

## REINFECÇÃO PELO TOXOPLASMA GONDII NICOLLE & MANCEAUX, 1909 EM CAMUNDONGOS E GATOS. ESTUDO EXPERIMENTAL.

Ligia M. Ferreira JAMRA (1), Fernando SOGORB Sanchis (2) e Eny Câmara GUIMARÃES (3)

### R E S U M O

A reinfecção pelo *Toxoplasma gondii* foi estudada, experimentalmente, em 27 camundongos albinos e 25 gatos domésticos. A infecção e a reinfecção foram comprovadas por sinais clínicos, anticorpos sanguíneos à reação de Sabin & Feldman  $\cong 1/4$ , recuperação do parasita e, nos gatos, também pela eliminação de oocistos. Nos camundongos a mortalidade foi de 56%. A primo-infecção por cepa de baixa virulência ou a infecção por cepa mais virulenta, atenuada pela sulfamonometoxina, deram proteção à reinfecção por cepa mais virulenta, mortal em poucos dias. Esta proteção foi demonstrada pela sobrevivência de camundongos e menor mortalidade, 12,5%. Nos gatos a mortalidade foi de 28%. A resposta sorológica à primo-infecção ocorreu em todos. Após a reinfecção houve elevação de títulos em 64% dos gatos, permanência em 32% e queda em 4%. A eliminação de oocistos foi observada em 60% dos gatos e só após inoculação de cistos, por via digestiva. A reeliminação após reinfecção, ocorreu em 25% dos gatos. Não foi observada eliminação após a 3.<sup>a</sup> inoculação. Em 88,2% dos gatos houve recuperação do parasita em camundongo, mais freqüente nos linfonodos mesentéricos e no intestino delgado, persistindo neste cerca de 14 meses. Foi constatada certa relação entre o bom estado físico dos gatos e a resposta sorológica, a eliminação e a reeliminação de oocistos. Apesar da persistência de anticorpos sanguíneos a reinfecção experimental dos gatos foi observada, porém a reeliminação de oocistos foi pouco freqüente e em pequena quantidade.

### I N T R O D U Ç Ã O

Trabalhos experimentais de vários AA. indicam que, na Toxoplasmose, como em outras infecções por protozoários intracelulares, a proteção é exercida, principalmente, pela imunidade celular e que os anticorpos sanguíneos têm um papel secundário (HULDT<sup>10</sup>, FRENKEL<sup>8</sup>, REMINGTON<sup>17</sup>, ARAUJO & REMINGTON<sup>1</sup>, PETERSEN<sup>16</sup> etc.).

A despeito dessa proteção, pequenos animais, principalmente roedores, podem se rein-

fectar pelo *Toxoplasma* e se manter para o resto da vida como reservatórios de cistos, representando um fator importante na disseminação e manutenção da zoonose (DE ROEVER-BONNET<sup>4</sup>, WERNER & EGGER<sup>23</sup>, WERNER<sup>24</sup>).

Maior importância adquirem, então, os gatos, pois, além de se reinfectarem, são capazes, também, de reeliminarem oocistos (CHESUM<sup>2</sup>, NERY-GUIMARÃES & LAGE<sup>13</sup>, DUBOY<sup>5</sup>, SCOTT<sup>20</sup>, RUIZ & FRENKEL<sup>18</sup> etc.).

Parte deste trabalho foi objeto da tese de livre-docência "Estudo da reinfecção experimental do gato pelo *Toxoplasma gondii*" apresentada por Fernando Sogorb Sanchis à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 1978

- (1) Prof. assistente-doutor, chefe do Laboratório de Toxoplasmose do Instituto de Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, Brasil
- (2) Prof. adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP
- (3) Técnica do Laboratório de Toxoplasmose

Existe, mesmo, a possibilidade de uma auto-reinfecção, através de oocistos por eles mesmos eliminados.

O presente trabalho tem por finalidades: 1) estudar, experimentalmente, a reinfecção de camundongos e gatos pelo *Toxoplasma gondii*; 2) verificar a influência de vias de inoculação, cepas e formas do parasita e presença de anticorpos prévios no sangue; 3) observar em que circunstâncias ocorre, nos gatos, a reeliminação de oocistos.

### MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos (*Mus musculus*) — Foram usados 5 grupos de camundongos albinos, da criação do Biotério da Faculdade de Medicina da USP, de mais ou menos 20g de peso e 2 meses de idade, machos na maioria, num total de 27 (Tabela I).

A via usada para as inoculações foi a via peritoneal (VP), exceto para o 1.º grupo de 2 camundongos que foram infectados por via digestiva (VD).

As cepas usadas foram AS28<sup>3</sup>, sob forma de cistos e N<sup>4</sup> sob forma de taquizoitos, respectivamente em macerado de cérebro e em exsudato peritoneal de camundongo. A cepa AS28, menos virulenta na fase aguda e produtora de cistos no cérebro e anticorpos sanguíneos na fase crônica. A cepa N, mais virulenta, habitualmente mortal do 4.º ao 7.º dias, não produzindo cistos no cérebro.

O grupo 2 constou de 14 camundongos que sobreviveram a uma experiência anterior de tratamento da toxoplasmose aguda por cepa N com Sulfamonometoxina em pó (Diameton, fornecido por Daiichi Seiyaku Co. L.T.D., Tokio, Japão), administrada no 1.º dia de infecção, na dose de 50 mg/kg de peso/dia, em suspensão em água e por via oral, durante 7 dias.

Os camundongos do grupo 5 também receberam Sulfamonometoxina no 10.º dia da infecção.

A média de tempo entre as 1.as e 2.as inoculações foi 94 dias (mínimo 33 e máximo 161).

