

Toxoplasmose encefálica em um gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*)

Encephalic Toxoplasmosis in a White-Eared Possum (*Didelphis albiventris*)

Jair Alves Ferreira Junior¹, Isabella Luanni de Oliveira Cunha¹, Líria Queiroz Luz Hirano²,
Nathália Dela-Sávia da Fonseca¹, Karla Alvarenga Nascimento¹,
Juliana Targino Silva Almeida e Macêdo¹ & Pedro Miguel Ocampos Pedrosa¹

ABSTRACT

Background: Toxoplasmosis is caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan that belongs to the Apicomplexa phylum, coccidian subclass, and affects all warm-blooded animals. The role of opossums in the epidemiology of toxoplasmosis in Brazil is not fully understood, and there are very few descriptions of toxoplasmosis lesions in these animals. This report describes the anatomopathological, molecular and immunohistochemical findings of a case of encephalic toxoplasmosis in free-living white-eared possum (*Didelphis albiventris*).

Case: A young male opossum (*D. albiventris*), was treated at the Veterinary Hospital of Wild Animals of the University of Brasília, Federal District. The animal was apathetic, uncoordinated, reluctant to move, and had an exposed proximal fracture in the left radius and ulna with laceration of muscles and adjacent tendinous structures. Amputation on the left thoracic limb was performed followed by analgesia and antibiotic therapy. The environment is frequented by other wild animals, and stray cats have access to the patio of the building. Twenty-five days after arriving at the hospital, the animal was found dead in its cage. After death, a necropsy was performed. Organ fragments from the abdominal cavity, thoracic and central nervous system were collected, processed routinely for histology and stained with hematoxylin and eosin. Macroscopic lesions in the central nervous system were not observed. On microscopy, the brain showed moderate random glial nodules throughout the neuropil associated with the presence of spherical to elongated parasitic cysts of about 20 µm, with a thin wall and with its interior full of bradyzoites, consistent with *Toxoplasma gondii*. There was also moderate fibrinoid necrosis and moderate multifocal lymphoplasmacytic infiltrate surrounding the blood vessels (perivascular cuffs) To investigate the etiology of the brain injury, brain sections were subjected to immunohistochemistry (IHC) and real-time polymerase chain reaction (qPCR) technique for detection of *T. gondii* and *Neospora caninum*. Immunostaining for *T. gondii* in the cyst wall and in bradyzoites and negative immunostaining for *N. caninum*. qPCR was positive for *T. gondii* and negative for *N. caninum*.

Discussion: Diagnosis of encephalic toxoplasmosis in a *Didelphis albiventris* was possible based on histopathological, immunohistochemical and molecular findings. The morphological classification of the brain lesion was important for the diagnosis. Brain toxoplasmosis in opossums usually results in focal areas of malacia on macroscopy and focally extensive necrosis on microscopy, neutrophil infiltrate, calcified necrotic material, and perivascular cuffs of lymphocytes and plasma cells. In the present case, similar histopathological lesions were noted, but no significant macroscopic changes were observed. The etiology here was defined by immunohistochemistry and qPCR, techniques proven to be useful and with good specificity for diagnosing toxoplasmosis in mammals. It is believed that the positive immunohistochemical and molecular result for *Toxoplasma gondii* together with the negative result for *Neospora caninum* were conclusive for the diagnosis. Thus, we demonstrate here a *post mortem* diagnosis of toxoplasmosis in a free-living synanthropic opossum and the use of anatomopathology, immunohistochemistry and real-time polymerase chain reaction as a diagnostic option for this disease in opossums.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, marsupial, immunohistochemistry, Real time PCR, protozoal encephalitis.

Descritores: *Toxoplasma gondii*, marsupial, imuno-histoquímica, Real time PCR, encefalite protozoal.

DOI: 10.22456/1679-9216.117794

Received: 5 September 2021

Accepted: 10 November 2021

Published: 19 December 2021

¹Laboratório de Patologia Veterinária & ²Setor de Animais Silvestres, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil. CORRESPONDENCE: P.M.O. Pedrosa [pedrosovet@yahoo.com.br]. Via L4 Norte s/n. Campus Darcy Ribeiro. CEP 70910-970 Brasília, DF, Brazil.

