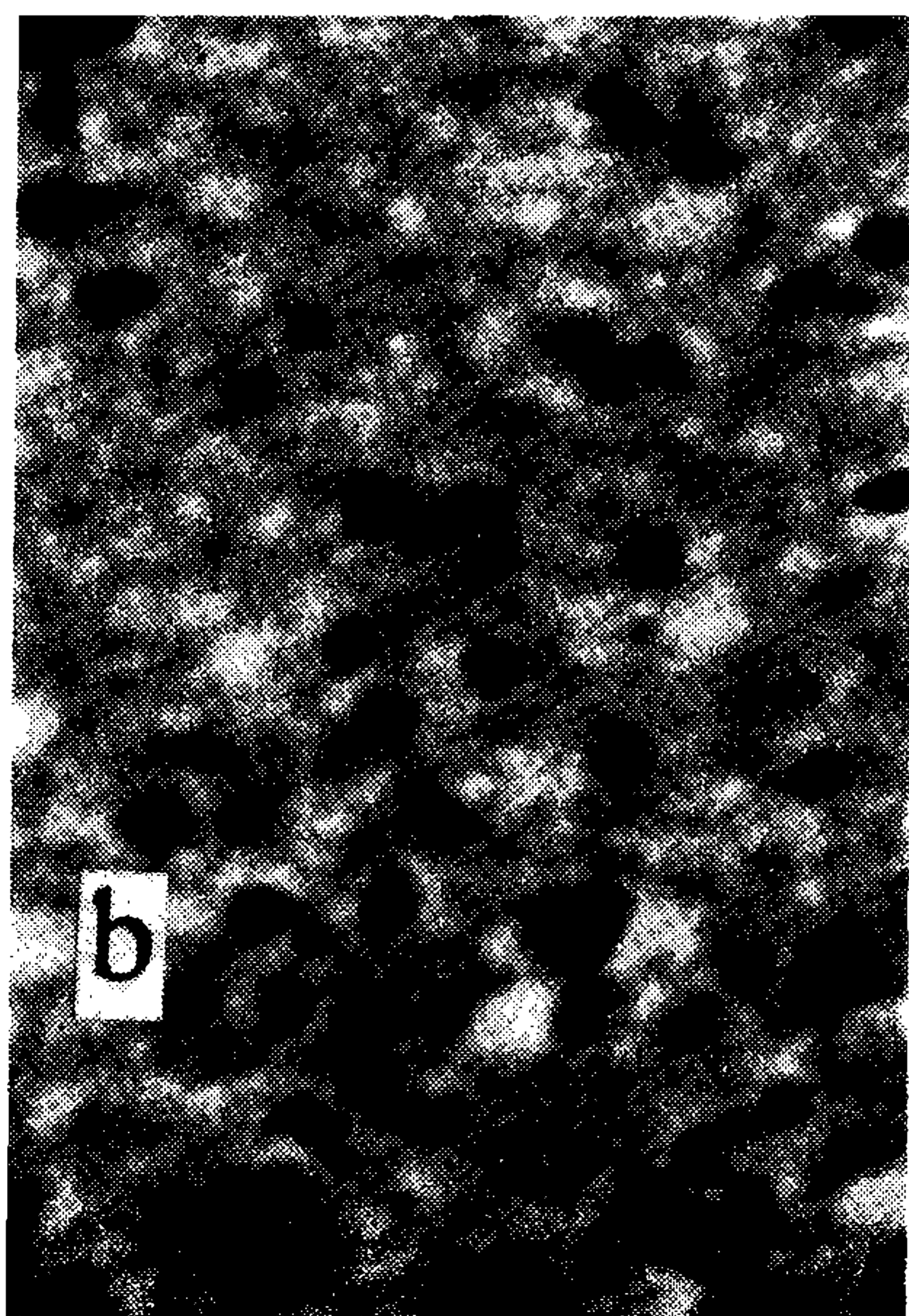
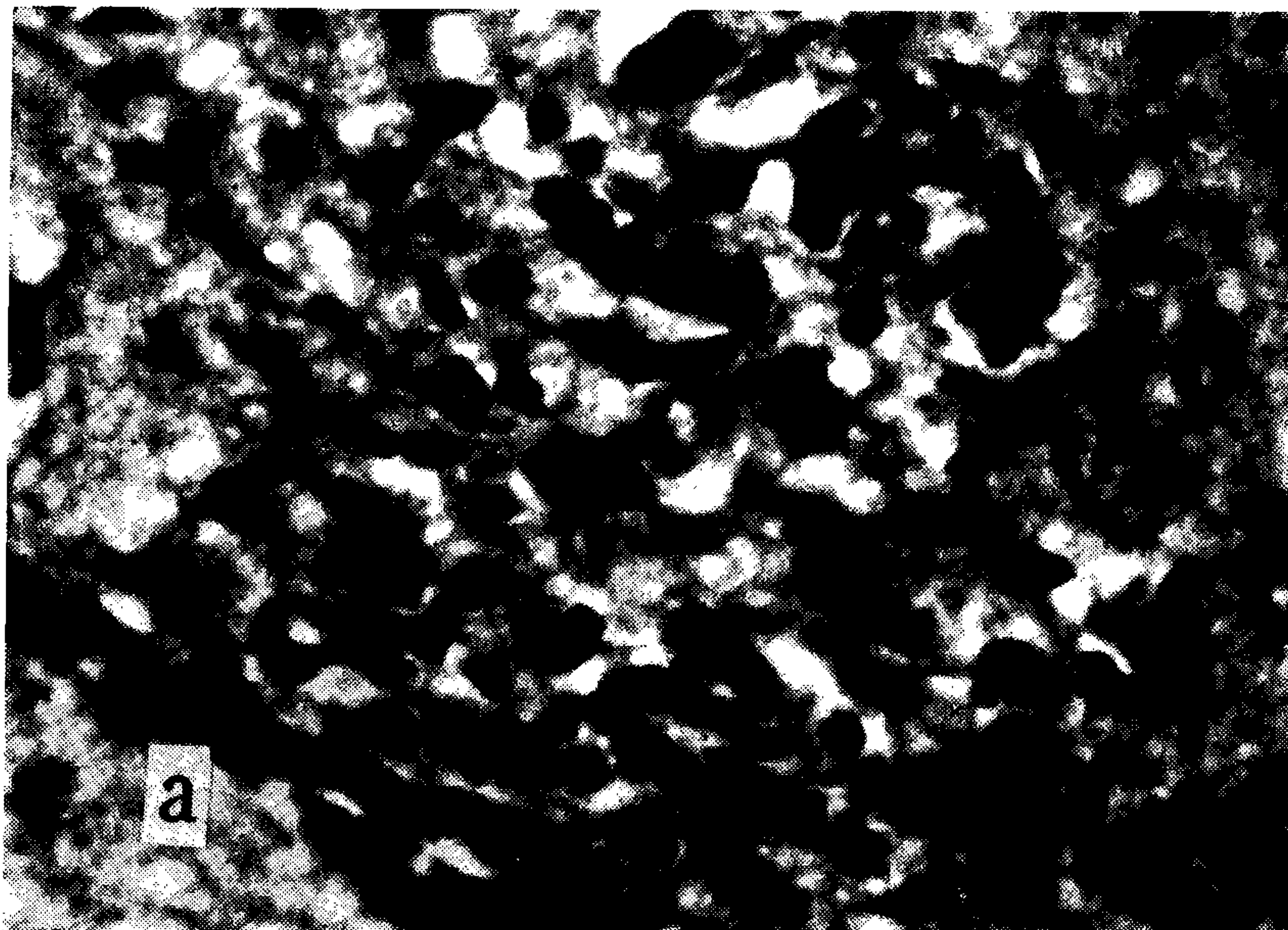
Somos gratos aos Drs. Maria Deane e Sergio Coutinho, por nos terem fornecido, respectivamente, as amostras “AS-28” e “sonia”; ao Dr. Oswaldo Cruz Filho, por nos ter conseguido no Instituto Biológico de São Paulo, a amostra “pombo”; aos Técnicos de Laboratório, Benedito Labre, Geraldo Praxedes, Claudionor Goulart e Antonio Avallone, pela valiosa ajuda durante a realização deste trabalho; e ao Sr. Newton Azevedo pela execução das microfotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — DEANE, M. P.; SOGORB, F.; JAMRA, L. S. & GUIMARÃES, E. C. — 1971. "On the Gametogenic cycle of *Toxoplasma gondii*". *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 13: 110.
- 2 — DUBEY, J. P. & FRENKEL, J. K. — 1972. "Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats". *J. Protozool.*, 19: 155.
- 3 — DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. & FRENKEL, J. K. — 1970. "The *Toxoplasma gondii* Oocyst from Cat Feces". *J. Exptl. Med.* 132: 636.
- 4 — FRANÇOIS, Jules (1963). "La toxoplasmose et ses manifestations oculaires". *Masson & Cie, Editeurs*. Paris.
- 5 — FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. & MILLER, N. L. — 1970. "*Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts". *Science (Washington)* 167: 893.
- 6 — FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. & MILLER, N. L. — 1969. "*Toxoplasma gondii* fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*". *Science, N. Y.*, 164: 432.
