

DETECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAX, 1909) NO SÊMEN DE OVINOS REPRODUTORES (*Ovis aries*)

EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS. Joana D’Arc de Faria Rodrigues, Alvimar José da Costa, Fernando Augusto de Souza, Ricardo dos Santos Silva, Walter Matheus Rossanese, Welber Daniel Zanetti Lopes. – Parasitologia – Medicina Veterinária – Departamento de Patologia Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

A toxoplasmose animal é uma doença parasitária de elevada importância veterinária, zootécnica e de saúde pública, uma vez que acarreta prejuízos aos animais de produção e/ou de estimação, além de servirem de fonte direta ou indireta de infecção para o ser humano (GARCIA et al., 1999). Na Europa, mais de 50% da carne de ovinos e suínos (ACHA & SZYFRES, 1986) apresentaram-se parasitadas pelo *T. gondii*.

Desordens reprodutivas, como abortos e neonatos mortos ou fracos, que evoluem para óbito, geram perdas econômicas consideráveis em rebanhos. Estudos conduzidos no Uruguai apontaram a toxoplasmose como um problema importante nos rebanhos ovinos, promovendo prejuízos anuais de US\$ 1,4 a 4,7 milhões (FREYRE et al., 1999).

Os suínos, ovinos, caprinos e coelhos são mais comumente infectados com *T. gondii*, quando comparados a bovinos e eqüinos. A carne suína é considerada a principal em transmissão para humanos nos Estados Unidos e, provavelmente, em vários outros países (GAMBLE, 1997). As taxas de infecção apontadas para rebanhos ovinos no Brasil são variáveis (Tabela 1). Esta flutuação deve-se principalmente ao tipo de teste sorológico utilizado, à região e a idade dos animais estudados (DUBEY, 1990).

Tabela 1: Ocorrência da infecção toxoplásmica em ovinos pertencentes a diversas regiões do Brasil.

Autores	Ano	Cidade/Estado	Reação Sorológica	Nº de ovinos	% de positivos
Amaral <i>et al.</i> ,	1978	Bahia/RS	HAI	100	23
Larsson <i>et al.</i> ,	1980	Uruguaiana/RS	SF	100	39
Silva & Costa	1981	Guaíba/RS	RIFI	310	12
Nishikawa <i>et al.</i> ,	1984	Rio Grande do Sul	AL	655	8
Langoni <i>et al.</i> ,	1999	Estado de São Paulo	RIFI	352	55
Meireles	2003	São Manuel/SP	ELISA	200	31
Silva <i>et al.</i>	2003	Estado do Pernambuco	RIFI	173	35
Figliuolo <i>et al.</i> ,	2004	Estado de São Paulo	RIFI	597	34
Lopes <i>et al.</i> ,	2006a	Jaboticabal/SP	RIFI	134	56

Convenções: SF: Reação de Sabin & Feldman; HAI: Reação de Hemoaglutinação Indireta; AL: Aglutinação em Látex; RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA: Ensaio Imunoenzimático.

Embora em ovinos (SPENCE et al., 1978; TEALE et al., 1982; AGANDA et al., 1988), caprinos (DUBEY e SHARMA, 1980), bovinos (SCARPELLI, 2001), suínos (MOURA, 2004) e cães (ARANTES, 2005), o isolamento do *T. gondii* no sêmen destes animais tenha sido realizado com sucesso, inexistente na literatura consultada, trabalhos que comprovam a viabilidade da transmissão sexual deste coccídeo na espécie ovina, com machos portadores de toxoplasmose experimental.

A presente pesquisa tem como propósito maior, determinar a presença de *T. gondii* em amostras semianuais colhidas de ovinos experimentalmente infectados, fato inédito na literatura compulsada.

