

AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE HEMATOXILINA-EOSINA, IMUNOFLUORESCÊNCIA E PEROXIDASE ANTI-PEROXIDASE NO DIAGNÓSTICO POST-MORTEM DA TOXOPLASMOSE SUÍNA¹

NEUSA MARIA ALVES VIOTTI²
ROBERTA LEMOS FREIRE²
ITALMAR TEODORICO NAVARRO²
ODILON VIDOTTO²

VIOTTI, Neusa Maria Alves; FREIRE, Roberta Lemos; NAVARRO, Itamar Teodorico ; VIDOTTO, Odilon. Avaliação das técnicas de hematoxilina-eosina imunofluorescência e peroxidase anti-peroxidase no diagnóstico post-mortem da toxoplasmose suína. *Semina: Ci.Agr.*, Londrina, v.16, n.1, p. 107-114, mar. 1995.

RESUMO: Seis suínos mestiços Landrace-Large White, com aproximadamente 120 dias de idade, foram inoculados, via endovenosa, com taquizoítos das cepas AS 28, LIV-IV e N de *Toxoplasma gondii* e analisados quanto aos aspectos clínico, sorológico, parasitológico e histopatológico. Para a avaliação das técnicas de diagnóstico post-mortem, os animais foram sacrificados e necropsiados nas fases aguda (n=3) e crônica (n=3) da infecção. Tecidos formolizados e parafinados foram submetidos às técnicas de Hematoxilina-Eosina (H.E.), Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP). A H.E. revelou-se eficiente na análise das alterações morfológicas dos diferentes tecidos, mas não se mostrou útil para detectar *T. gondii*. A RIFI e a PAP revelaram o parasito na intimidade dos tecidos, sendo que a última mostrou-se mais eficiente, uma vez que, além de demonstrar parasitas, permitiu a análise das alterações morfológicas dos órgãos estudados.

PALAVRAS-CHAVE: Toxoplasmose, histopatologia, imunohistoquímica, imunofluorescência, suínos.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, uma das mais importantes zoonoses, é causada pelo *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909), protozoário com uma longa existência, primordialmente intracelular com a capacidade de invadir praticamente todos os tecidos e órgãos dos animais de sangue quente, inclusive o homem. Este protozoário determina sintomas e lesões severas porém inespecíficas, dificultando o diagnóstico clínico, necessitando invariavelmente do diagnóstico laboratorial.

Nas preparações coradas segundo as técnicas rotineiras, suficientes para estudar a arquitetura celular do órgão ou tecido, com suas variações patológicas, não se pode esperar o achado do parasito, mais do que de modo fortuito e, nem sempre, com imagem convincente, já que o *T. gondii* não possui características tintoriais próprias, que permitam distingui-lo nitidamente das células adjacentes, podendo ser confundido com núcleos ou fragmentos nucleares que têm as mesmas propriedades tintoriais (FARRELL et al., 1952; TSUNEMATSU et al.; 1964; BARBOSA, 1988).

SAINTE-MARIE, 1962; TSUNEMATSU et al., 1964; LEE et al., 1973; FELTKAMP-VROOM, 1975;

ARNOLD et al., 1975; DORSETT & IOACHIM, 1978; TAYLOR, 1978; CULLING et al., 1980 estudaram a Toxoplasmose a partir da imunofluorescência em tecidos, analisando as características próprias do método, que se mostraram até certo ponto limitadas em determinadas finalidades, tais como: distorção da imagem emitida, decorrente de dificuldades de ajuste da iluminação do campo e da absorção luminosa pelo conjugado; preservação da atividade antigênica e manutenção de boa condição morfológica (MILLER, 1972; BROZMAN, 1978; DORSETT & IOACHIM, 1978; ARNOLD et al., 1975); curto período de tempo para análise adequada das preparações, decorrente do decréscimo da fluorescência emitida (FELTKAMP-VROOM, 1975; TAYLOR, 1978). Acrescentam-se, finalmente, os equipamentos relativamente caros.

STERNBERGER et al. (1970) aplicaram, pela primeira vez, o método peroxidase anti-peroxidase (PAP), demonstrando especificamente o *Treponema pallidum*. Nesse método, o complexo peroxidase anti-peroxidase (PAP) é constituído por duas moléculas de imunoglobulina e três de peroxidase ligadas por pontes naturais. Esse método utiliza anticorpo não marcado e se processa em três estágios, sendo o terceiro constituído pelo complexo PAP.

Trabalhos comparativos têm demonstrado, tanto

1 - Trabalho realizado nas dependências do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Hospital Veterinário da UEL.

