

SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* EM MAMÍFEROS E AVES MARINHAS DE VIDA LIVRE NO LITORAL SUL DE SANTA CATARINA, BRASIL

Felipe Rieth de Lima, Ana Paula Remor Sebolt, Francieli Maria Wilhelms, Julia Milena Sandri Pereira, Luiz Daniel de Barros, Pedro Volkmer de Castilho, Gabriela Cristini de Souza, Eduardo Macagnan, Helio Langoni, Gismelli Cristiane Angeluci, Vitoria Maximiniana Soares dos Santos, Andreas Lazaros Chryssafidis, Anderson Barbosa de Moura

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário cosmopolita, agente etiológico da toxoplasmose, uma zoonose capaz de infectar todos os animais homeotérmicos, incluindo os seres humanos (DUBEY, 2010). No hemisfério Sul, especialmente na América do Sul e no Brasil, observa-se elevada diversidade genética de *T. gondii*, incluindo genótipos e cepas atípicas pouco estudadas ou desconhecidas, o que reforça a importância epidemiológica de investigações nessa área (AJZENBERG *et al.*, 2004; CARME *et al.*, 2009; HOWE; SIBLEY, 1995). Este parasito pode contaminar ambientes marinhos e, conseqüentemente, organismos aquáticos, estabelecendo um ciclo epidemiológico complexo e interligado. Apesar disso, as informações disponíveis sobre a circulação do agente em espécies marinhas permanecem limitadas (CONRAD *et al.*, 2005; ESMERINI; GENNARI; PENA, 2010; LINDSAY; DUBEY, 2009; MILLER *et al.*, 2002; UREÑA *et al.*, 2022). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo determinar a soroprevalência, isolar e caracterizar molecularmente *T. gondii* em animais marinhos de vida livre no litoral sul de Santa Catarina.

DESENVOLVIMENTO

Amostras de tecidos (sistema nervoso central, musculatura esquelética, coração, fígado e pulmão) de 90 animais marinhos (aves e mamíferos) foram coletadas de espécimes recolhidos ou encontrados mortos pelo PMP-BS, em parceria com a Unidade de Estabilização de Fauna Marinha da UDESC-CERES, no litoral sul do Estado de Santa Catarina. Pools desses tecidos foram homogeneizados, submetidos à digestão péptica e inoculados, por via subcutânea (1 mL), em camundongos para detecção e isolamento de *T. gondii* por meio de bioensaios (n=90). Cada bioensaio foi composto por três camundongos. Os camundongos foram avaliados diariamente quanto a sinais de infecção e eutanasiados até 45 dias pós-inoculação ou antes, caso apresentassem sinais clínicos agudos compatíveis com toxoplasmose. Após a eutanásia, foram coletados cérebro, pulmão e sangue (para obtenção de soro), sendo então realizados *squash* de cérebro, *imprint* de pulmão e lavado peritoneal para a pesquisa de formas parasitárias (cistos e/ou taquizoítos). O cérebro e/ou o lavado peritoneal de camundongos provenientes de bioensaios positivos (n=38) foram submetidos à extração de DNA utilizando o kit comercial DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen), conforme as instruções do fabricante, seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do fragmento de 529pb do genoma do parasito, utilizada como triagem. As amostras positivas na PCR de 529pb foram posteriormente analisadas para detecção do gene 18S por Nested-PCR, seguida de RFLP-PCR empregando 12 marcadores genéticos para genotipagem de *T. gondii*. Os genótipos obtidos foram comparados com os registros disponíveis na plataforma ToxoDB. Amostras de soro viáveis de camundongos e de aves (n=19), bem como o exsudato cárneo de aves (n=372), foram avaliadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, adotando-se pontos de corte de 1:16 (soro) e 1:2 (exsudato cárneo), respectivamente. Além

disso, amostras de exsudato cárneo de aves (n=372) também foram submetidas à detecção de IgG pelo Teste de Aglutinação Microscópico (MAT), com ponto de corte de 1:16.