Foram utilizados os isolados “P” e “RH” de *T. gondii*, (mantidas junto ao CPPAR “Centro de Pesquisas em Sanidade Animal” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal-UNESP), por meio de inoculações periódicas de cistos cerebrais (isolado “P”) e/ou taquizoítos (isolado “RH”) em camundongos albinos. Os oocistos de *T. gondii* foram obtidos de forma semelhante à técnica descrita por Dubey et al. (1972).

Oito ovinos machos (*Ovis aries*) entre 1 e 4 anos, sorologicamente negativos para *T. gondii* (por meio da técnica de imunofluorescência indireta IFI – Camargo, 1964), foram selecionados para o presente trabalho. Estes animais foram identificados, randomizados e inoculados, conforme o delineamento experimental descrito na Tabela 2.

Todos animais foram mantidos em baias individuais, pertencentes ao CPPAR. Água e alimentos (volumoso e concentrado) foram fornecidos “*ad libitum*”.

Parasitemia foi determinada por meio da inoculação da camada leucocitária em camundongos, segundo a técnica descrita por Oliveira (1997).

Nos soros de todos os ovinos, obtidos dois dias anteriores a inoculação e no 1º, 3º, 5º, 7º, 11º, 14º dia pós-inoculação (DPI) e, semanalmente, até o 70º DPI, foi pesquisada a presença de anticorpos contra *T. gondii* pela IFI (Camargo, 1964).

Amostras seminais dos oito ovinos foram obtidas por meio do uso de um eletro ejaculador, dois dias antes da inoculação, e no 1, 3, 5, 7, 11, 14 DPI e, semanalmente, até o 70º DPI. A detecção de *T. gondii* no sêmen dos ovinos foi realizada por meio do bioensaio, conforme a metodologia proposta por Teale et al. (1982) modificada e pela Reação de Polimerização em Cadeia (PCR). Uma alíquota de 0,8 mL (da suspensão espermática diluída) de cada amostra de sêmen foi inoculada em cinco camundongos. Estes foram observados e examinados conforme a metodologia adotada por Oliveira (1997).

O DNA das amostras de sêmen, tecidos e do controle positivo, foi extraído segundo a metodologia descrita por Sambrook & Russell (2001). Para detecção de *T. gondii* nas amostras de sêmen e tecidos analisadas, foi amplificado um fragmento do gene B₁ de *T. gondii* de 194 pares de base (bp) utilizando-se os “primers” 5’-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3’ (B₁) e 5’TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3’ (B₂), descritos por Fuentes et al. (1996). A PCR foi feita pela adição de 500ng de DNA molde em um meio de reação contendo MgCl₂ 2mM, KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH 9, Triton X-100 0,01%, dNTPs 0,2mM, 10pmoles de iniciador e 5,0 unidades de *Taq*DNA polimerase.

A análise dos produtos amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose 2%, contendo fragmentos de restrição separados por eletroforese, corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL em água por 20 minutos e observados em trans-iluminador UV.

Parasitismo tissular por *T. gondii* também foi pesquisado por meio do bioensaio (Dubey 1998), pela PCR e imunohistoquímica, em fragmentos de testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata.

Tabela 2. Delineamento experimental dos oito ovinos reprodutores submetidos à infecção experimental por *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Nº de ovinos	Oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	Via de inoculação
I	3	2x 10 ⁵	-	Oral
II	3	-	1 x 10 ⁶	Subcutânea
III	2		Placebo	Oral

A infecção toxoplásmica dos ovinos reprodutores utilizados nesta pesquisa, após a inoculação de taquizoítos ou oocistos de *T. gondii*, confirmou-se pela parasitemia e também pela soroconversão de todos animais inoculados. Sinais clínicos como hipertermia, apatia, anorexia e fezes amolecidas, pôde-se observar nos animais que receberam oocistos, entre o 5º e 7º DPI. Já animais inoculados com taquizoítos, apresentaram, de modo geral, um quadro assintomático de toxoplasmose.