2 - Depto. de Medicina Veterinária/CCA/Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, PR, Brasil, CEP 86051-970.

no nível de microscopia óptica como de microscopia eletrônica, a superioridade do método do anticorpo não marcado (PAP), principalmente em relação à sensibilidade e à qualidade das preparações (TAYLOR, 1978; BARBOSA, 1988), empregado com êxito na identificação de antígenos teciduais os mais diversos, como antígenos virais, bacterianos e alguns parasitas de difícil identificação pelos métodos convencionais (TAYLOR, 1978; CULLING et al., 1980; KITTAS et al., 1984; BJERKAS & LANDSVERK, 1986; BARBOSA, 1988). Essa utilização é encorajada também pelo fato de que, na maioria das vezes, tecidos fixados rotineiramente em formol prestam-se adequadamente para a aplicação dessas técnicas, mesmo para a detecção de fragmentos de parasitas em áreas de necrose ou parasitas parcialmente digeridos no interior de macrófagos (TAYLOR, 1978; BJERKAS & LANDSVERK, 1986; FELTKAMP-VROOM, 1975; BROZMAN, 1978; DORSETT & IOACHIM, 1978; BARBOSA, 1988). Portanto, essas técnicas denominadas imunohistoquímicas, tais como a PAP e a Avidina-Biotina, têm sido amplamente utilizadas no diagnóstico pós-morte de diversos agentes infecciosos, tendo mostrado bons resultados, particularmente na identificação do *T. gondii* na intimidade dos tecidos (DAVIDSON et al., 1993; FALANGOLA & PETITO, 1993; DUBEY & LIN, 1994; BREZIN et al., 1994). Utilizando-se de rotinas implantadas nos Laboratórios de Parasitologia Veterinária e de Histopatologia Veterinária, realizou-se o presente trabalho com o objetivo de avaliar as técnicas de Hematoxilina Eosina, Imunofluorescência Indireta e Peroxidase anti-Peroxidase, no diagnóstico da Toxoplasmose suína.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 6 suínos mestiços Landrace/ Large White em fase de crescimento, sorologicamente negativos para *T. gondii*, nos quais foram inoculados, via endovenosa, $2,0 \times 10^7$ taquizoitos de um "pool" das cepas AS 28, LIV IV e N, em 1 ml de solução salina estéril. Foram utilizados também camundongos albinos para determinação da parasitemia e para o reisolamento de *T. gondii* dos órgãos dos suínos inoculados. Os suínos foram observados diariamente pela aferição da temperatura retal e visualização de outros sinais clínicos.

A cada 72 horas, desde a inoculação até a necrópsia, colhia-se de cada suíno, 5ml de sangue com EDTA para a determinação da parasitemia, conforme técnica preconizada por COSTA (1979). Também foram colhidas amostras de 5ml de sangue para obtenção de soro, utilizados no acompanhamento da evolução dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, procedendo-se à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), conforme técnica descrita por

CAMARGO (1973), utilizando conjugado IgG anti-suíno (Sigma).

Quando os animais apresentaram sinais clínicos da Toxoplasmose e níveis de anticorpos medidos pela RIFI, compatíveis com a fase aguda da doença (VIDOTTO & COSTA, 1987), 3 animais foram sacrificados com choque elétrico, necropsiados e as alterações macroscópicas anotadas. Os outros 3 suínos foram mantidos em observação clínica, sorológica e parasitológica até que os títulos de anticorpos baixassem e se estabilizassem, sugerindo a fase crônica da doença, quando os animais também foram sacrificados com choque elétrico, necropsiados e as alterações macroscópicas anotadas. De cada suíno necropsiado, em ambas as fases, foram colhidas amostras de cérebro, intestino, retina, fígado, pulmão, pâncreas, músculos esquelético, cardíaco e língua, para o reisolamento e processamento histológico.

Para o reisolamento, utilizaram-se fragmentos com 30 gramas que foram submetidos à digestão péptica artificial conforme técnica preconizada por DUBEY (1988). Após digestão os materiais eram lavados e ressuspensos em salina contendo 1 mg de estreptomicina e 1000 UI de penicilina por mililitro. De cada amostra, foram inoculados 2 ml da suspensão por camundongo, via intraperitoneal, em três camundongos albinos, os quais ficaram em observação diária durante 6 semanas. Os camundongos que morriam ou que apresentavam sinais sugestivos da doença, eram examinados microscópicamente para a pesquisa de taquizoitos no exsudato peritoneal e aqueles sobreviventes, ao término do período de observação, eram sacrificados e examinados sorologicamente, através da RIFI com conjugado IgG anti-camundongo (Sigma) (NAVARRO, 1987).

Para o processamento histológico, fragmentos dos diferentes órgãos foram fixados em formalina 10% em pH neutro e processados pela rotina de microtomia em parafina. Foram confeccionadas 20 lâminas para cada fragmento em cortes semi-seriados com 4m de espessura. Em seguida, procederam-se às colorações utilizando-se 6 lâminas alternadamente para cada técnica: Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison (H.E.); Imunofluorescência Indireta (RIFI) conforme técnica de CULLING et al. (1980) e Peroxidase anti-Peroxidase (PAP) conforme preconizado por TAYLOR (1978).

