

ABORTO EM OVINOS ASSOCIADO À TOXOPLASMOSE: CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA, ANÁTOMO-PATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

ADRIANA C. DA MOTTA¹; MARIA ISABEL B. VIEIRA¹; CARLOS BONDAN¹; MARIA ISABEL A. EDELWEISS²; MARLOS AUGUSTO DAMETTO³; ÂNGELA GOMES³

ABSTRACT:- MOTTA, A.C. DA; VIEIRA, M.I.B.; BONDAN, C.; EDELWEISS, M.I.A.; DAMETTO, M.A.; GOMES, A. [Ovine abortion associated with toxoplasmosis: serological, anatomo-pathological and immunohistochemistry characterization]. Aborto em ovinos associado à toxoplasmose: caracterização sorológica, anátomo-patológica e imunoistoquímica. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 204-208, 2008. Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, Campus I, Bairro São José, BR 285, km 171, Passo Fundo, RS RS 99052-900, Brasil. E-mail: marisabel@upf.br

Ovine toxoplasmosis is a major cause of abortion and placentitis. Lambs with congenital infection are born with encephalitis. Abortions occurred between May and August 2006 in an estate in Três Palmeiras, southern Brazil. This study aimed to assess the frequency of abortion associated with toxoplasmosis among ewes in southern Brazil using indirect hemagglutination and pathoanatomical and immunohistochemical analyses. Blood samples were collected from nine animals for indirect hemagglutination. One fetus underwent necropsy and histopathological and immunohistochemical analyses. Three samples, one of which belonged to the necropsied animal's mother, were positive on the serological test. The necropsy revealed pale foci in the liver, lungs with a marbled appearance, heart with severe pallor and brain and cerebellar congestion. Fragments of all organs were collected, fixed in 10% buffered formalin, processed, and stained with hematoxylin-eosin. Microscopically, there were cysts and tachyzoites in the brain in areas of malacia with microgliosis and lymphoplasmacytic infiltration, suggesting toxoplasmic encephalitis. There was also interstitial pneumonia, centrilobular necrosis with structures compatible with tachyzoites, focal lymphocytic myocarditis and acute tubular nephrosis. The immunohistochemical test was positive for *Toxoplasma gondii*. The results allowed diagnosing the ovine toxoplasmosis.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*, abortion, sheep, immunohistochemistry.

RESUMO

A Toxoplasmose ovina é causa importante de aborto e placentite. Cordeiros com infecção congênita nascem com encefalite. Abortos ovinos ocorreram no período de maio a agosto de 2006 em uma propriedade do município de Três Palmeiras, RS. O presente trabalho tem como objetivo relatar a ocorrência de aborto em ovinos no RS associado à toxoplasmose utilizando hemaglutinação indireta, anátomo-patologia e imunoistoquímica. Amostras de sangue de nove animais foram coletadas para realização de hemaglutinação indireta. Um feto foi encaminhado

do para realização de necropsia, exame histopatológico e imunoistoquímico. Três amostras foram positivas na sorologia, sendo uma dessas da mãe do animal necropsiado. Na necropsia havia focos pálidos no fígado, pulmões com aspecto marmorizado, coração com severa palidez e cérebro e cerebelo congestos. Fragmentos de todos os órgãos foram coletados, fixados em formalina tamponada 10%, processados e corados com hematoxilina-eosina. Microscopicamente, no cérebro foram observados cistos e taquizoítos em áreas de malácia com microgliose e infiltração linfoplasmocitária, sugestivos de encefalite toxoplásmica. Havia, também, pneumonia intersticial, necrose hepática centrilobular onde havia estruturas compatíveis com taquizoítos; miocardite linfocitária focal e nefrose tubular aguda. A imunoistoquímica foi positiva para *Toxoplasma gondii*. Os resultados obtidos permitiram o diagnóstico de toxoplasmose ovina.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, ovino, aborto, imunoistoquímica.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Campus I, Bairro São José, BR 285, km 171, Passo Fundo, RS 99052-900, Brasil. E-mail: marisabel@upf.br

² Setor de Patologia, Curso de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-903, Brasil.