A curva de IgG observada neste trabalho teve seu início a partir do 5º DPI (ovinos 02 e 16 inoculados com oocistos e o reprodutor 52 inoculado com taquizoítos) apresentando todos títulos de 1:16. Picos de 1:4096 foi atingido pelos seis animais inoculados no 28º DPI, o ovino 52, infectado com taquizoítos, atingiu título de 1:8192 nesta mesma data pós-inoculação. Convém salientar que a resposta imune humoral (para os seis animais inoculados) permaneceu em patamares altos do 21º ao 56º DPI, a partir de quando então se iniciou uma diminuição da resposta imune humoral dos ovinos.

A detecção do *T. gondii* na corrente sanguínea (parasitemia) dos ovinos experimentais foi verificada de forma indireta, por meio de soroconversão dos camundongos inoculados com camadas leucocitárias. Os surtos parasitêmicos ocorreram em cinco dos seis ovinos inoculados. Dos dez picos de parasitemia detectados, três foram entre o 7º e 11º DPI, outros três no 35º DPI e mais três entre o 56º e 63º DPI.

Pela bioprova isolou-se *T. gondii* em ejaculados dos três ovinos inoculados com taquizoítos (no quinto e 70º DPI nas amostras do ovino 07, no 14º DPI do reprodutor 48 e no 11º, 21º, 49º e 56º DPI do ovino 52). Nos ovinos que receberam oocistos, a presença do parasito também foi detectada em amostras seminais dos três ovinos inoculados (no 14º, 42º e 63º DPI do ovino 02, 35º, 56º e 63º DPI do número 09 e no 49º DPI do ovino 16). Utilizando a técnica da PCR, para amostras seminais positivas na bioprova, detectou-se o DNA de *T. gondii* no sêmen dos ovinos inoculados com taquizoítos no 70º DPI (ovino 07), no 14º (48) e no 11º, 21º e 56º DPI (52). Nas amostras seminais dos reprodutores inoculados com oocistos, o DNA do parasito pôde ser detectado no ovino 02 (14º, 42º e 63º DPI) e no macho 09 (35º e 56º DPI). Amostras seminais (positivas na bioprova) dos ovinos 07 (5º DPI), 52 (49º DPI), 09 (63º DPI) e 16 (49º DPI) não se mostraram positivas para *T. gondii* por meio da PCR.

Foi possível ainda, isolar este coccídeo por meio da bioprova e da técnica de PCR, no “pool” de tecidos (testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata) de dois ovinos infectados experimentalmente com oocistos (ovino 02 e 16) e um inoculado com taquizoítos (07).

Comprovou-se, portanto, o isolamento de *T. gondii* (bioporva, PCR e imunohistoquímica) no sistema reprodutor de ovinos, sobretudo em amostras seminais (bioprova e PCR), o que certamente poderá viabilizar a transmissão sexual deste protozoário, nesta espécie animal.

Referências bibliográficas

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Washington D.C.: Organizacion Panamericana De La Salude, 1986. Publicación Científica nº 503.
- AGANGA, A.O.; UMOH, J.U.; KYEWALABYE, E.K.; EKWEMPU, C.C. Comparative experimental transmission studies with Nigerian isolates and TS-I strain of *Toxoplasma gondii* in sheep. *J. An. Prod. Res.*, v.08, n. 02, p. 104-120, 1988.
- AMARAL, V.; SANTOS, S.M.; REBOUÇAS, M.M. Sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de caprinos e ovinos procedentes, respectivamente, dos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul, Brasil. *O biológico*. 12, 331-40, 1978.
- ARANTES, T.P. Transmissão sexual do *Toxoplasma gondii* em cães (*Canis familiares*). Jaboticabal, FCAVJ – Universidade Estadual Paulista, 2005. 83p. (Dissertação de Mestrado).
- CAMARGO, M. E. Improvised technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v. 06, n. 03, p.117-118, 1964.
- DUBEY, J. P.; SWAN, G. V.; FRENKEL, J. K. A. Simplified method for isolation of *T.gondii* from the feces of cats. *J.Parasitol.*, v. 58, n. 05, p. 1055-1056, 1972.
- DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 41, n. 05, p. 794-795, 1980.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. *Journal Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1990.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 11, p.267-99, 1998.
- FIGLIUOLO, L. P. C., KASAI N., RAGOZO A. M. A., PAULA V.S.O., DIAS R.A., SOUZA S.L.P., GENNARI S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 123, p161-166 (2004)
- FREYRE, A. et al. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, n.1, v.81, p.8588, 1999.
- FUENTS, S.I.; RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, C.J.; FERNANDO, C.C.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *Journal Clin. Microbiology*, v. 3, n. 10, p. 2368-2372, 1996
- GAMBLE, H.R. Parasites associated with pork and pork products. *Revue Scientifique et Technique*, v. 16, n. 02, p. 496-506, 1997.
- GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, v. 29, n. 01, p. 91-97, 1999.