- 7 — HUTCHISON, W. M. — 1967. "The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*". *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61: 80.
- 8 — HUTCHISON, W. M.; DUNACHIE, J. F. & WORK, K. — 1968. "Transmissible toxoplasmas". *Acta path. microbiol. scand.* 74: 462.
- 9 — HUTCHISON, W. M.; DUNACHIE, J. F.; WORK, K. & SIIM, J. C. — 1971. "The life cycle of the coccidian parasites, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat". *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.* 65(3): 380-390.
- 10 — NERY-GUIMARÃES, F. & LAGE, Helly (1972). Ver este mesmo número desta revista.
- 11 — OLAFSON, P. A. & MONLUX, W. S. (1942). "Toxoplasma Infections in Animals". *Cornell Vet.* 32: 176.
- 12 — PIEKARSKI, G. & WITTE, H. M. — 1971. Experimentelle und histologische Studien zur Toxoplasma-Infektion der Hauskatze. *Z. Parasitenk.* 36: 95-121.
- 13 — SHEFFIELD, H. & MELTON, M. L. — 1970. "*Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells". *Science (Washington)* 167: 892.
- 14 — SIIM, J. Chr.; HUTCHISON, W. M. & WORK, K. — 1969. "Transmission of *Toxoplasma gondii*. Further Studies on the Morphology of the Cystic Form in Cat Feces". *Acta path. microbiol. scand.* 77: 756.
- 15 — WERNER, H. & JANITSCKE, K. — 1970. "Entwicklungsphasen, Entwicklungszyklen und systematische Stellung von *Toxoplasma gondii*". *Zentbl. Bakt. I. Orig.*, 214: 540.
- 16 — WITTE, H. N. & PIEKARSKI, G. — 1970. "Die Oocysten-Ausscheidung bei experimentell infizierten Katzen in Abhängigkeit von *Toxoplasma-Stamm*". *Z. Parasitenk.* 33: 358-60.