Após as inoculações observaram-se os camundongos diariamente para acompanhamento dos sinais clínicos. Foram sacrificados entre 15 dias e 2 meses após a 1.ª inoculação e entre

1 e 7 meses após a 2.ª. Nessa ocasião foram retirados o sangue, por punção cardíaca, para a pesquisa de anticorpos antitoxoplasma e o cérebro, para a pesquisa de cistos. Um camundongo foi deixado sobreviver, como portador de cistos, 9 meses.

Gatos (*Felis catus*) — Foram inoculados e reinoculados 25 gatos, um adulto e 24 entre 1 e 6 meses de idade. Para cada gato abriu-se uma ficha onde constavam: procedência, sexo, idade, descrição do animal, dados clínicos e evolução da experiência. Os gatos foram numerados segundo a data da inoculação; os irmãos de mesma ninhada tiveram o mesmo número arábico, seguido de algarismo romano para cada indivíduo. A gata adulta (13) foi acompanhada por uma cria (13-IV) (Tabelas II, III e IV).

Na maioria dos inóculos usou-se a cepa AS28 sob a forma de cistos e 5 vezes sob a forma de taquizoitos. A cepa N foi usada uma vez sob a forma de taquizoitos. Os cistos foram inoculados, na maioria das vezes, por VD através de sonda gástrica e 7 vezes por VP. Os taquizoitos sempre por VP.

Todos os animais, antes de inoculados, submeteram-se à pesagem, ao exame parasitológico de fezes e à retirada de sangue, pela punção da veia safena magna na face interna da coxa, para a pesquisa de anticorpos anti-toxoplasma.

Os exames parasitológicos de fezes revelaram, na sua maioria, ovos de *Toxocara cati*s, de ancilostomídeos e oocistos de *Iso spora* spp, principalmente de tamanho médio. Também foram vistos oocistos pequenos, suspeitos de serem de *I. bigemina* e diagnosticados como tal, após inoculação em camundongo.

A pesquisa de anticorpos anti-toxoplasma de origem materna, antes da inoculação, foi negativa na maioria dos gatinhos. Em 3 irmãos de mesma ninhada (18-I, 18-II e 18-III) e no gato 25-II foi positiva com títulos baixos.

Após as inoculações anotaram-se o peso, o apetite, o estado geral e a temperatura retal. Os exames de fezes foram feitos diariamente, a partir do 3.º dia, durante o 1.º mês e uma vez por semana, depois. A colheita de sangue foi efetuada inicialmente a cada 7 dias e depois, mensalmente.

Passada a infecção aguda os gatinhos foram deixados numa fase de espera, durante um mínimo de 45 dias e um máximo de 9 meses. Procedeu-se, então, à 2.ª inoculação, sendo novamente anotados os dados clínicos e os de laboratório, como na primo-infecção. Nos gatinhos que receberam 3 inóculos os intervalos entre os dois últimos variaram de 3 a 6 1/2 meses.

O sacrifício foi feito por embolia gasosa. Foram necropsiados 17 gatos e seus órgãos inoculados em camundongos, para recuperação do parasita.

Os exames parasitológicos de fezes foram feitos pelo método de Willis, ou floculação pelo NaCl em solução saturada.

O sangue para a pesquisa de anticorpos "in vivo" nos camundongos, foi colhido em papel de filtro, após pequeno corte na ponta da cauda e processado segundo JAMRA & GUIMARAES<sup>11</sup>.

Os anticorpos anti-toxoplasma foram evidenciados pela reação de SABIN & FELDMAN (RSF), executada segundo SABIN & col.<sup>20</sup>, considerando-se significativos os títulos  $\geq 1/4$ .

A recuperação do parasita foi obtida através da inoculação de macerados de órgãos em camundongos, examinados aos 30 e 60 dias para

a pesquisa de anticorpos no sangue e de cistos nos cérebros (cepa AS28), ao exame microscópico, a fresco.

Oocistos de *Toxoplasma gondii*, de *Isospora* spp e oocistos suspeitos eliminados pelos gatos foram, após esporulação, inoculados em camundongos, por via digestiva e através de sonda, para identificação.

A reinfecção comprovou-se pelo reaparecimento de sinais clínicos, pela piora do estado geral e/ou morte de animais que estavam com infecção crônica estabilizada, pela elevação dos títulos dos anticorpos sanguíneos e, no caso dos gatos, pela reeliminação de oocistos.

## RESULTADOS

Camundongos (Tabela I) — Dos 27 camundongos da experiência, 13 (grupos 1, 3, 4 e 5) inoculados pela 1.ª vez com cistos de cepa AS28, sofreram uma infecção de evolução crônica, própria desta cepa, com aparecimento de anticorpos com títulos máximos de 1/1024 a 1/8192, entre 1 e 5 meses. O título de 1/8192, foi obtido já no 1.º mês. Dois camundongos do grupo 5, que, devido ao mau estado físico, receberam sulfamonometoxina no 10.º dia após a 1.ª inoculação, sobreviveram, apresentando títulos máximos de 1/1024 e 1/4096, aos 4 meses.