- LANGONI, H. et al. Inquérito soroepidemiológico para a toxoplasmose em ovinos no Estado de São Paulo, Brasil. *O Biológico*, São Paulo, v.61, n.1, p.35-39, 1999.
- LARSSON, C.E.; JAMRA, L.M.F.; GUIMARÃES, E.C. Prevalência da toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, n.4, v.14, p.582-588, 1980
- LOPES, W.D.Z.; SANTOS, R.S.; ROSSANESE, W.M.; SANTANA, L.F.; SANTOS, T.R.; COSTA, A.J. Pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1909) em ovinos do município de Jaboticabal, SP. Anais. In. *14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & 2º Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses*. Ribeirão Preto. p. 357, 2006a.
- MEIRELES, L., GALISTEO JR. A. J., ANDRADE JR. H. F. Pesquisa sorológica de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de produção do Estado de São Paulo, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, vol.40, no.4, p.267-271, 2003.
- MOURA, A. B. *Toxoplasma gondii*: avaliação da infecção experimental em suínos (*Sus scrofa*) machos, com ênfase no sistema reprodutor. Jaboticabal, FCAVJ – Universidade Estadual Paulista, 2004. 104p. (Tese de Doutorado).
- NISHIKAWA, H.; ARNONI, J.V.; RASSIER, D.S.S.; SILVA, S.S. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic animals in Rio Grande do Sul State, Brazil. Resumos I Encontro de Pesquisas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 1984, 62p.
- OLIVEIRA, F. C. R. Infecção experimental de *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* com oocistos de *Toxoplasma gondii*. Estudo comparativo. Jaboticabal: Dissertação de Mestrado – FCAVJ - Universidade Estadual Paulista, 92 p., 1997.
- SAMBROOK, J. & Russell, D.W. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press. New York, Third edition. 2001.
- SCARPELLI, L.C. Viabilidade da transmissão venérea do *Toxoplasma gondii* em bovinos. Jaboticabal, Dissertação de Mestrado- FCAVJ - Universidade Estadual Paulista, 128 p., 2001.
- SILVA, N.R.S. & COSTA, A.J. Frequência da toxoplasmose em ovinos dos municípios de Guaíba e São Lourenço do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Esc. Vet.* 3, 56-9, 1981.
- SILVA, L. A., CUNHA, E. L. P., MEIRELES, L. R., GOTTSCHALK, ., MOTA, R. A., LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciencia Rural*. v.33, n.1, p. 115-119, 2003.
- SPENCE, J.B.; BEATTIE, J.; FAULKNER, L.; WATSON, W.A. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. *Veterinary Record*, v. 102, n. 02, p. 38-39, 1978.
- TEALE, A.J.; BLEWETT, D.A.; MILLER, J.K.; BUXTON, D. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of *Toxoplasma*. *The Veterinary Record*, v. 111, p. 53-55, 1982.

Bolsa: CNPq/PIBIC.