RESULTADOS

Todos os suínos inoculados apresentaram evidências da infecção Toxoplásmica que pôde ser comprovada pelo aparecimento de sintomas (hipertermia, anorexia, dispnéia e secreções oculares e nasal), reisolamento do agente do sangue (Tabela 1), sorologia positiva à RIFI com títulos elevados (Tabela 2) e, finalmente, pelo reisolamento do *T. gondii* de diferentes órgãos (Tabela 3).

Através das técnicas imunohistoquímica e imunofluorescência (PAP e RIFI) observaram-se lesões e/ou a presença do *T. gondii* e seus antígenos nos tecidos dos suínos sacrificados na fase aguda da doença, enquanto pela técnica histológica de H.E não

foi possível a visualização do parasita, ainda que tenha detectado alterações microscópicas em diferentes órgãos de animais das fases aguda e crônica (Tabela 4 e Figura 1).

TABELA 1 – PARASITEMIA REALIZADA EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM MACERADO DE FRAGMENTOS DE TECIDOS DE SUÍNOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE, VIA ENDOVENOSA, COM $2,0 \times 10^7$ TAQUIZOITOS DE *Toxoplasma gondii*

SUÍNOS	DIAS APÓS A INOCULAÇÃO												TOTAL
	1º	4º	7º	11º	20º	28º	33º	48º	55º	66º	67º	77º	
1	-	Pe	Ps	Ps*	-	-	-	-	-	-	-	-	3
2	-	Pe	-	Ps*a	-	-	-	-	-	-	-	-	2
3	-	Pe	-	Ps*b	-	-	-	-	-	-	-	-	2
4	-	Pe	Ps	-	Ps	Ps	Ps	-	-	NR*	-	-	5
5	-	Pe	-	-	Ps	Ps	-	-	-	-	NR*	-	3
6	-	Pe	Ps	-	-	Ps	Ps	-	-	-	-	NR*	4
TOTAL	-	6	3	3	2	3	2	-	-	-	-	-	19

Convenções:

* = dia da necrópsia - = negativo NR = Não realizado

a = necropsiado no 12º dia b = necropsiado no 13º dia

Ps = RIFI para Toxoplasmose positiva ($\geq 1:64$) em camundongos inoculados

Pe = Presença de taquizoitos de *T. gondii* no exsudato peritoneal de camundongos inoculados

TABELA 2 – RECÍPROCAS DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS, OBTIDOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) EM SOROS DE SUÍNOS INOCULADOS, VIA ENDOVENOSA, COM $2,0 \times 10^7$ TAQUIZOITOS DE *Toxoplasma gondii*

Dias após Inoculação	Títulos finais de anticorpos					
	Suíno 1	Suíno 2	Suíno 3	Suíno 4	Suíno 5	Suíno 6
1º	0	0	0	0	0	0
4º	1024	1024	1024	1024	1024	1024
7º	16384	16384	1024	16384	4096	16384
11º	16384*	16384	16384	16384	16384	16384
12º		65536*	65536	NR	NR	NR
13º			65536*	4096	16384	4096
20º				4096	16384	1024
28º				1024	4096	1024
33º				1024	1024	1024
48º				1024	1024	1024
55º				1024	1024	1024
62º				1024	1024	1024
66º				1024*	1024	1024
67º					1024*	1024
77º						1024*

Convenções:

* = Animal sacrificado e necropsiado

NR = não realizado

0 = negativo

TABELA 3 – REISOLAMENTO DE *Toxoplasma gondii*, DIRETA (EM EXSUDATO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS) OU INDIRETAMENTE (RIFI), A PARTIR DE ÓRGÃOS E TECIDOS DE SUÍNOS INOCULADOS, VIA ENDOVENOSA, COM 2,0 X 10⁷ TAQUIZOITOS

Material Inoculado	Suíno 1		Suíno 2		Suíno 3		Suíno 4		Suíno 5		Suíno 6		Total
	RIFI	Re	RIFI	Re	RIFI	Re	RIFI	Re	RIFI	Re	RIFI	Re	
Sangue	1:64	-	-	-	1:64	-	-	-	-	-	-	-	02
Cérebro	1:64	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	03
Fígado	-	-	1:16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
Retina	1:16	+	1:16	-	1:16	-	-	-	-	-	-	-	03
Pâncreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	00
Intestino	1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
Músculo	1:64	-	-	+	1:64	-	-	-	-	-	-	-	03
Língua	1:64	-	1:64	+	1:16	-	-	-	-	-	-	-	03
Pulmão	-	-	1:16	+	1:16	-	-	-	-	-	-	-	02

Convenções:

Re = reisolamento

RIFI = Reação de imunofluorescência indireta

+ = presença de taquizoitos

- = ausência de taquizoitos

TABELA 4. SÚMULA DOS RESULTADOS OBTIDOS PELAS TÉCNICAS DE HEMATOXILINA-EOSINA (HE), IMUNOFLUORESCÊNCIA (RIFI) E PEROXIDASE ANTI-PEROXIDASE (PAP) EM TECIDOS DE SUÍNOS INOCULADOS, VIA ENDOVENOSA, COM 2,0 X 10⁷ TAQUIZOITOS DE *Toxoplasma gondii*