T A B E L A I  
Resultados da reinfecção experimental pelo *Toxoplasma gondii* em 27 camundongos

Grupo	N.º de camundongos	Inoculação tempo	Via	RSF máxima	Tempo	Evolução	Recuperação do <i>Toxoplasma</i>
1	2	1.ª cistos AS28 2.ª taquizoitos N 5m 10d	VD VP	1/4096 1/16384	4-5m 1m	1 morto 5d 1 sacrificado 1m	Cistos no cérebro
2	14	1.ª taquizoitos N 2.ª taquizoitos N 1m 24d	VP VP	1/16 — 1/1024 1/16384	1m 1m	Sulfa 1.ºd 2 mortos 4d 11 mortos 5d 1 sacrificado 1m	Taquizoitos no exsudato peritoneal Exsudato e cérebro [—]
3	5	1.ª cistos AS28 2.ª taquizoitos N 2m 7d	VP VP			1 sacrificado 2m 3 mortos 2-2 1/2m 1 sobrevivente 9m	Cistos no cérebro
4	3	1.ª cistos AS28 2.ª taquizoitos N 1m 3d	VP VP	1/8192	1m	1 sacrificado 14d 1 morto 45d 1 sacrificado 7m	Cistos no cérebro Cistos no cérebro
5	3	1.ª cistos AS28 2.ª taquizoitos N 4m 15d	VP VP	1/1024 a 1/4096	4m	Sulfa 10.ºd 1 morto 20d 2 sacrificados 6m	Cistos no cérebro

VD = via digestiva VP = via peritoneal RSF = reação de Sabin & Feldman d = dias m = meses [—] = negativo

A 2.ª inoculação nestes grupos, feita com taquizoitos da cepa N em 11 camundongos, causou a morte de apenas um animal no 5.º dia (sobrevida habitual com esta cepa 4 a 7 dias). Sobreviveram 10 camundongos: 5 morreram entre 20 e 27 dias, 1 foi sacrificado com 1 mês e 3 com 6 e 7 meses, todos com cistos nos cérebros, conseqüência da primo-infecção pela cepa AS28. Um camundongo sobreviveu 9 meses.

Quanto à RSF, ela apresentou uma elevação de títulos até 1/16384, no único grupo em que pôde ser realizada pela 2.ª vez, um mês após a reinfecção (grupo 1).

Os 14 camundongos do grupo 2 aos quais foi administrada a sulfamonometoxina no dia da inoculação com taquizoitos da cepa N, por VP, receberam o mesmo inóculo, pela mesma via, após intervalo de 2 semanas. Morreram 13 nos 4.º e 5.º dias após a reinfecção, mostrando taquizoitos ao exame do exsudato peritoneal. O único sobrevivente foi sacrificado 1 mês após e apresentou exsudato peritoneal e cérebro sem toxoplasmas.

A maioria destes camundongos, ou não desenvolveu anticorpos ou os desenvolveu com

títulos baixos ( $\leq 1/16$ ) após a primo-infecção. Porém, o sobrevivente, com anticorpos ao nível de 1/1024, apresentou elevação de título para 1/16384 quando foi sacrificado um mês após a reinfecção.

Dos 25 camundongos submetidos à reinfecção, 14 morreram dentro de 4-5 dias, sendo a taxa de mortalidade de 56%. Entretanto, nos animais do grupo 1, 3 e 4 a mortalidade foi de 12,5%, isto é, um morto em 8 camundongos.

Nos que sofreram ação da sulfa: no grupo 2 a mortalidade foi alta, 92,8%, dentro de 4-5 dias, com um único sobrevivente; no grupo 5 não houve mortalidade, mas sobrevivência de 20 dias e 6 meses.

Gatos (Tabelas, II, III, IV) — Na sintomatologia da infecção ou da reinfecção o sinal clínico mais constantemente observado foi a hipertermia. O aumento da temperatura retal foi pequeno (39,1°C a 39,3°C) nas infecções por VD, aparecendo em média, entre os 6.º e 8.º dias; ligeiramente maior (39,5°C) nas por VP com taquizoitos, embora de duração fugaz (4.º dia, em média); acentuado (39,8°C) nas infecções por VP com cistos e de aparecimento tardio (24.º dia em média).

TABELA II  
Resultados da reinfecção experimental pelo *Toxoplasma gondii* em 8 gatos inoculados pela via digestiva

Gato	Inóculo	Inoculação via	Evolução da RSF	Oocistos nas fezes dia	Inoculação de oocistos	Evolução	Recuperação do Toxoplasma
13	Cistos AS28	1.ª	VD	1/256 → 1/64	Tg 25.º, 28.º	—	370d
adulto	Cistos AS28	2.ª	VD	1/256 → 1/64			vivo
13-IV	Cistos AS28	1.ª	VD	1/1024 → 1/64	Tg 4.º a 28.º	+	435d
1m	Cistos AS28	2.ª	VD	1/256 → 1/64	Tg 17.º	—	vivo
23-I	Cistos AS28	1.ª	VD	1/16384 → 1/256	Tg 4.º		200d
3m	Cistos AS28	2.ª	VD	1/256	—		óbito (putrefeito)
23-II	Cistos AS28	1.ª	VD	1/256	Tg 5.º, 7.º		200d
3m	Cistos AS28	2.ª	VD	1/256	—		óbito (fecaloma) pulmão
29-I	Cistos AS28	1.ª	VD	1/4	Tg 6.º, 7.º		60d
2m	Cistos AS28	2.ª	VD	1/4	Tg 7.º		sacrificado linfonodos mesentéricos intestino delgado
29-II	Cistos AS28	1.ª	VD	1/16	Tg 5.º a 8.º		60d
2m	Cistos AS28	2.ª	VD	1/4	Tg 8.º		sacrificado pulmão, linfonodos mesentéricos
30-I	Cistos AS28	1.ª	VD	1/64 → 1/16	—		66d
4m	Cistos AS28	2.ª	VD	1/64			sacrificado moribundo pulmão, cérebro
30-II	Cistos AS28	1.ª	VD	1/64 → 1/16	—		66d
4m	Cistos AS28	2.ª	VD	1/64	—		sacrificado moribundo pulmão, linfonodos mesentéricos

VD = via digestiva RSF = reação de Sabin & Feldman d = dias m = meses + = positivo |—| = negativo

T A B E L A III

Resultados da reinfecção, experimental pelo *Toxoplasma gondii* em 9 gatos inoculados pelas vias peritoneal e digestiva