INTRODUÇÃO

Toxoplasmose é causada por *Toxoplasma gondii*, protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse coccidia. Seus hospedeiros definitivos são gatos e outros felídeos e seus hospedeiros intermediários são todos os animais de sangue quente, incluindo aves [9]. A doença afeta principalmente o sistema nervoso central e ocasionalmente sistema reprodutor, músculos estriados e órgãos viscerais como fígado [8]. No Brasil, há vários estudos sobre a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em gambás-de-orelhas-pretas (*Didelphis marsupialis*) [10], gambás (*Didelphis* spp.), e gambás-de-orelhas-brancas (*D. albiventris*) [4]. Contudo, a participação dos gambás na epidemiologia da toxoplasmose no Brasil não está totalmente esclarecida.

A toxoplasmose clínica não é comum em gambás americanos, que possuem certa resistência. Quando a doença é identificada em gambás, foram observadas macroscopicamente consolidação pulmonar, hemorragias e estrias pálidas no músculo cardíaco, ulceração e avermelhamento gastrointestinal e malacia cerebral. Microscopicamente, no encéfalo, registrou-se gliose focal, necrose focal e extensa e infiltrados de neutrófilos, material necrótico calcificado, manguito perivascular de linfócitos e plasmócitos. O diagnóstico nesses casos pode ser confirmado por imuno-histoquímica [2]. O objetivo do presente trabalho é descrever os achados anatomopatológicos e imuno-histoquímicos de um caso de toxoplasmose encefálica em gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) de vida livre.

CASO

Um gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris* Lund, 1840), macho, jovem foi atendido no Setor de Animais Silvestres do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (HVet-UnB), Distrito Federal. O animal apresentava apatia, incoordenação, relutância em se movimentar, além de uma fratura exposta proximal em rádio e ulna esquerdos com laceração de musculatura e estruturas tendíneas adjacentes. Foi realizada amputação do membro torácico esquerdo seguido de analgesia e terapia antimicrobiana. Após 25 dias da chegada ao hospital, o animal foi encontrado morto na gaiola.

Durante a necropsia notou-se leve quantidade de parasitos cilíndricos medindo 3,0 cm de comprimento por 0,2 cm de diâmetro em meio ao conteúdo

estomacal consistentes com *Physaloptera* spp. Não foram observadas alterações macroscópicas no encéfalo. Fragmentos de órgãos da cavidade abdominal, torácica e sistema nervoso central foram colhidos, fixados em formol tamponado a 10%, clivados, processados rotineiramente para histologia e corados pela hematoxilina e eosina (HE)¹.

Microscopicamente, o encéfalo apresentou moderados nódulos gliais aleatórios por todo neurópilo associado à presença de cistos parasitários (Figura 1) esféricos a alongados de cerca de 20 µm, com fina parede e com o seu interior repleto de bradizoítos, consistentes com cistos de *Toxoplasma gondii*. Havia também necrose fibrinoide moderada e infiltrado linfoplasmocítico multifocal moderado circundando os vasos sanguíneos (manguitos perivasculares). Adicionalmente foram observadas miocardite mononuclear multifocal discreta e broncopneumonia neutrofílica multifocal moderada com edema difuso acentuado.

Para confirmação da etiologia da lesão cerebral, blocos de parafina contendo cortes de encéfalo foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) e técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de *T. gondii* e *Neospora caninum*.