RESULTADOS

Dos 90 bioensaios realizados, 84,44% (76/90) foram provenientes de aves, 12,22% (11/90) de mamíferos e 3,34% (3/90) de répteis. Entre esses, 42,22% (38/90) apresentaram resultado positivo, considerando a detecção de estruturas parasitárias (cistos e/ou taquizoítos) em pelo menos uma das técnicas diagnósticas empregadas (lavado peritoneal, *imprint* de pulmão, *squash* de cérebro) e/ou sorologia positiva. Dos 38 bioensaios positivos, 42,11% (16/38) foram obtidos a partir de tecidos de gaivotão (*Larus dominicanus*), 39,47% (15/38) de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), 5,26% (2/38) de biguá (*Phalacrocorax brasilianus*), 2,63% (1/38) de atobá-pardo (*Sula leucogaster*), 2,63% (1/38) de pardela-sombria (*Puffinus puffinus*) e 7,89% (3/38) de toninha (*Pontoporia blainvillei*). Na PCR de triagem para o fragmento de 529pb, 71,05% (27/38) dos bioensaios positivos apresentaram resultado positivo, distribuídos da seguinte forma: 51,85% (14/27) de *L. dominicanus*, 29,63% (8/27) de *S. magellanicus*, 3,70% (1/27) de *P. brasilianus*, 3,70% (1/27) de *S. leucogaster*, 3,70% (1/27) de *P. puffinus* e 7,40% (2/27) de *P. blainvillei*. Após genotipagem das amostras positivas, seis apresentaram resultado conclusivo (cinco de *L. dominicanus* e uma de *P. blainvillei*), apontando o genótipo #170 da plataforma ToxoDB infectando um espécime de *L. dominicanus* e *P. blainvillei*, e quatro outros genótipos ainda não descritos na literatura infectando *L. dominicanus*. Na RIFI aplicada ao exsudato cárneo de aves, 33,60% (125/372) das amostras foram positivas, com títulos de anticorpos variando de 2 a 32, e as espécies *L. dominicanus* e *S. magellanicus* representando a maior parte dos positivos, com 27,2% (34/125) e 63,2% (79/125) dos positivos, respectivamente. No MAT, 2,69% (10/372) das amostras foram positivas, todas de *L. dominicanus*, com títulos entre 16 e 256. Entre as amostras de soro de aves submetidas à RIFI (n=19), 10,52% (2/19) foram positivas, ambas de *L. dominicanus*, com títulos de 16.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos confirmam a ocorrência de *T. gondii* em animais marinhos do litoral sul de Santa Catarina, por meio de diferentes métodos diagnósticos, incluindo o isolamento de genótipos inéditos na literatura e o primeiro registro na literatura científica do isolamento em toninhas (*P. blainvillei*). A ocorrência da infecção nessas espécies possivelmente está associada aos seus hábitos alimentares, refletindo a contaminação do ambiente marinho por formas infectantes do parasito. Esses achados ampliam o conhecimento sobre a epidemiologia de *T. gondii* em ecossistemas marinhos, ressaltando a necessidade de investigações adicionais voltadas à avaliação dos aspectos clínicos da toxoplasmose nessas espécies e ao papel de animais migratórios na dispersão do agente.

Palavras-chave: bioensaio; genotipagem; RFLP-PCR; MAT; RIFI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJZENBERG, D. *et al.* Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 34, n. 10, p. 1185–1196, set. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751904001390>>.

CARME, B. *et al.* Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 4, p. 656–658, abr. 2009.

CONRAD, P.A. *et al.* Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 11–12, p. 1155–1168, out. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751905002444>>.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2. ed. [S.l.]: Springer Science and Business Media LLC, 2010. v. 3.

ESMERINI, Patrícia O.; GENNARI, Solange M.; PENA, Hilda F.J. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, v. 170, n. 1–2, p. 8–13, maio 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401710000701>>.

HOWE, Daniel K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 172, p. 1561–1566, 1995. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/>>.

LINDSAY, David S.; DUBEY, J. P. Long-Term Survival of *Toxoplasma gondii* Sporulated Oocysts in Seawater. *Journal of Parasitology*, v. 95, n. 4, p. 1019–1020, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-1919.1>>.

MILLER, M.A *et al.* Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 8, p. 997–1006, jul. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751902000693>>.

UREÑA, N. M. L. *et al.* Contamination of Soil, Water, Fresh Produce, and Bivalve Mollusks with *Toxoplasma gondii* Oocysts: A Systematic Review. *Microorganisms*, v. 10, n. 3, p. 517, 27 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/10/3/517>>.

DADOS CADASTRAIS

BOLSISTA: Felipe Rieth de Lima

MODALIDADE DE BOLSA: PIBIC/AF

VIGÊNCIA: 09/2024 a 07/2025 – Total: 11 meses

ORIENTADOR(A): Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura

CENTRO DE ENSINO: CAV

DEPARTAMENTO: Medicina Veterinária

ÁREAS DE CONHECIMENTO: Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva / Doenças Parasitárias dos Animais

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Soroprevalência, isolamento e caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* em mamíferos e aves marinhas de vida livre no litoral Sul de Santa Catarina, Brasil.

Nº PROTOCOLO DO PROJETO DE PESQUISA: NPP3871-2022