Gato idade	Inóculo	Inoculação via	Evolução da RSF	Oocistos nas fezes/dia	Inoculação de oocistos	Evolução	Recuperação do <i>Toxoplasma</i>
19-I 3m	cistos AS28	1. <sup>a</sup>	VP	1/256	—	230d	
	cistos AS28	2. <sup>a</sup>	VD	1/256	—	óbito	pulmão
19-II 3m	cistos AS28	1. <sup>a</sup>	VP	1/256 - 1/64	—	90d	linfonodos mesentéricos
	cistos AS28	2. <sup>a</sup>	VD	1/16	—	sacrificado moribundo	intestino delgado
19-III 3m	cistos AS28	1. <sup>a</sup>	VP	1/1024 - 1/256	—	290d	
	cistos AS28	2. <sup>a</sup>	VD	1/256	—	sacrificado	intestino delgado
21-III 2m 1/2	taquizoitos AS28	1. <sup>a</sup>	VP	1/1024 - 1/256	—	90d	
	cistos AS28	2. <sup>a</sup>	VD	1/256	—	óbito (putrefeito)	
24-I 5m	taquizoitos AS28	1. <sup>a</sup>	VP	1/1024 - 1/16	—	210d	
	cistos AS28	2. <sup>a</sup>	VD	1/256	—	sacrificado	—
24-II 5m	taquizoitos AS28	1. <sup>a</sup>	VP	1/1024 - 1/16	—	210d	
	cistos AS28	2. <sup>a</sup>	VD	1/64	—	sacrificado	—
25-II* 6m	cistos AS28	1. <sup>a</sup>	VP	1/1024 - 1/16	—	80d	linfonodos mesentéricos
	cistos AS28	2. <sup>a</sup>	VD	1/64 - 1/16	Tg 10. <sup>o</sup> , 11. <sup>o</sup>	sacrificado	
28-I 2m	taquizoitos AS28	1. <sup>a</sup>	VP	1/64 - 1/16	—	60d	pulmão, linfonodos mesentéricos,
	cistos AS28	2. <sup>a</sup>	VD	1/16	Tg 5. <sup>o</sup> , 7. <sup>o</sup>	sacrificado	intestino delgado
28-II 2m	taquizoitos AS28	1. <sup>a</sup>	VP	1/16 - 1/4	—	60d	pulmão,
	cistos AS28	2. <sup>a</sup>	VD	1/4	Tg 8. <sup>o</sup>	sacrificado	linfonodos mesentéricos

VD = via digestiva VP = via peritoneal RSF = reação de Sabin & Feldman d = dias m = meses + = positivo — = negativo \*RSF inicial 1/4

A infecção das vias respiratórias superiores apareceu em 2 gatos. A paresia dos membros pélvicos, acompanhada de mau estado geral, ocorreu duas vezes na primo-infecção e duas na reinfecção. A constipação intestinal, com distensão do abdome, foi observada em 3 gatinhos (23-II, 30-I e 30-II), nos quais foi encontrada obstrução intestinal por fecaloma, à necropsia.

Foram observadas perdas de peso e de apetite na maioria dos gatos, na fase aguda, quer após a 1.<sup>a</sup> quer após a 2.<sup>a</sup> infecção, com recuperação posterior.

A primo-infecção dos gatos pelo *Toxoplasma gondii* provocou resposta sorológica à RSF em todos, embora com títulos baixos, de 1/4 e 1/16 em 3 gatos.

Após a 2.<sup>a</sup> inoculação 8 gatos (32%) permaneceram com títulos inalterados, 16 (64%) tiveram elevação de títulos e apenas 1 gato (4%) teve queda de 1 título (29-II). Nos 8 gatos que sofreram 3.<sup>a</sup> inoculação os títulos elevaram-se

em 3, permaneceram estacionários em 4 e sofreram queda em 1 gato.

Em relação ao estado físico dos animais e a resposta à RSF, os gatos em bom estado de saúde após as inoculações tiveram elevação ou permanência de títulos, com exceção de 2 que apresentaram queda. Os gatos moribundos ou que morreram tiveram permanência ou queda de títulos e apenas 2 apresentaram elevação de 1 título.

A eliminação de oocistos ocorreu em 15 gatos (60%) e apenas após inoculações com cistos por VD. Em 8 gatos após a 1.<sup>a</sup> inoculação, em 4 gatos após a 2.<sup>a</sup> e em 3 após ambas. Não ocorreu após a 3.<sup>a</sup> inoculação. Quatro gatos, de 10, que tinham sofrido uma primo-infecção por VP com taquizoitos ou cistos, sem eliminação de oocistos, eliminaram-nos quando reinoculados com cistos por VD (22-IV, 25-II, 28-I e 28-II).

Após 45 inoculações com cistos por VD resultaram 18 eliminações de oocistos (40%), en-

T A B E L A IV  
Resultados da reinfecção experimental pelo *Toxoplasma gondii* em 8 gatos submetidos a 3 inoculações