³ Curso de Medicina Veterinária, UPF, Passo Fundo, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório do Filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, descrito pela primeira vez em 1908 ocorrendo em animais domésticos e no homem (DUBEY; BEATTIE, 1988). Os felídeos, silvestres ou domésticos, são os hospedeiros definitivos e neles o parasita realiza a multiplicação enteroepitelial que culmina com a produção e eliminação de oocistos pelas fezes que contaminam o meio ambiente (DUBEY, 1977). As fezes de um gato doméstico podem conter em torno de 10 milhões de oocistos em pico de eliminação. No meio ambiente esses oocistos tornam-se infectantes após um período de um a cinco dias, dependendo das condições de umidade e temperatura (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Na espécie ovina, *T. gondii* foi descrito pela primeira vez em 1942 (NICOLLE; MANCEAUX 1969), e desde essa época muitos pesquisadores demonstraram a importância econômica da toxoplasmose nos ovinos como causa de abortos e natimortos (OKUDA et al., 2007). *Toxoplasma gondii* causa uma infecção que se traduz por severas perdas econômicas em ovinos, incluindo abortos, má formação fetal, natimortos e placentite (MALICK et al., 1990).

No Brasil, estudos têm demonstrado a presença e a importância do *T. gondii*, especialmente em pequenos ruminantes (AMARAL, et al., 1978; CHIARI et al., 1987; PESCADOR, et al., 2007). Os estudos de prevalência da infecção ainda são escassos em alguns Estados do Brasil (PITA GONDIM et al., 1999), no entanto, em outras regiões trabalhos indicam uma alta taxa de sororeagentes que variam de 17% a 50% (ROMMANELLI, 2002; FIGLIUOLO et al., 2004).

A infecção em ovinos ocorre, principalmente, através da ingestão de oocistos infectantes presentes nos alimentos e solo contaminado. Clinicamente a toxoplasmose ovina é assintomática, porém ovelhas não imunes que adquirem a infecção durante a gestação, podem desenvolver distúrbios reprodutivos causados por *T. gondii*, ocorrendo graves problemas econômicos. A forma cística que se desenvolve nos músculos, cérebro e outros órgãos ocorre depois da fase aguda da infecção (DUBEY; SHARMA, 1980). A infecção no homem ocorre através da ingestão de carne ou vísceras cruas ou mal cozidas com as formas císticas do parasita (VIDOTTO, et al., 1990; NAVARRO et al., 1992) incluindo carne ovina (DUBEY; KIRKBRIDE, 1989). Tendo em vista a importância de animais cronicamente infectados como fonte de infecção humana torna-se necessário investigar a prevalência do agente entre os animais domésticos (DIAS; FREIRE, 2005). Diferentes técnicas têm sido utilizadas para detectar a infecção em fetos abortados, como exames histológicos de cérebro fetal e de outros órgãos como placenta associada ou não com o exame imunoistoquímico de tecidos que apresentam lesões compatíveis (UGLA et al., 1987).

O diagnóstico de toxoplasmose é realizado através de testes sorológicos, necropsias de fetos abortados, exame histopatológico, imunoistoquímico e da reação em cadeia da polimerase (PCR) (PEREIRA-BUENO et al., 2004). O pre-