Órgãos	Lesões	Suíno 1			Suíno 2			Suíno 3			Suíno 4			Suíno 5			Suíno 6		
		HE	PAP	IF	HE	PAP	IF	HE	PAP	IF	HE	PAP	IF	HE	PAP	IF	HE	PAP	IF
Cérebro	Infil. perivasculares	+	+		+	+		+			-			+					+
	Infil. difusos	-	+	+	-		+	+	+		-			+					-
	Desmielinização	+			-	+		-			+			-					+
	Aumento céls. glia	-	+		+			-	+	+	+			-					+
	Hiperemia	-			+			+			+			-					-
	Edema	+			+			+			-			+					+
	Meningoencefalite	-			+	+		+	+		-			-					+
Fígado	Cromólise	-			-			-			+			+					+
	Hiperplasia/edema	-			+			+			+			+					+
	Degen. hidrópica	-			+			+		+				+					+
	Necrose	+			-		+				+			-					-
	Infiltrações focais	+			+	+		+	+		+			-					-
Coração	Miosite focal	+	+		+	+		+	+		-			-					-
	Miosite difusa	+		+	+	+		-	+	+	+			-					-
	Hiperemia	+			+			-			-			-					+
Retina	Hiperemia/edema	+			-	-		-	-		-			-					-
	Inflamação focal	-		+	-	-		-	-		-			-					-
Pulmão	Edema	-			+			-	-		+			+					+
	Infil. alvéolos	+			+		+	-	-		+			+					-
	infil. brônquios	+			+	+		-	-		+			-					+
	Hiperemia	-			-			-	-		+			-					+
Intestino	Eosinofilia	+	+		+			+			+			+					-
	Desc. mucosa	-		+	+			-	+		+			+					+
	Hiper./edema	+			+			-			-			+					+
Pâncreas	Hiperemia	+			+	+		-	+	+	-			-					+
	Edema	+			-			-			-			-					-
Músculo esquel.	Inflamação	-		+	-	+	+	-	+		+			-					-
	Hiperemia	-		+	+			-			-			-					-

Convenções:

+ (HE) = visualização apenas de lesões teciduais.

+ (PAP) = visualização de lesões e do parasito

+ (IF) = visualização apenas do parasito fluorescente.

- = ausência de lesões (HE) ou de reação (PAP e IF)

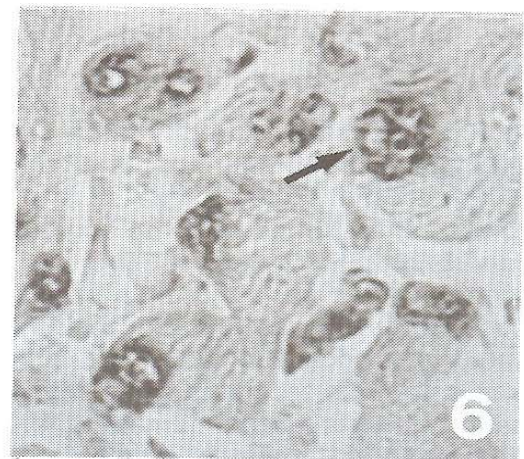
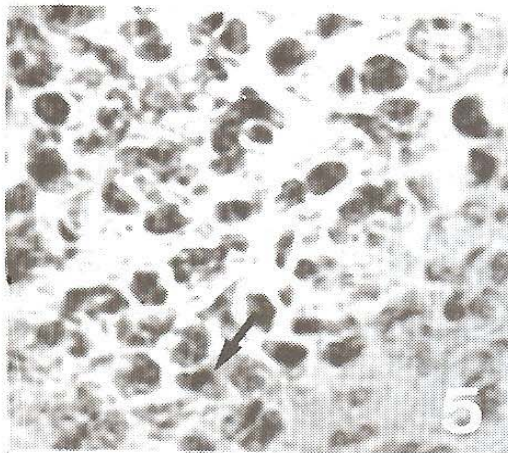
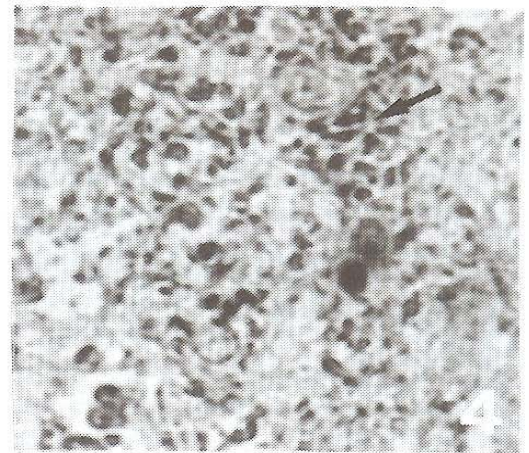
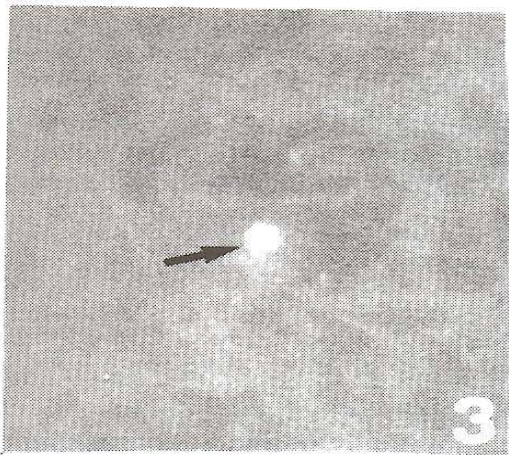
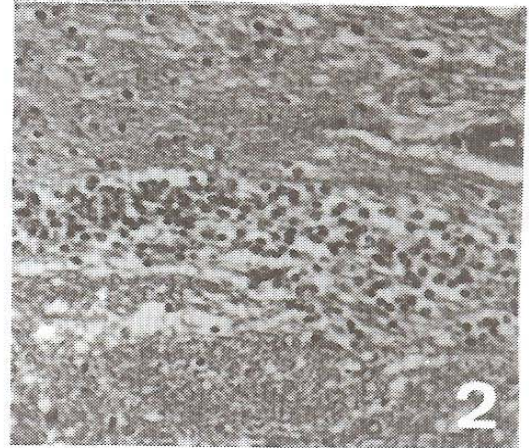
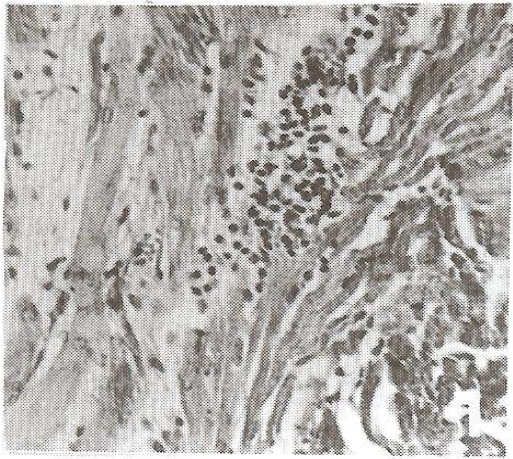