Gato idade	Inóculo	Inoculação via	Evolução da RSF	Oocistos nas fezes/ dia	Inoculação de oocistos	Evolução	Recuperação do <i>Toxoplasma</i>
16-I 3m	cistos AS28	1. <sup>a</sup> VD	1/1024	—	—	400d vivo	
	cistos AS28	2. <sup>a</sup> VD	1/1024 1/256	I. bigemina			
	cistos AS28	3. <sup>a</sup> VD	1/256	I. bigemina			
16-II 3m	cistos AS28	1. <sup>a</sup> VD	1/1024	—	—	400d vivo	
	cistos AS28	2. <sup>a</sup> VD	1/4096 1/1024	—			
	cistos AS28	3. <sup>a</sup> VD	1/1024 1/256	I. bigemina			
17-III 2m 1/2	cistos AS28	1. <sup>a</sup> VD	1/256	Tg 10. <sup>o</sup> , 11. <sup>o</sup>	+	345d vivo	
	cistos AS28	2. <sup>a</sup> VD	1/256	—			
	cistos AS28	3. <sup>a</sup> VD	1/64	I. bigemina			
17-IV 2m 1/2	cistos AS28	1. <sup>a</sup> VD	1/256	Tg 5. <sup>o</sup> a 11. <sup>o</sup>	+	345d vivo	
	cistos AS28	2. <sup>a</sup> VD	1/4096 1/256	Isospora			
	cistos AS28	3. <sup>a</sup> VD	1/256	I. bigemina			
18-I* 1m 1/2	cistos AS28	1. <sup>a</sup> VD	1/4096 1/256	Tg 4. <sup>o</sup> a 10. <sup>o</sup>	+	410d sacrificado	intestino delgado
	cistos AS28	2. <sup>a</sup> VP	1/1024 1/256	—			
	cistos AS28	3. <sup>a</sup> VD	1/1024 1/256	suspeitos			
18-II* 1m 1/2	cistos AS28	1. <sup>a</sup> VD	1/1024 1/256	Tg 4. <sup>o</sup> a 10. <sup>o</sup>	+	410d sacrificado	intestino delgado
	cistos AS28	2. <sup>a</sup> VP	1/1024 1/256	—			
	cistos AS28	3. <sup>a</sup> VD	1/1024 1/256	—			
18-III* 1m 1/2	cistos AS28	1. <sup>a</sup> VD	1/8192 1/256	Tg 4. <sup>o</sup> a 10. <sup>o</sup>	+	410d sacrificado	cérebro intestino delgado
	cistos AS28	2. <sup>a</sup> VP	1/1024 1/256	—			
	cistos AS28	3. <sup>a</sup> VD	1/1024 1/256	—			
22-IV 4m	taquizoitos N	1. <sup>a</sup> VP	1/8192 1/16	—	+	315d sacrificado	intestino delgado
	cistos AS28	2. <sup>a</sup> VD	1/64 1/4	Tg 6. <sup>o</sup> a 11. <sup>o</sup>			
	cistos AS28	3. <sup>a</sup> VD	1/64	—			

VD = via digestiva VP = via peritoneal RSF = reação de Sabin & Feldman d = dias m = meses + = positivo |—| = negativo \*RSF inicial 1/16

quanto após 13 inoculações com cistos ou taquizoitos por VP não houve eliminação.

A reeliminação de oocistos ocorreu em 3 (13-IV, 29-I e 29-II) de 12 gatos infectados e reinfetados por VD (25%). Não ocorreu nos que sofreram 3 inoculações, qualquer que fosse a via empregada.

O número de oocistos não foi calculado, porém, numerosos na 1.<sup>a</sup> eliminação, tornaram-se menos frequentes na 2.<sup>a</sup> e ausentes após a 3.<sup>a</sup> inoculação.

O período de eliminação variou de 1 a 7 dias, exceto no gatinho 13-IV em que se estendeu por 25 dias. A eliminação de oocistos pelos animais que já tinham sofrido uma primo-infecção por VP durou, em média, 3 dias. A reeliminação durou um dia apenas.

A natureza e a infectividade dos oocistos foram comprovadas pelos resultados positivos obtidos em 58,3% de 12 inoculações em camun-

dongos. Os oocistos suspeitos eliminados pelos gatos 16-I, 17-IV e 18-I deram resultado negativo.

Considerando o estado físico dos gatos e a eliminação de oocistos, entre 18 gatos em bom estado 13 eliminaram oocistos (72%), sendo que de 10 destes, 3 também os reeliminaram após 2.<sup>a</sup> infecção (30%). Dos 7 gatos em mau estado, moribundos ou que morreram, apenas 2 eliminaram oocistos (18,5%) e nenhum os reeliminou.

Em relação à concomitância de anticorpos no sangue e de oocistos nas fezes, nossos dados revelaram a presença de ambos na maioria dos gatinhos. Em um gato (13) os anticorpos precederam em 6 dias os oocistos e em 5 (13-IV, 17-III, 17-IV, 29-I e 29-II), os oocistos precederam os anticorpos em 6 dias.

A recuperação do *Toxoplasma* pela bio-prova em camundongos ocorreu em 15 dos 17 gatos que tiveram órgãos inoculados (88,2%). A frequência foi: intestino delgado 8 vezes, linfo-

nodos mesentéricos 7 vezes e cérebro 2 vezes. A recuperação do parasita foi obtida a partir de um órgão em 7 gatos, de 2 órgãos em 7 e de 3 órgãos apenas em 1 gato. Ocorreu, nos vários órgãos, 60 a 410 dias após a 1.ª inoculação (tempo máximo de experiência).

Deve ser destacado que, no intestino delgado, ocorreu 410 dias após a 1.ª inoculação por VD, nos gatos 18-I, 18-II e 18-III. Neste último ocorreu, também, a recuperação no cérebro, na mesma ocasião.

Nos gatos 19-II e 19-III o isolamento do parasita, a partir do intestino delgado, foi obtido 90 a 290 dias após a inoculação por VD, sem ter havido, aparentemente, eliminação de oocistos.

A recuperação no pulmão deu-se após 200 e 230 dias, respectivamente nos gatos 23-II e 19-I. Nos linfonodos mesentéricos o máximo observado foi 90 dias (gato 19-II).

Dos 25 gatos submetidos à reinfecção pelo *Toxoplasma gondii* 4 morreram entre 4 1/2 e 7 1/2 meses após o início da experiência e 3 foram sacrificados moribundos, após 2 a 3 meses, o que representa uma mortalidade de 28%.