Na imuno-histoquímica a recuperação antigênica foi feita com tripsina 0,1% a 37°C. O bloqueio das reações inespecíficas foi feito com leite desnatado (Molico®)² a 5% diluído em PBS por 15 min. Em seguida, as lâminas foram cobertas com anticorpo primário policlonal (soro) anti-*T. gondii* na diluição de 1:10000 e outra amostra com anticorpo policlonal anti-*N. caninum* na diluição 1:200 (VMRD)³. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 14-16 h (*overnight*) a 6°C. Utilizou-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB-HRP, Dako®)⁴ para *T. gondii* e a técnica da peroxidase-HRP (Kit ImmPRESS®)⁵ para *N. caninum*. A revelação foi com o cromógeno 3,3 diaminobenzidina (Kit DAB Dako®)⁴ e contra corado com hematoxilina de Harris. Controles positivos testados anteriormente foram inseridos simultaneamente com as lâminas testadas. A análise revelou forte imuno-marcação para *T. gondii* na parede do cisto e em bradizoítos (Figura 2) e nenhuma imuno-marcação para *N. caninum*.

Para a técnica de qPCR foi feita a desparafinização, reidratação e extração de DNA (Kit Wizard Genomic DNA Purification®)⁶. A qPCR para detecção,

quantificação de *T. gondii* e *N. caninum* foram utilizados kits específicos (Genesig®)⁷ contendo os “primers”. Os princípios da técnica foram semelhantes aos descritos na literatura [5,11]. Para obtenção dos dados de amplificação foi utilizado equipamento específico (StepOnePlus™ - Real Time PCR System®)⁸. Controles negativos e positivos foram incluídos em todas as reações, com adição de água livre de DNases e RNases para o controle das reações. A qPCR foi positiva para *T. gondii* e negativa para *N. caninum*.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de toxoplasmose encefálica em um gambá-de-orelha-branca foi possível com base nos achados histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares. Por se tratar de um mamífero sinantrópico de vida livre, a provável fonte de infecção para o gambá foi o contato com gatos domésticos, já que este é reconhecidamente o hospedeiro definitivo do agente e elimina oocistos no ambiente [9]. O Setor de Animais Silvestres do HVet-UnB se localiza em um prédio próximo do Setor de Pequenos Animais e o animal permaneceu em ambiente interno durante a internação, o que limitou o contato com gatos errantes, entretanto, não se descarta a hipótese de a infecção ter ocorrido durante a internação hospitalar devido ao tempo de 25 dias, que corresponde ao período para formação de cistos do *Toxoplasma*.

Soroprevalências de 13 a 37,3% de toxoplasmose têm sido encontradas em gambás das Américas e no estado de São Paulo [4], o que comprova que o agente é circulante entre esses animais, contudo pouco se sabe sobre lesões causadas por esse agente em

marsupiais brasileiros. Por outro lado, por serem protozoários persistentes no ambiente, os gambás podem servir de indicadores da contaminação ambiental no local em que vivem e contribuir com a manutenção do agente na natureza [7].

A patogenia nesses animais é semelhante ao que ocorre nos animais domésticos e certamente o cisto se formou no sistema nervoso central, em consequência da ingestão prévia de oocistos esporulados do ambiente. Protozoários do filo Apicomplexa se caracterizam por reprodução assexuada e sexuada. O ciclo se inicia com eliminação do oocisto em fezes de felídeos [9]. A esporulação então se completa em 1-5 dias formando 2 esporocistos, cada qual com 4 esporozoítas. O animal homeotérmico ingere o oocisto esporulado. Os oocistos esporulados então liberam esporozoítas no intestino, os quais penetram nas células intestinais e nos linfonodos satélites, originando as formas de multiplicação rápida chamadas de taquizoítas. Os taquizoítas invadem outras células, incluindo as células do sistema nervoso central originando então as formas de multiplicação lenta, os bradizoítas, que formam cistos teciduais [1,9]. Incoordenação, apatia e relutância em se movimentar são sinais clínicos decorrentes das lesões associadas aos cistos no parênquima cerebral e já foram descritos em um estudo com gambás australianos com toxoplasmose encefálica [2].