FIGURA 1. FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES DE TECIDOS SUBMETIDOS ÀS TÉCNICAS DE H.E., RIFI E PAP NA TOXOPLASMOSE SUÍNA. 1) MIOCARDITE FOCAL COM INFILTRADO DE CÉLULAS MONONUCLEARES NO SUÍNO 2. (SETA). (H.E. 400X); 2) INFILTRADO LINFOCITÁRIO FOCAL CEREBRAL NO SUÍNO 3. (SETA). (H.E. 400X); 3) MÚSCULO CARDÍACO DO SUÍNO Nº 1 COM TAQUIZOITOS AGRUPADOS. (SETA). (RIFI 800X); 4) CÉREBRO DO SUÍNO Nº 2 COM GRANDE POSITIVIDADE COMO “MANCHA DE TAQUIZOITOS E SEUS ANTÍGENOS”, MARGEADA POR CÉLULAS DA GLIA. (SETA). (PAP 800X); 5) FÍGADO DO SUÍNO Nº 2 COM TAQUIZOITOS NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO FOCAL. (SETA). (PAP 800X); 6) CORAÇÃO DO SUÍNO Nº 3 COM REAÇÃO POSITIVA EM FIBRAS MUSCULARES. (SETA). (PAP 800X)

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora os achados histopatológicos deste trabalho estejam de acordo com a maioria dos autores consultados, no que diz respeito à visualização do parasito, eles são discordantes, sobretudo com os resultados de VERMA & BOWLES (1967), MOLLER et al. (1970), MORIWAKI et al. (1976), BEVERLEY et al. (1978), HUNTER (1979), MARBELLA (1983) e DUBEY et al. (1986) que afirmam terem visualizado, pela técnica de H.E., tanto taquizoitos como cistos teciduais, o que não foi possível neste trabalho, apesar de terem sido examinadas seis lâminas por órgão de cada animal. Aliás, TSUNEMATSU et al. (1964), KATSUBE et al. (1975), KIKUCHI et al. (1977), YERMAKOV et al. (1982), BUERGELT (1983), BJERKAS & LANDSVERK (1986), VIDOTTO et al. (1987) e BARBOSA (1988), já haviam feito referências quanto à técnica de H. E., sugerindo que tal método não seria adequado para a pesquisa do *T. gondii* em tecidos. Pelos resultados da RIFI, constatou-se neste experimento que, nos suínos de números 1, 2 e 3, sacrificados quando apresentavam títulos altos de anticorpos anti-*T. gondii* (1:65536), era possível visualizar estruturas fluorescentes agrupadas e isoladas, assemelhando-se a taquizoitos em cérebro, músculos, fígado, pulmão e pâncreas (Figura 1). Estes resultados estão de acordo com os achados de TSUNEMATSU et al. (1964), KATSUBE et al. (1975), KIKUCHI et al. (1977), YERMAKOV et al. (1982), KHAVKIN (1981) que, utilizando as técnicas da H. E. e a RIFI, visualizaram através da primeira apenas as lesões microscópicas básicas (proliferação de macrófagos, hiperplasia linfóide, necrose e hemorragias) ao passo que a segunda confirmou o diagnóstico parasitológico.