ESTAMPA I

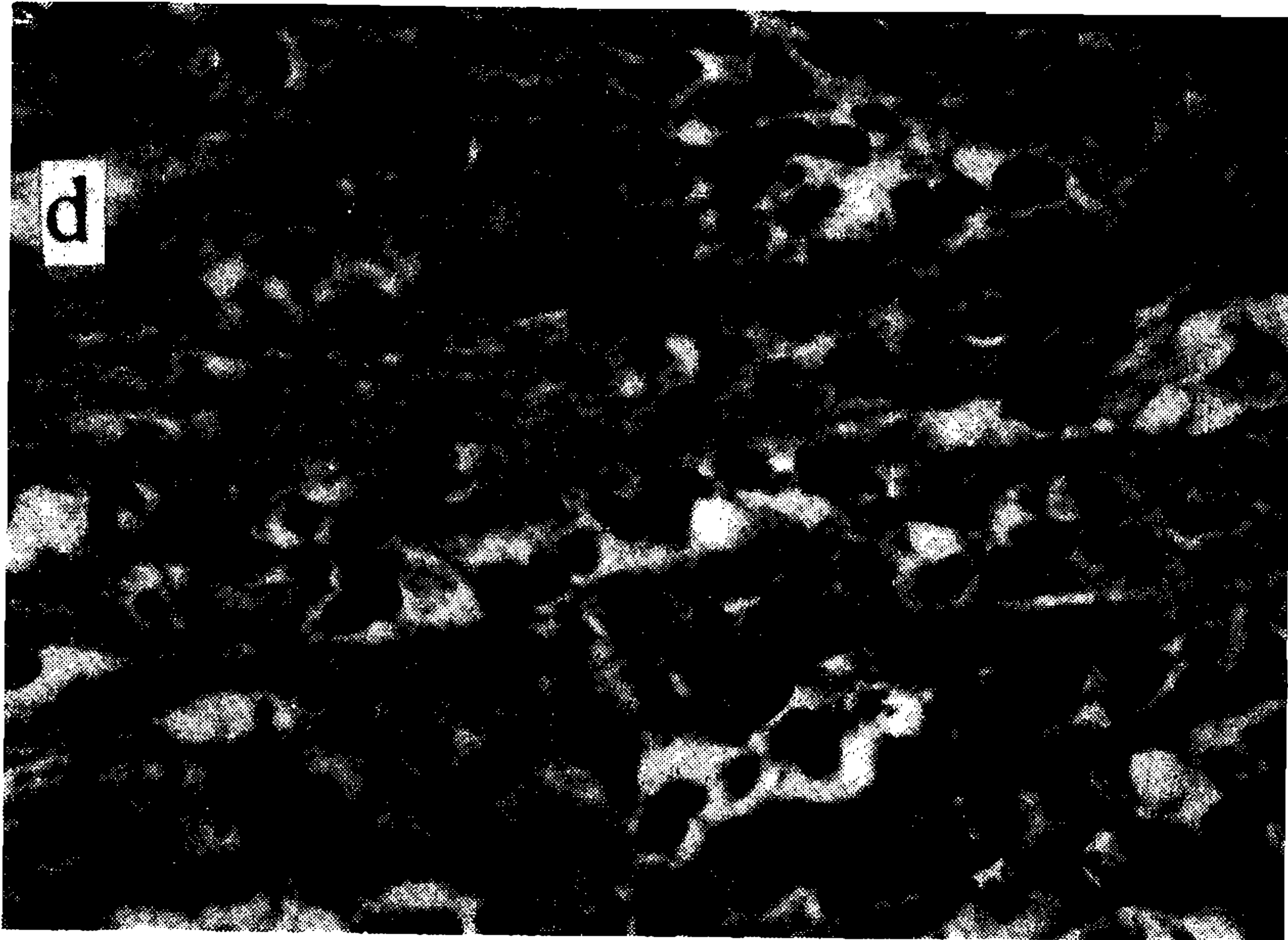
Gato infectado “per os” com *T. gondii* (amostra “sonia”). Cérebro. H.E. *a)* e *b)* — Encefalite granulomatosa: 600x; *c)* Pseudocisto: 1.600x.