A classificação morfológica da lesão encefálica foi importante para o diagnóstico. Toxoplasmose encefálica em gambás normalmente resulta em áreas focais de malacia na macroscopia e na microscopia necrose focalmente extensa, infiltrados de neutrófilos, material necrótico calcificado e manguitos perivasculares de

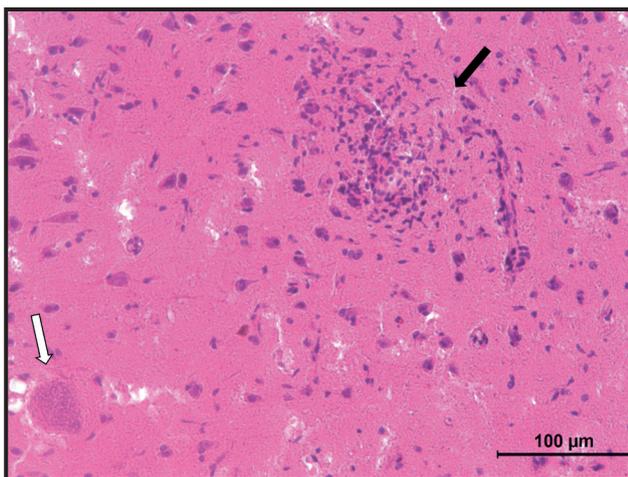


Figura 1. Toxoplasmose encefálica em *Didelphis albiventris*. Observar à direita do campo nódulo glial (gliose - seta preta) e um cisto esférico parasitário no neuropilo (seta branca) [HE; Obj.10x].

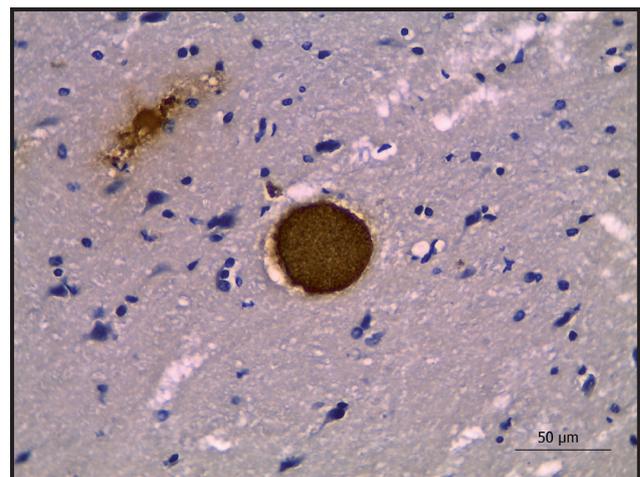


Figura 2. Toxoplasmose encefálica em *Didelphis albiventris*. Observar uma forte imunomarcção anti-*Toxoplasma gondii* na parede dos cistos e bradizoítos, no neuropilo [Estreptavidina-biotina-peroxidase, DAB; Obj.40x].

linfócitos e plasmócitos [2]. No presente caso notaram-se lesões microscópicas semelhantes, porém não se observaram alterações macroscópicas significativas. Tal achado explica-se pelo caráter subagudo da lesão sem a formação de áreas de malacia e, portanto, não vistas macroscopicamente. Apesar disso, a vasculite visualizada poderia formar áreas de necrose mais extensas com a evolução da lesão. Vasculite já é conhecida causada por *Toxoplasma*, como observada aqui, porém não há uma causa ou toxina definida [2].

Morfologicamente os cistos de *Toxoplasma gondii* devem ser diferenciados de *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona*. Cistos de *N. caninum* no sistema nervoso têm normalmente parede mais espessa do que os de *T. gondii*, os quais podem ter parede imperceptível na microscopia ótica comum [1,3]. Gambás geralmente são hospedeiros definitivos de *Sarcocystis*, dentre eles *S. neurona* e, portanto, não apresentam doença clínica. Supletivamente, cistos de *Sarcocystis* são maiores, muitas vezes sem reações inflamatórias e, quando presentes, as lesões microscópicas podem incluir miosite e miocardite ao invés de encefalite [3]. A miocardite mononuclear não teve agente etiológico intra-lesional, contudo não se descarta estar associada à toxoplasmose. Sabe-se que, além do sistema nervoso central, a doença pode afetar o músculo cardíaco associada à fase de migração dos taquizoítas instigando as lesões nesses órgãos [1,3].