Os resultados da técnica da PAP revelaram reação positiva em todos os órgãos examinados dos suínos sacrificados na fase aguda da doença, evidenciando, através da coloração castanho tijolo, a morfologia do parasita sob a forma de taquizoitos livres e no interior de células, bem como seus antígenos (Figura 1). Estes resultados estão de acordo com os achados de BUERGELT (1983) e KITTAS et al. (1984), que só puderam confirmar a presença do parasito na fase precoce da doença, com a utilização da PAP, uma vez que taquizoitos podem ser facilmente confundidos com outras estruturas teciduais e até mesmo com detritos celulares. Mais recentemente, TUDURY et al. (1991) utilizando a PAP, diagnosticaram com nitidez a presença de *T. gondii* em casos de encefalites graves em cães e gatos. DUBEY & LIN (1994), utilizando a técnica imunoenzimática da Avidina-Biotina, detectou a presença de cistos do parasito no cérebro de uma

raposa encontrada moribunda, que no exame post mortem, apresentou lesões de necrose e hemorragia focal de linfonodos mesentéricos e cérebro.

Segundo BJERKAS & LANDSVERK (1986), em estudo retrospectivo de casos de rotina de material embocado até 18 anos antes, concluíram que a técnica PAP apresentou-se particularmente útil para demonstrar o parasito em tecidos autolizados, no interior de fagócitos parcialmente digeridos, mostrando que a antigenicidade do protozoário pode ser confirmada pela especificidade da técnica, aumentando as possibilidades de estabelecer o diagnóstico etiológico, quando só tecidos formolizados estão disponíveis. Tais afirmações coadunam-se com TAYLOR (1978) e BARBOSA (1988), que afirmam que a técnica da PAP é superior às técnicas rotineiras de coloração para estudos do parasitismo tecidual e até mesmo superior à RIFI, que não permite a visualização da morfologia dos tecidos e suas lesões, além de não permitir a estocagem das lâminas por períodos prolongados, uma vez que há perda de fluorescência nos preparados.

Observando a Tabela 4, verifica-se que nos animais sacrificados mais tardiamente (fase crônica), apesar de apresentarem à H.E. lesões degenerativas inflamatórias e, até mesmo, necrose de neurônios (cromólise), não foi possível verificar reações positivas tanto na RIFI quanto na PAP. Este fato poderia ser explicado pela natureza das cepas utilizadas, de alta virulência mas não cistogênicas. Aliás, MITSUKA et al. (1993) que estudaram a virulência de nove cepas de *T. gondii* em camundongos, inclusive as utilizadas neste experimento, também não conseguiram reisolar o parasita de animais que sobreviveram à infecção. A Tabela 3 (reinoculação em camundongos de suspensão de órgãos dos suínos infectados) mostra resultados que confirmam a ausência do *T. gondii* nos animais sacrificados mais tardiamente.

Nas condições que foram realizados os experimentos e com base nos resultados obtidos conclui-se que: 1º) a técnica de H.E. não se mostrou eficiente na revelação de *T. gondii* em tecidos, na fase aguda da doença, embora seja válida para evidenciar as alterações teciduais; 2º) as técnicas de imunohistoquímica (PAP) e de imunofluorescência revelaram-se eficazes na detecção do parasito e/ou de seus antígenos, na fase aguda da doença e 3º) a técnica da PAP mostrou-se mais eficiente em relação à H.E. e à imunofluorescência, na medida em que identificou com precisão e nitidez o parasito ou seus antígenos, permitiu a visualização da reação tecidual, além de possibilitar a obtenção de preparações, se não permanentes, mas por longa duração, importante sob vários aspectos, inclusive o didático.

VIOTTI, Neusa Maria Alves; FREIRE, Roberta Lemos; NAVARRO, Itamar Teodorico; VIDOTTO, Odilon. Evaluation histological, immunofluorescence and immunohistochemistry techniques for the postmortem diagnostic of the swine toxoplasmosis. *Semina: Ci.Agr.*, Londrina, v.16, n.1, p. 107-114, Mar. 1995.

ABSTRACT: Six 120 days old Landrace/Large-white swines with were inoculated with tachyzoites of the AS 28, LIV-IV and N *Toxoplasma gondii* strains and analysed under clinical, sorological, parasitological and histopathological aspects. In order to evaluate some postmortem diagnostic techniques, three swines were sacrificed in the acute phase and three swines in the chronic phase of the infection. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were submitted to Eosin-Hematoxilin, Indirect Immunofluorescence (IFA) and Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP) techniques. The Eosin-Hematoxilin showed to be efficient in the analysis of the morphological alterations in the tissues, but did not detect any form of the parasite. Both, IFA and PAP revealed tachyzoites of *T. gondii*, although the last one showed to be more effective because it also allowed an analysis of the morphological tissue alterations.