Guimarães & Lage: *Toxoplasma*

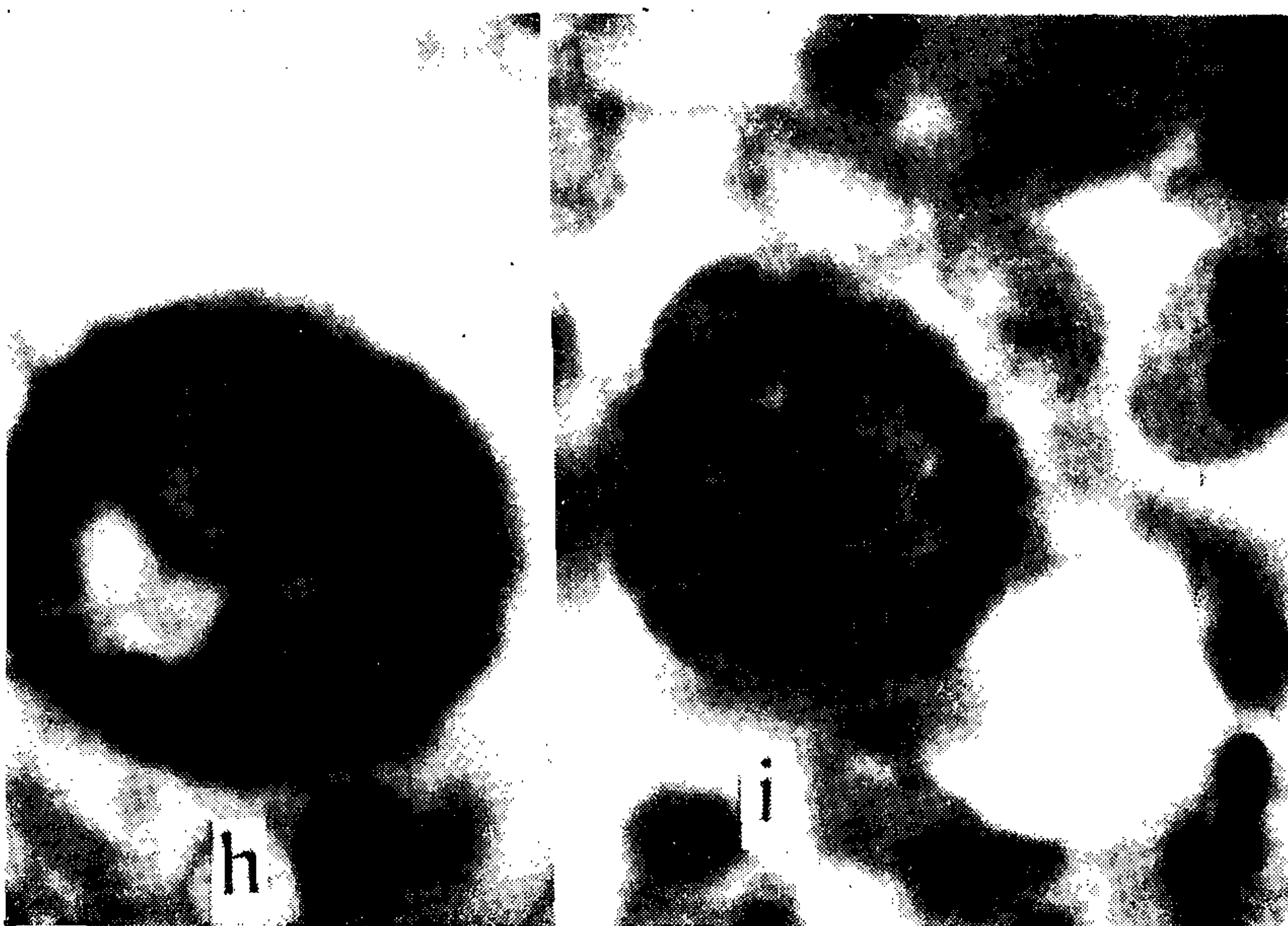
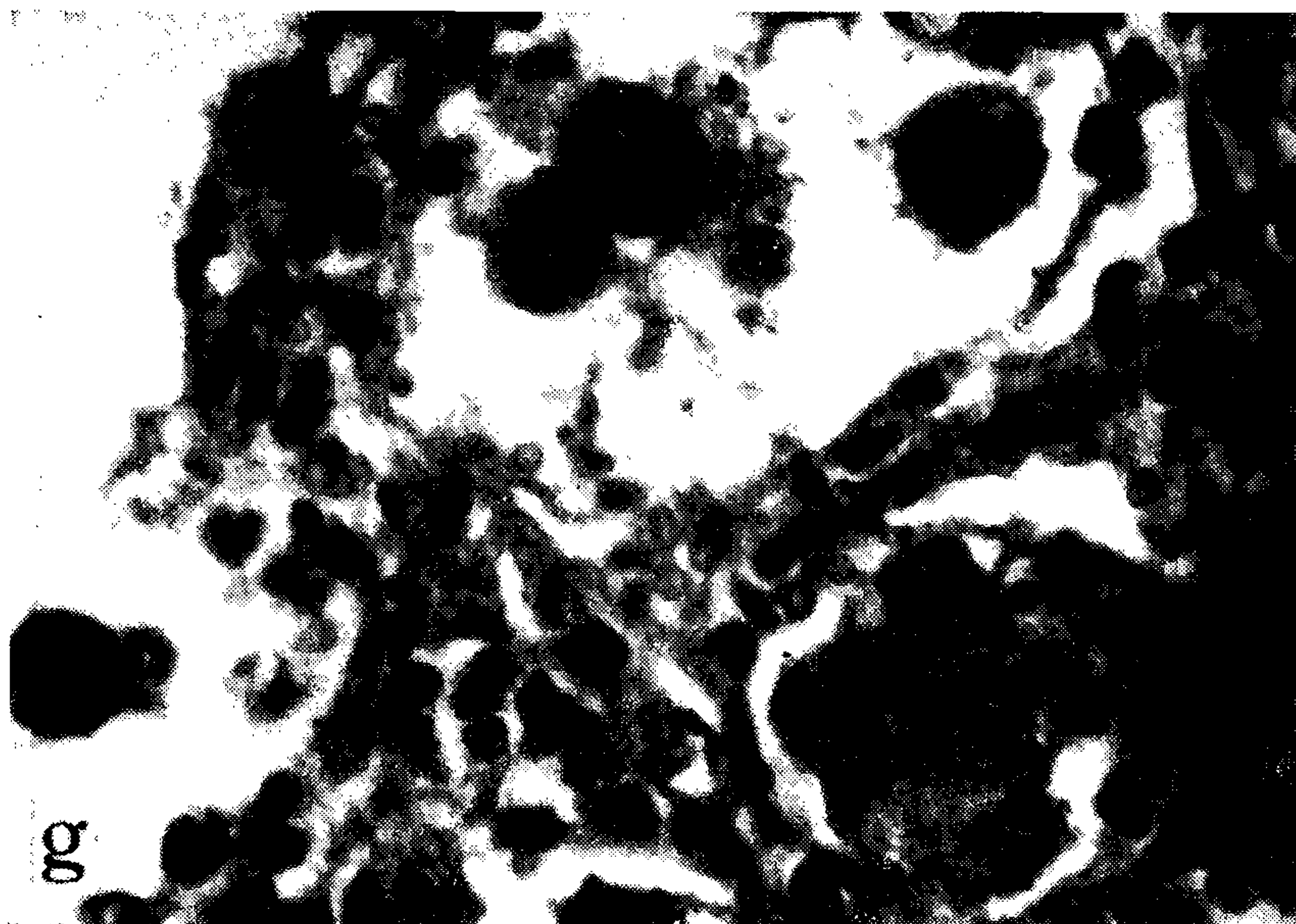
ESTAMPA II