A etiologia aqui foi definida por imuno-histoquímica e a especificidade da técnica foi reforçada por

qPCR. Acredita-se que o resultado imuno-histoquímico e molecular positivo para *Toxoplasma gondii* aliado ao resultado negativo para *Neospora caninum* foram conclusivos para o diagnóstico. Em um trabalho realizado com material de aborto ovino constatou-se que a imuno-histoquímica é um teste com especificidade de 96-100%, quando correlacionada com resultados de qPCR dos mesmos tecidos [6], o que torna a IHQ uma técnica segura para diagnóstico etiológico em mamíferos, notadamente quando aliada à qPCR.

Assim demonstramos, no presente relato, um diagnóstico *post mortem* de toxoplasmose em um gambá sinantrópico de vida livre e a utilização da anatomopatologia, imuno-histoquímica e qPCR como opção diagnóstica dessa doença em gambás.

MANUFACTURERS

¹WCOR Corantes Comercio e Servicos Eireli. São Paulo, SP, Brazil.

²Nestlé Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

³VMRD Inc. Pullman, WA, USA.

⁴Dako North America Inc. Carpinteria, CA, USA.

⁵Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA.

⁶Promega Corporation. Madison, WI, USA.

⁷Primerdesign Ltd. Chandler's Ford, Hampshire, UK.

⁸Applied Biosystem. Waltham, MA, USA.

Acknowledgements. Agradecemos a bolsa de pesquisa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concedida à J.A. Ferreira Júnior.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Bowman D.D. 2010.** Protozoários - Toxoplasma. In: Bowman D.D. (Ed). *Georgis Parasitologia Veterinária*. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.96-98.
- 2 Canfield P.J., Hartley W.J. & Dubey J.P. 1990.** Lesions of toxoplasmosis in Australian marsupials. *Journal of Comparative Pathology*. 103: 159-167. DOI:10.1016/s0021-9975(08)80172-7
- 3 Gardiner C.H., Payer R. & Dubey J.P. 1988.** *Toxoplasma* and *Hammondia*. In: Gardiner C.H., Payer R. & Dubey J.P. (Eds). *An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. Agriculture Handbook*. Washington: United States Department of Agriculture, pp.52-55.
- 4 Horta M.C., Ragozo A.M.A., Casagrande R.A., Reiko E. & Gennari S.M. 2016.** Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leptospira* spp. antibodies in opossums (*Didelphis* spp.) in São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 53: 1-9. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2016.110381
- 5 Lin M.H., Chen T.C., Kuo T.T. & Tseng C.C. 2000.** Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(11): 4121-4125. DOI: 10.1128/JCM.38.11.4121-4125.2000

- 6 Meixner N., Sommer M.F., Scuda N., Matiasek K. & Müller M. 2020. Comparative aspects of laboratory testing for the detection of *Toxoplasma gondii* and its differentiation from *Neospora caninum* as the etiologic agent of ovine abortion. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 32: 898-907. DOI: 10.1177/1040638720962110
- 7 Nascimento C.C. & Horta M.C. 2014. Didelphimorphia. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds). *Tratado de Animais Selvagens*. 2.ed. Rio de Janeiro: Roca, pp.701-702.
- 8 Silva F.W.S., Alves N.D., Albano S.S., Amora F.H.V.T., Accioly M.P., Carvalho C.G. & Feijó F.M.C. 2006. Toxoplasmoze: uma revisão. *Ciência Animal*. 16: 71-77.
- 9 Taylor M.A., Coop R.L. & Wall R.L. 2017. Protozoa. In: Taylor M.A., Coop R.L. & Wall R.L. (Eds). *Parasitologia Veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.141-142.
- 10 Yai L.E.O., Cañon-Franco W.A., Geraldi V.C., Summa M.E.L., Camargo M.C.G., Dubey J.P. & Gennari S.M. 2003. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. *Journal of Parasitology*. 89: 870-871. DOI: 10.1645/GE-83R
- 11 Yamage M., Flechtner O. & Gottstein B. 1996. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Parasitology*. 82: 272-279. DOI: 10.2307/3284160