As causas de morte foram: obstrução intestinal (3 gatos), paresia dos membros pélvicos (2), infecção respiratória (1) e desconhecida (1).

Dos gatos restantes, 12 foram sacrificados em bom estado físico, entre 2 e 13 meses e 6 conservavam-se vivos 11 1/2 e 13 1/2 meses após a 1.ª inoculação. Entre estes estavam os 4 gatos que sofreram 3 inoculações.

## DISCUSSÃO

Camundongos — Nos resultados da reinfecção pelo *Toxoplasma gondii* em camundongos destacam-se 3 aspectos: a proteção dada pela primo-infecção, a elevação dos títulos após a reinfecção e a ação da sulfamonometoxina.

Já em 1963 De ROEVER-BONNET<sup>4</sup> tinha verificado que a inoculação de uma cepa "avirulenta" de *Toxoplasma* protegia camundongos e hamsters, tornando-os "tolerantes" a uma segunda inoculação por cepa "virulenta".

Pelos resultados aqui apresentados ficou evidente que a cepa AS28, menos virulenta, de evolução crônica e produtora de cistos e anticorpos, conferiu proteção à reinfecção pela cepa N, mais virulenta e mortal dentro de poucos dias. Esta proteção manifestou-se pela sobrevivência da maioria dos camundongos dos grupos 1, 3, 4 e 5, com mortalidade de 12,5% (1 camundongo) em relação à mortalidade geral de 56%.

A elevação de títulos após a reinfecção, comprovando-a, foi observada nos sobreviventes dos grupos 1 e 2. Estes camundongos, cronicamente infectados, apresentaram elevação de títulos em uma ou duas diluições, quando sacrificados um mês após a reinfecção, repetindo as observações de WERNER, 1977<sup>24</sup>.

Os camundongos que sofreram ação da sulfamonometoxina na 1.ª inoculação apresentaram dois comportamentos após a reinfecção: no grupo 2 a mortalidade foi alta, 92,8%, dentro de 4-5 dias, com um único sobrevivente; no grupo 5 houve sobrevivência de 20 dias e 6 meses.

Para essa diferença de comportamento são sugeridas as seguintes explicações: no grupo 2 a sulfa, administrada no 1.º dia, inativou os taquizoítos da cepa N não havendo infecção e, conseqüentemente, a proteção dada por ela. Daí a presença de títulos baixos à RSF nestes camundongos, como resultado de anticorpos contra parasitas mortos. Houve exceção de 1 camundongo que teve uma infecção por toxoplasmas de virulência atenuada pela droga, com título de 1/1024 e que sobreviveu à reinfecção pela mesma cepa, apresentando título de 1/16384, quando foi sacrificado um mês após.

No grupo 5, inoculado com cepa AS28, a ação da sulfa só se fez sentir parcialmente, porque na ocasião da administração no 10.º dia após a inoculação, provavelmente já havia cistos nos cérebros sobre os quais a droga não atua, infecção evoluída e anticorpos sanguíneos, responsáveis pela proteção observada contra a reinfecção pela cepa N.

Destes resultados concluiu-se que a infecção de camundongos por cepa de *Toxoplasma* de baixa virulência ou a infecção por cepa virulenta, atenuada pela administração da sulfa,

não impediram o aparecimento da reinfecção por cepa de maior virulência, mas atenuaram a sua evolução, proporcionando uma sobrevida maior do que a habitual.

Gatos — Os felinos, na natureza, infectam-se com *Toxoplasma gondii* ingerindo tecidos de animais infectados contendo cistos. Por esta razão foram usadas, na maioria das inoculações, a via digestiva e a forma cística do parasita. A via peritoneal, com taquizoitos ou cistos, foi usada para despertar reação imunológica, capaz ou não, de impedir a reinfecção ou a reeliminação de oocistos.

A infecção e a reinfecção dos gatos pelo *Toxoplasma gondii* foram estudadas através de manifestações clínicas, resposta à RSF, eliminação de oocistos e recuperação do parasita.

Das manifestações clínicas observadas, a mais freqüente foi a hipertermia, também a mais citada por vários autores. (MEIR, HALZWORTH & GRIFFITHS<sup>12</sup>, PETRAK & CARPENTER<sup>15</sup>, SCOTT<sup>20</sup>). A infecção das vias respiratórias referida como a mais importante (MEIR, HALZWORTH & GRIFFITHS<sup>12</sup>, PETRAK & CARPENTER<sup>15</sup>, DUBEY<sup>7</sup>), só apareceu em 2 casos. É possível que alguns gatos mortos e não necropsiados apresentassem essa patologia. A paresia dos membros pélvicos, que ocorreu em 4 gatos, foi por MEIR, HALZWORTH & GRIFFITHS<sup>12</sup>, atribuída a lesões meningoencefalomielíticas. A obstrução intestinal tem sido referida como consequência de hipertrofia dos linfonodos mesentéricos (MEIR, HALZWORTH & GRIFFITHS<sup>12</sup>). Em 2 dos 3 gatos em que ela ocorreu, os linfonodos foram encontrados hipertrofiados e neles houve recuperação do parasita.

A presença de anticorpos passivos maternos contra *Toxoplasma*, com títulos baixos (1/16) em 4 gatos, não teve influência sobre a sintomatologia, nem sobre a resposta sorológica ou a eliminação de oocistos, após a primo-infecção. Assim como a presença de anticorpos produzidos pela primo-infecção por VD ou VP não impediu o reaparecimento de sinais clínicos, a elevação de títulos ou reeliminação de oocistos, após a reinfecção.

A resposta sorológica à primo-infecção foi observada em todos os gatos. Após a 2.ª inoculação, entretanto, 8 gatos (32%) permaneceram com títulos inalterados, o que poderia

indicar ausência de reinfecção. Porém, a ausência de queda dos títulos já indicaria a manutenção do processo infeccioso através da reinfecção.