Gato infectado "per os" com *T. gondii* (amostra "sonia"). Coração. H.E. *d)* Foco de miocardite com toxoplasmas esparsos. 600x. *e)* Pseudocisto na fibra cardíaca, sem infiltração monohistiocitária circundante. 1.600x. *f)* Início da mobilização das células inflamatórias após o rompimento de pseudocisto. 1.600x.



ESTAMPA III

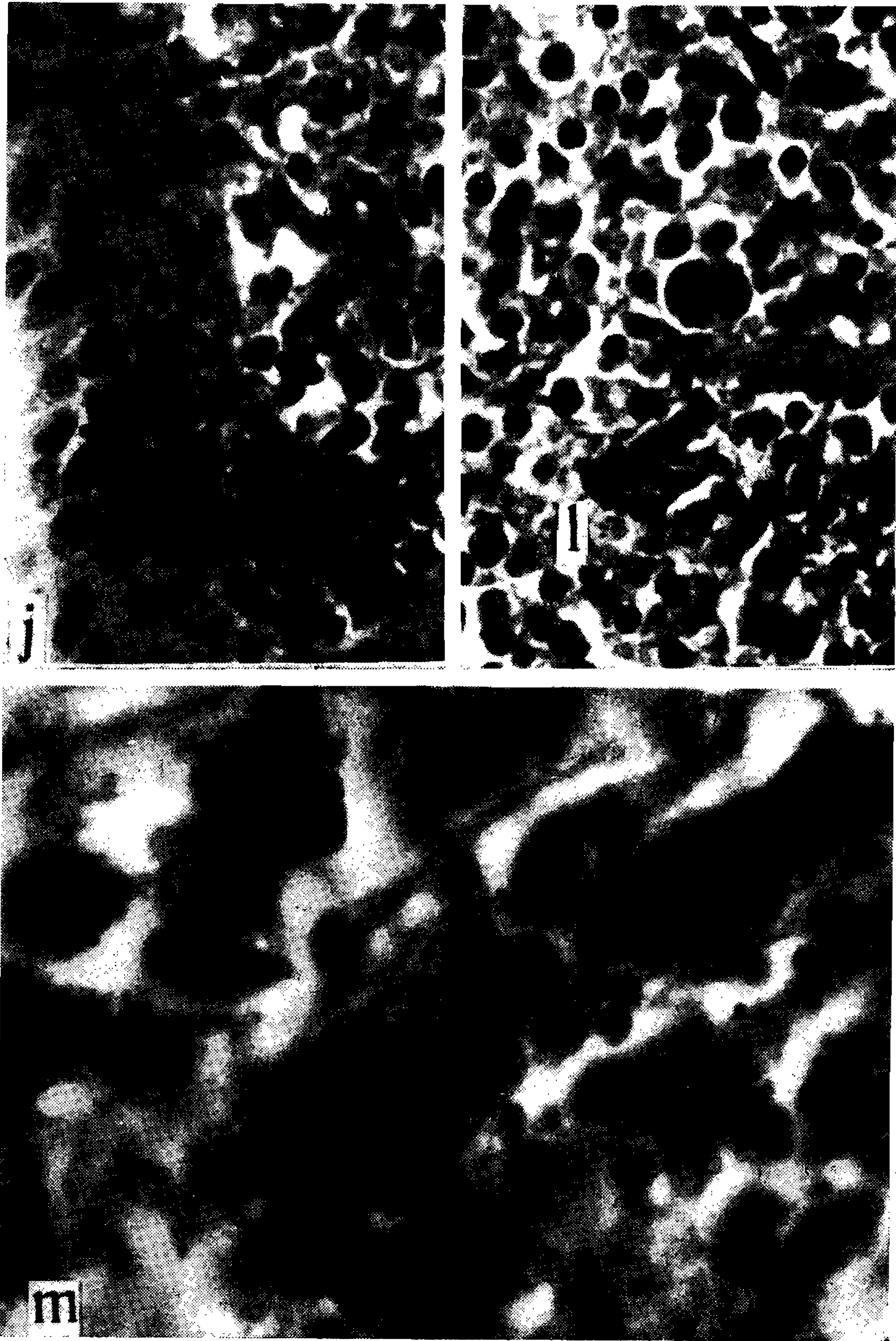
Gato infectado "per os" com *T. gondii* (amostra "AS-28."). *Pulmão*. H.E.
g) Infiltração monocelular nos septos e presença de grandes histiócitos cheios de toxoplasmas nos alvéolos. 600x; *b)* e *i)* Cistos no alvéolo e na parede. 1.600x.