KEY WORDS: Toxoplasmosis, histopatology, immunohistochemistry, immunofluorescence, swine

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, W.; KALDEN, J.R.; MAYERSBACK, H. Influence of different histologic preparation methods on preservation of tissue antigens in immunofluorescent antibody technique. *Annals N. York Acad. Sci.*, v. 254, p. 27-34, 1975.
- BARBOSA, A.J.A. As técnicas de imunoperoxidase no estudo da etiologia das doenças infectuosas e parasitárias. *Rev. da Soc. Brasil de Medicina Tropical*, v. 21 n. 1, p. 1-6, 1988.
- BEVERLEY, J.K.A.; NENRY, L.; HUNTER, O. Experimental toxoplasmosis in young piglets. *Res. Vet. Sci.*, v. 24, p. 139-146, 1978.
- BJERKAS, I.; LANDSVERK, T. Identification of *Toxoplasma gondii* and Encephalitozoon cuniculi by immunoperoxidase techniques and electron microscopy in stored formalin fixed, paraffin-embedded tissue. *Acta. Vet. Scand.* v. 27, p. 11-22, 1986.
- BREZIN, A. P.; KASNER, L.; THULLIEZ, P.; LI, Q.; DAFFOS, F.; NUSSENBLATT, R. B.; CHAN, C. C. Ocular toxoplasmosis in fetus: Immunohistochemistry analysis and DNA amplification. *Retina*, v. 14, n. 1, p. 19-26, 1994.
- BROZMAN, M. Immunohistochemical analysis of formaldehyde and trypsin or pepsin-treated material. *Acta histochem Bd.*, v. 63, p. 251-260, 1978.
- BUERGELT, C.D. Toxoplasmic meningoencephalitis in a west Indian manatee. *JAVMA*, v 183, n11, 1983.
- CAMARGO, M.E. *Introdução às técnicas de imunofluorescência.* São Paulo: Inst. Med. Tropical, 1973.
- COSTA, A.J. *Toxoplasmose congênita natural em bovinos e infecção experimental de vacas gestantes com oocistos de Toxoplasma gondii, Nicolle e Monceaux, 1909.* S.Paulo, 1979. 88p. Tese (Doutorado) Universidade São Paulo, 1979.
- CULLING, C.F.A.; REID, P.E. & SINNOTT, N.M. The effect of various fixatives and trypsin digestion upon the staining of routine paraffin-embeddd sections by the peroxidase anti-peroxidase and immunofluorescent technique. *Journal of Histotechnology*, v. 3 n. 1, p. 12-16, 1980.
- DAVIDSON, M. G.; LAPIN, M. R.; ENGLISH, R. V.; TOMPKINS, M. B. A feline model of ocular toxoplasmosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 34, n. 12, p. 3653-3660, 1993.
- DORSETT, B.H.; IOACHIM, H.L. A method for the use of immunofluorescence on paraffin-embedded tissues. *Am. J. Clin. Pathology*, v. 69, p. 66-72, 1978.
- DUBEY, J.P. Long term persistence of *Toxoplasma gondii*, in tissues of pigs inoculated with *T.gondii* oocysts and effects of freezing on viability of tissues cysts in pork. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, n. 6, p. 910-913, 1988
- DUBEY, J.P.; LIN, T. L. Acute toxoplasmosis in a gray fox (*Urocyon cenereoargenteus*). *Veterinary Parasitology*, v. 51, n. (3/4), p. 321-325, 1994.
- DUBEY, J.P.; MUERREL, K.D.; FAYER, R.; SCHAD, G.A. Distribution of *Toxoplasma gondii* Tissue cysts in commercial cuts of pork. *JAVMA*, v. 188, n. 9, 1986.
- FALANGOLA, M. F.; PETITO, C. K. Choroid plexus infection in cerebral toxoplasmosis in AIDS patients. *Neurology*, v. 43, n. 10, p. 2035-2040, 1993.
- FARRELL, R.L.; DOCTON, F.L.; CHAMBERLAIN, D.M.; COLE, C.R. Toxoplasmosis. I. *Toxoplasma* isolated from swine. *Am. J. Vet. Res.*, April, p. 181-185, 1952.
- FELTKAMP-VROOM, T.M. Preparation of tissues and cells for immunohistochemical processing. *Annals N. York Acad. Sciences*, v. 254, p. 21-26, 1975.
- HUNTER, B. Isolated, spontaneous *Toxoplasma* abortion in a young sow. *Can. Vet. J.*, v. 20, p. 116, 1979.
- KATSUBE, Y; HAGIWARA, T.; IMAIZUMI, K. Latent infection of *Toxoplasma* in swine. *Jap. J. Vet. Sci.*, v. 37, p. 245-252, 1975.
- KHAVKIN, T. Histological and ultrastructural studies of the interaction of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with mouse omentum in experimental infection. *J. Protozool*, v. 28, n. 3, p. 317-325, 1981.
- KIKUCHI, M; YOSHIZUMI, T.; NAKAMURA, H. Necrotizing lymphadenitis: Possible acute *Toxoplasma* infection. *Virchows Arch. A. Path. Anat. and Histol.*, v. 376, p. 247-253, 1977.