A elevação dos títulos ocorreu na maioria dos gatos (64%) e a queda apenas em um gato (29-II), que, porém, eliminou oocistos.

Ao contrário do observado por RUIZ & FRENKEL (1980)<sup>18</sup> a RSF nunca se tornou negativa, mesmo nos gatos moribundos ou nos com longo período de observação (435 dias).

Como já tínhamos observado anteriormente (SOGORB & col.)<sup>22</sup>, a eliminação de oocistos só foi obtida após inoculações de cistos por via digestiva, tanto após a 1.ª como após a 2.ª inoculação, não ocorrendo após a 3.ª. Este resultado está em desacordo com vários trabalhos de FRENKEL e seus colaboradores, que referem eliminação de oocistos também após inoculações de taquizoitos e esporozoitos por via subcutânea, só não os obtendo após inoculações de “cepas-sem-ooocistos”<sup>9</sup>.

Segundo FRENKEL & SMITH<sup>9</sup>, em gatinhos que receberam inóculos por via subcutânea ou oral e que eliminaram oocistos, estabeleceu-se um estado “imune” que se manifestou pela ausência de eliminação de oocistos, após uma nova infecção com cepa homóloga ou heteróloga, respectivamente em 93% e 89% dos casos.

Em nossa pesquisa, esse estado “imune” foi encontrado em 9 de 16 gatos (56%) inoculados duas ou três vezes com cistos por VD e que eliminaram oocistos apenas após a 1.ª inoculação. Entretanto, houve reeliminação de oocistos em outros 3 gatos (18,7%), nas mesmas condições. E nos 10 gatos em que a primo-infecção foi feita com taquizoitos ou cistos por VP, sem eliminação de oocistos, a 2.ª infecção com cistos por VD levou à eliminação deles por 4 gatos (40%).

RUIZ & FRENKEL<sup>18</sup>, na sua extensa pesquisa em Costa Rica, apresentaram evidência de que gatos mal nutridos podem reeliminar oocistos após uma reinfecção para a qual eles estavam previamente imunizados. Assim, de 7 gatos, um, cujo título de anticorpos tinha caído a zero, reeliminou oocistos em número moderado, entre o 7.º e o 13.º dias de uma 3.ª infecção, quando submetido a uma dieta que levou à redução de 20% do peso e do valor hematócrito.

Segundo nossos resultados, os gatos que reeliminaram oocistos após reinfecção (13-IV, 29-I e 29-II) apresentaram bom estado físico, 2 com peso em elevação. Todos apresentaram anticorpos à RSF por ocasião da eliminação, com títulos de 1/64 e 1/4, os quais permaneceram até o final da experiência (aos 2 e aos 6 meses).

Apesar do pequeno número de casos, estes dados levaram às seguintes conclusões: 1.<sup>a</sup> os gatos em bom estado físico apresentaram boa resposta imunitária, evidenciada pela RSF com títulos predominantemente ascendentes; eliminaram oocistos em 72% dos casos após a primo-infecção, reeliminaram em 30% após a reinfecção e não eliminaram após a 3.<sup>a</sup> infecção. 2.<sup>a</sup> os gatos em mau estado físico apresentaram menor resposta à RSF, com títulos predominantemente baixos ou em declínio; eliminaram oocistos apenas em 28,5% dos casos após a primo-infecção e não os reeliminaram após a reinfecção.

A recuperação do *Toxoplasma* em camundongos ocorreu em 15 de 17 gatos (88,2%), sendo: linfonodos mesentéricos 7 (53,8%), intestino delgado 8 (53,3%), pulmão 7 (41,1%) e cérebro 2 (16,6%). Não ocorreu no fígado (1 gato) e no conteúdo do intestino delgado (3 gatos).

No intestino delgado o parasita foi recuperado 410 dias após a 1.<sup>a</sup> inoculação por VD em 3 gatos. Estes dados coincidiram com os de DUBEY<sup>6</sup> que verificou a persistência do *Toxoplasma*, no intestino delgado de gatos, 140 a 473 dias após a inoculação, sugerindo a ocorrência de recidivas ao nível do epitélio intestinal.

A recuperação do parasita ocorreu no intestino delgado de 6 gatos que tinham eliminado oocistos, mas também de 2 gatos que não os eliminaram, pela possível existência de ciclos agametogônicos.

Os gatos, encontrados naturalmente infectados na frequência de 60% (SOGORB & col.<sup>21</sup>, RUIZ & FRENKEL<sup>18</sup>), são, como outros felídeos, os hospedeiros definitivos do *Toxoplasma gondii*.

São tolerantes à infecção e reinfecção experimentais, como se observou pelo número de animais que foram sacrificados ou deixados vivos, em bom estado físico (72%).

A infecção pelo *Toxoplasma* no gato parece não conferir imunidade absoluta e permanente, apesar da persistência de anticorpos por longo tempo, talvez por toda a vida. Esta falta de imunidade absoluta é evidente por alguns dos resultados obtidos após a reinfecção experimental: a repetição dos sinais clínicos, a elevação do nível de anticorpos e a reeliminação de oocistos.

Foi obtida a reinfecção experimental pelo *Toxoplasma gondii* no gato, porém a reeliminação de oocistos foi pouco frequente e em pequena quantidade.