Guimarães & Lage: *Toxoplasma*

ESTAMPA IV

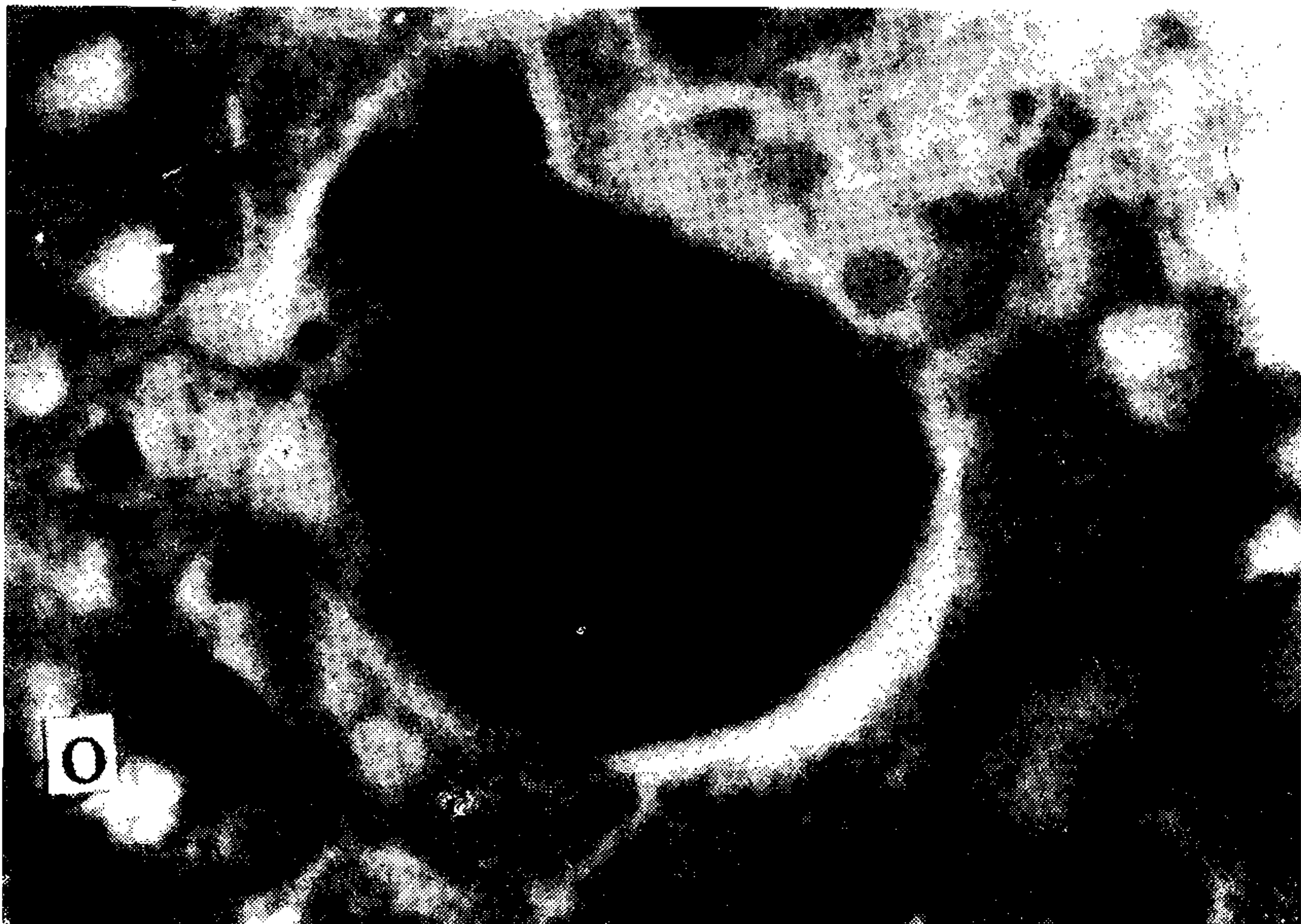
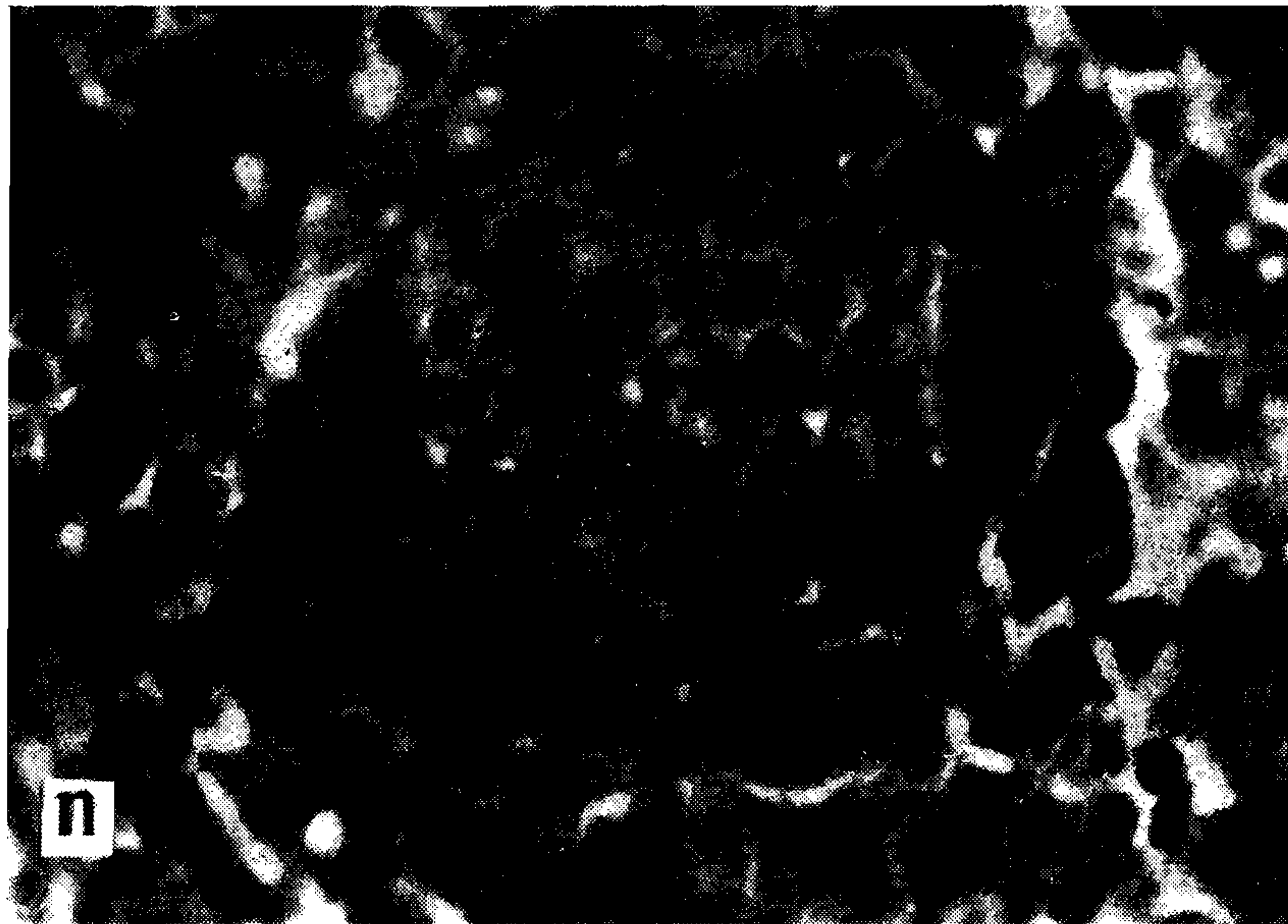
Gato infectado "per os" com *T. gondii* (amostra "pombo"). Baço. H.E. *j*) Pequeno foco necrótico com toxoplasmas junto à cápsula. 600x; *l*) Pseudocisto na polpa esplênica. 600x; *m*) Grande acúmulo de toxoplasmas em área necrótica. 1.600x.