- KITTAS, S.; KITTAS, C.; PAIZIBIZA, P.; HENRY, L. A histological and immunohistochemical study of the changes induced in the brains of white mice by infection with *Toxoplasma gondii*. *British Journal of Exp. Pathology*, v. 65, n. 1, p. 67-74, 1984.
- LEE, S.Y.; CHEN, S.N.; SUZUKI, T.; LIU, K.H.; LIN, S.Y.; TSENG, P. T. Toxoplasmosis in Taiwan: III Evolution of a modified technique for detection of cysts of *Toxoplasma gondii* in swine brains. *J. Formosan Med. Assoc.*, v. 72, p. 91-95, 1973.
- MARBELLA, C.O. *Toxoplasma gondii* in swine: serologic, histopathologic and isolation studies. *Philippine Journal of Vet. Medicine*, v. 22, p. 75-86, 1983.
- MILLER, H.R.P. Fixation and tissue preservation of antibody studies. *Histochemical Journal*, v. 4, p. 305-320, 1972.
- MITSUKA, R.; NAVARRO, I. T. e VIDOTTO, O. Avaliação da virulência de nove amostras de *Toxoplasma gondii*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 8., 1993, Londrina. *Anais...* Londrina, 1993. p.17-18.
- MOLLER, T.; FENNESTAD, K.L.; ERIKSEN, W.K.; SIIM, J.C. Experimental toxoplasmosis in pregnant sows. II Pathological findings. *Acta. Path. Microbiol. Scand. A.*, v. 78, p. 241-255, 1970.
- MORIWAKI, M.; HAYASHI, S.; MINAMI, T.; ISHITANI, R. Detection of congenital toxoplasmosis in piglet. *Jap. J. Vet. Sci.*, v. 38, p. 377-381, 1976.
- NAVARRO, I. T. *Estudo de resistência do Toxoplasma gondii ao efeito do cloreto de sódio e condimentos em linguça frescal de suíno*. Londrina, 1987. 61p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, 1987.
- SAINTE-MARIE, G. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem Cytochem*, v.10, p.250-256, 1962.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, R.H.; CUCULIS, J.J.; MEYER, H.G. The unlabelled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase anti-horseradish peroxidase), and its use in identification of spirochetes. *Journal Histochem. Cytochem.*, v. 18, p. 315-333, 1970.
- TAYLOR, C.R. Immunoperoxidase techniques. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 102, p. 113-121, 1978.
- TSUNEMATSU, Y; SHIOIRI, K.; KUSANO, N. Three cases of lymphadenopathy toxoplasmic with special reference to the application of fluorescent antibody technique for detection of *Toxoplasma* in tissue. *Japan J. Exp. Med.*, v. 34, n. 4, p. 217-230, 1964.
- TUDURY, E. A.; VIOTTI, N. M. A.; LOUREIRO BRACARENSE, A. P. F. R.; FARIA DOS REIS, A.C.; NAVARRO, I. T.; BIAZZONO, L. e BARROS, C. Diferentes quadros neurológicos provocados pelo *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEOUX, 1909) em 5 cães e 1 gato. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 46., São Paulo, 1991. *Anais...* São Paulo, 1991. p. 31.
- VERMA, M.P.; BOWLES, L. Concentration of *Toxoplasma gondii* in the brain tissue of animals: a histological study confirmed by biological isolation. *Journal of Parasitology*. v. 53, n. 2, p. 254 -257, 1967.
- VIDOTTO, O.; COSTA, A. J. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. II. Parasitemia e resposta imunitária humoral. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 39, n. 5, p. 783-794, 1987.
- VIDOTTO, O.; COSTA, A. J.; REIS, A.C.F.; VIOTTI, N.M.A. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. III. Alterações patológicas e reisolamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 39, n. 5, p. 795-814, 1987.
- WORK, K.; ERIKSEN, L.; FENNESTAD, L.L.; MOLLER, T.; SIIM, J.C. Experimental toxoplasmosis in pregnant sows. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, v. 78, p.129-139, 1970.
- YERMAKOV, V.; RASHID, R.K.; VULETIN, J.G.; PERTSCHUK, L.P.; ISAKSSON, H. Disseminated toxoplasmosis *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 106, p. 524-528, 1982.

Recebido para publicação em 05/08/94

AGRADECIMENTOS

À técnica de Laboratório Maria Jôse C. Neves pelo auxílio durante às necrópsias e processamento de técnicas histológicas.