### SUMMARY

#### Reinfection of mice and cats by *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909. Experimental study

Experimental reinfection by *Toxoplasma gondii* in 27 albino mice and 25 domestic cats was studied. Tachyzoites and cysts of AS28 and N strains, by peritoneal and oral route were used. Infection and reinfection were demonstrated by clinical signs, by dye-test and by shedding of oocysts (cats). Mortality of mice was 56%. Infection by the AS28 strain, with low virulence, chronic evolution and cysts in brain, gave some protection to reinfection, manifested by a lower mortality (12.5%) and mice survival. The same occurred when a virulent strain was attenuated by administration of Sulfamonometoxine. Domestic cats were reinfected by ingestion of *Toxoplasma* cysts, in spite of the presence of a first infection with tachyzoites or cysts by peritoneal or oral via. Mortality was 28% between 4 and 7 1/2 months after infection. After reinfection 48% had higher titers, 44% had unchanged titers and 8% had lower titers. Oocyst shedding after the first infection was 60%, oocyst reshedding was 25%. After the third infection there was no elimination. Shedding of oocysts was observed only after administration of cysts by oral route. Presence of previous serum antibodies of maternal or post-infection origin had no influence neither on immunological response nor on oocysts elimination. Parasites were recovered on 88.2% of the cats and were more frequent in mesenteric lymphonodes and in small intestine; in this organ *Toxoplasma* was present around 14 months after infection. Wellnouri

shed cats presented ascending titers in dye-test, oocysts shedding in 72% of the animals and reshedding in 30%. Malnourished cats presented low or descending titers, oocysts elimination in 28,5% and no reelimination. Experimental reinfection of cats by *Toxoplasma gondii* was obtained but the reshedding was infrequent and with fewer oocysts.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Maria P. Deane, orientadora, durante vários anos, de nossos trabalhos sobre Toxoplasmose.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, F. G. & REMINGTON, J. S. — Immune response to intracellular parasites: suppression by antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 139: 254-258, 1972.
2. CHESSUM, B. S. — Reactivation of *Toxoplasma* oocyst production in the cat by infection with *Isospora felis*. *Brit. Vet. J.* 128: 33-36, 1972.
3. DEANE, M. P.; SOGORB, S. F.; JAMRA, L. M. F. & GUIMARÃES, E. C. — On the gametogonic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13: 110-113, 1971.
4. DE ROEVER-BONNET, H. — Mice and golden hamster infected with an avirulent and a virulent *Toxoplasma* strain. *Trop. Geogr. Med.* 15: 45-60, 1963.
5. DUBEY, J. P. — Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats (Correspondence). *Nature (London)* 262: 213-214, 1976.
6. DUBEY, J. P. — Persistence of *Toxoplasma gondii* in the tissues of chronically infected cats. *J. Parasitol.* 63: 156-157, 1977.
7. DUBEY, J. P. — Toxoplasmosis. *Pract. Veterin.* 49: 10-14, 1978.
8. FRENKEL, J. K. — Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.* 98: 1309-1319, 1967.
9. FRENKEL, J. K. & SMITH, D. D. — Immunization of cats against shedding of *Toxoplasma* oocysts. *J. Parasitol.* 68: 744-748, 1982.
10. HULDT, G. — Experimental toxoplasmosis. Effect of inoculation in seropositive rabbits. *Acta Path. Microbiol. Scandinav.* 68: 592-604, 1966.
11. JAMRA, L. M. F. & GUIMARÃES, E. C. — Simplificações em técnicas para o estudo da Toxoplasmose. *Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.* 9: 67-70, 1976.
12. MEIR, H.; HALZWORTH, J. & GRIFFITHS, R. — Toxoplasmosis in the cat. Fourteen cases. *J. Amer. Vet. Ass.* 131: 395-414, 1957.
13. NERY-GUIMARÃES, P. & LAGE, H. A. — Infecção "per os" de gatos com formas vegetativas de "*Toxoplasma gondii*" Nicolle & Manceaux, 1909 sem produção de cistos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 71: 67-73, 1973.
14. NOBREGA, P.; TRAPP, E. E. & GIOVANNONI, M. — Toxoplasmose epizootica em coelhos. I. Ação da sulfadiazina. *Ciência e Cultura* 4: 134-135, 1952.
15. PETRAK, M. & CARPENTER, J. — Feline toxoplasmosis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 146: 728-734, 1965.
16. PETERSEN, E. K. — Experimental toxoplasmosis in mice and rabbits. *Acta path. Microbiol. Scandinav.* 85: 95-102, 1977.
17. REMINGTON, J. S. — Toxoplasmosis: recent developments. *Ann. Rev. Med.* 21: 201-218, 1970.
18. RUIZ, A. & FRENKEL, J. K. — *Toxoplasma gondii* in Costa Rican cats. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 1150-1160, 1980.
19. SABIN, A. B.; EICHENWALD, H.; FELDMAN, H. A. & JACOBS, L. — Present status of clinical manifestations of Toxoplasmosis in man. *J.A.M.A.* 150: 1063-1069, 1952.
20. SCOTT, R. — Toxoplasmosis. *Bureau of Hygiene and Tropical Disease (apud) Trop. Dis. Bull.* 75: 809-827, 1978.
21. SOGORB, S. F.; JAMRA, L. M. F.; GUIMARÃES, E. C. & DEANE, M. P. — Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres em S. Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14: 314-320, 1972.
22. SOGORB, S. F.; JAMRA, L. M. F.; GUIMARÃES, E. C. & DEANE, M. P. — Experimental feline toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15: 131-138, 1973.
23. WERNER, H. & EGGER, I. — Über die Schutzwirkung von *Toxoplasma*-Antikörpern gegen Reinfektionen. *Z. Tropenmed. Parasit.* 24: 174-180, 1973.
24. WERNER, H. — Über die Wirkung von *Toxoplasma*-Antikörpern auf *T. gondii* nach Reinfektion. II. Mitteilung: Untersuchungen über das Auftreten von *Toxoplasmen* in peripheren Blut nach Primär- und Sekundärinfektion. *Zbl. Bakter. I. Abt. Orig.* 238: 122-127, 1977.

Recebido para publicação em 17/6/1985.