Guimarães & Lage: *Toxoplasma*

ESTAMPA V

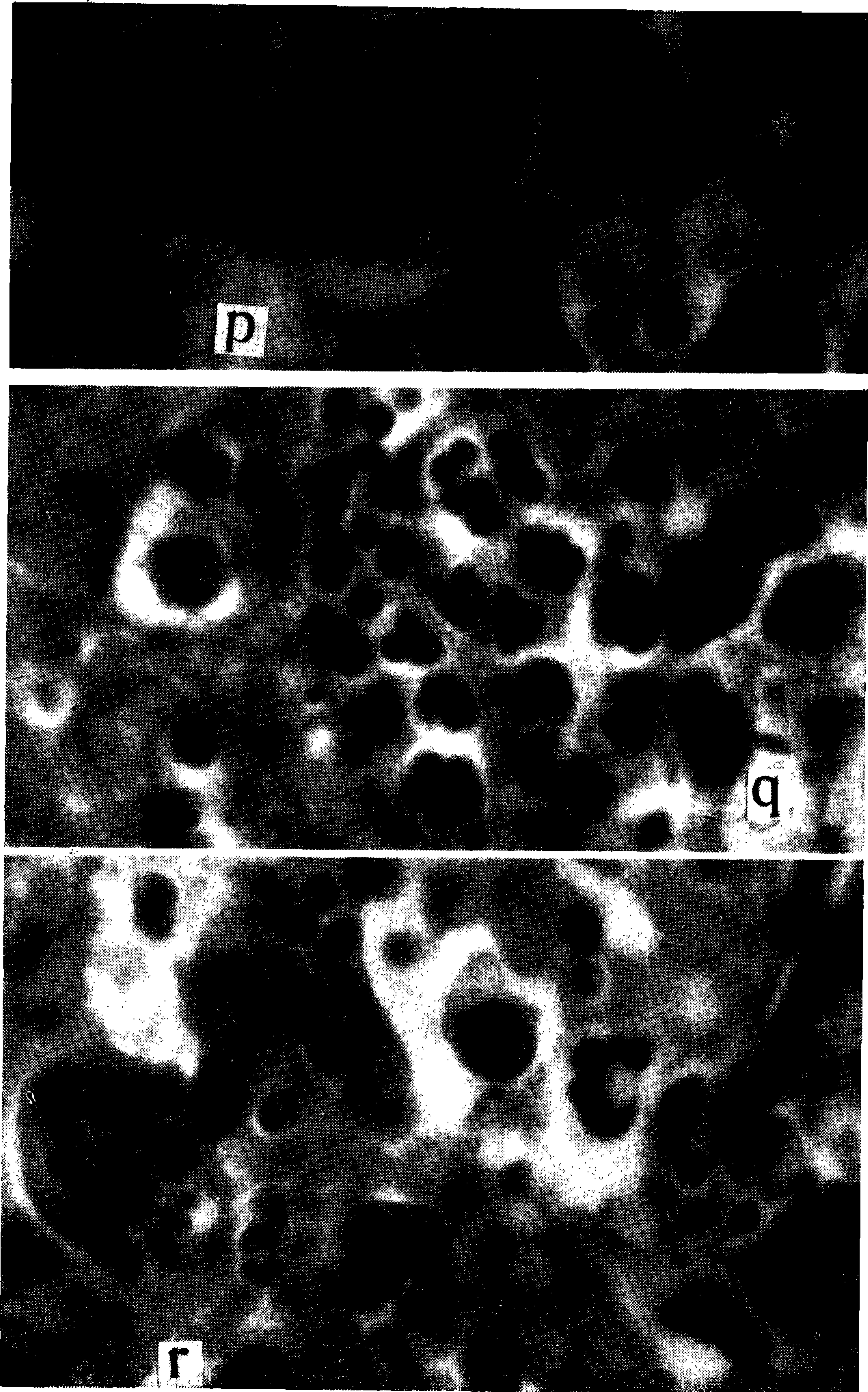
Gato infectado “per os” com *T. gondii* (amostra “TC¹”). Fígado. H.E. *n*) Foco necrótico com toxoplasmas. 600x; *o*) Grande cisto provavelmente em célula de Küpfer. 1.600x.



Guimarães & Lage: *Toxoplasma*

ESTAMPA VI

Gato infectado "per os" com *T. gondii* (amostra "TC¹"). Fígado. H.E. *p*) Pseudocisto; *q*) Toxoplasmas aos grupos de 2, 4, 6, 8, nos sinusóides; *r*) Aglomerados de toxoplasmas nos sinusóides. Todas as figuras com 1.600x.



Guimarães & Lage: *Toxoplasma*