sente trabalho tem como objetivo relatar a ocorrência de um surto de aborto em ovinos por *T. gondii* no RS associando diferentes ferramentas diagnósticas caracterizando seus aspectos soro-epidemiológicos, anátomo-patológicos e imunoistoquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um inquérito epidemiológico em uma propriedade no município de Três Palmeiras, Rio Grande do Sul, que possuía 190 hectares, sendo 1,5 destinado à criação ovina, sendo desses 40 fêmeas. O restante da propriedade era destinado à lavoura de soja e trigo e engorda de gado de bovino nas restevas. O sistema reprodutivo era monta natural e havia 10 gatos na propriedade. Para determinar a causa do aborto, foram coletadas amostras de sangue de nove animais para realização de Hemaglutinação Indireta para *T. gondii*, bem como exame anátomo-patológico no Laboratório de Doenças Parasitárias e Laboratório de Patologia Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, respectivamente. A colheita de sangue foi realizada através da punção da veia jugular, de cada animal, procedeu-se à colheita de 10 ml de sangue, utilizando-se agulhas metálicas (20 x 100mm). Logo após a colheita o sangue era transferido para tubos de ensaio de vidro, devidamente identificados. Os soros foram obtidos por centrifugação (3000 rpm por 10 minutos) e armazenados à -18°C. Os soros foram submetidos ao teste de hemaglutinação indireta para anticorpos anti-*T. gondii* utilizando-se um kit comercial, Imuno-Hai do laboratório Wama Diagnóstica. Com o objetivo de avaliar qualitativamente os soros processados, foi feito um *screening* das amostras de soro na diluição de 1:32. De acordo com Silva et al. (2002), o uso da hemaglutinação indireta para a triagem de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de animais tem sido amplamente utilizada devido a sua praticidade e sensibilidade. Um feto foi necropsiado e fragmentos de todos os órgãos foram coletados, fixados em formalina tamponada a 10% e processados de acordo com os métodos convencionais para exames histopatológicos e corados pela hematoxilina-eosina (HE). Após a avaliação das lâminas no H&E, amostras de cérebro, cerebelo e fígado foram coradas, também, com o Ácido Periódico de Schiff (PAS). Posteriormente, amostra de cérebro foi submetida à imunoistoquímica. Foi utilizado anticorpo policlonal anti-*T. gondii* (B1013, Dako; diluição 1:250), com recuperação antigênica em calor úmido, empregando-se a técnica streptavidina-biotina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os abortos ocorreram no período de maio a agosto de 2006 em ovelhas Suffolk. Os abortos ocorreram no último mês de gestação afetando 58,3% das fêmeas, corroborando com a associação constatada por Figliuolo et al., (2004) entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em ovinos de maior idade. Das nove amostras de sangue analisadas, três foram positivas (33,3%) para *T. gondii*, sendo uma dessas da mãe do animal

necropsiado. As outras seis fêmeas que abortaram e que foram negativas na sorologia possivelmente não apresentavam soro-conversão para *T. gondii* na ocasião da coleta das amostras. Os animais soropositivos foram eliminados. A ovelha mãe do feto necropsiado apresentava sintomatologia respiratória com dispnéia e fraqueza. Doença pulmonar tem sido descrita em caprinos portadores do *T. gondii* (PESCADOR, et al., 2007).

À necropsia do feto havia focos pálidos na superfície de corte do fígado, os pulmões estavam congestionados e com aspecto marmorizado. O coração apresentava acentuada palidez e o cérebro e cerebelo severa congestão. Microscopicamente, havia no cérebro congestão severa, áreas de malácia com presença de cistos e taquizoítos dispersos (Figura 1) onde havia microgliose (Figura 2) e infiltração linfoplasmocitária moderada, além de microtrombose fibrinosa e meningite linfocitária difusa moderada, sugestivas de encefalite toxoplásmica. Nos cortes de pulmão, foram observadas extensas áreas de atelectasia, pneumonia intersticial linfocitária difusa moderada, exsudato fibrinoso intra-alveolar, além de microabscessos

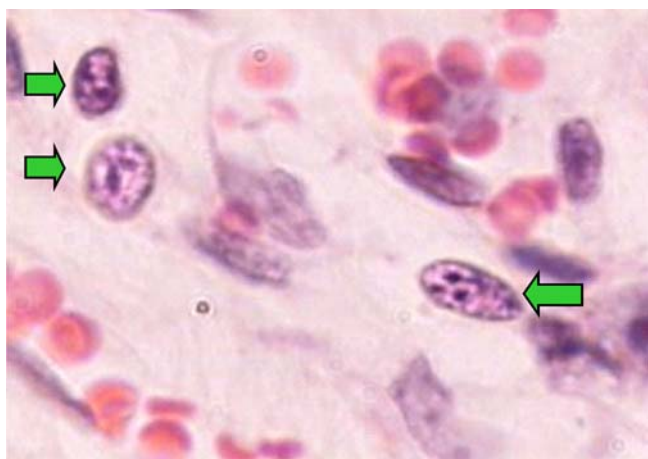


Figura 1. Feto ovino. Cérebro, córtex. Encefalite toxoplásmica. Cistos e taquizoítos dispersos (setas). HE, 1000X.

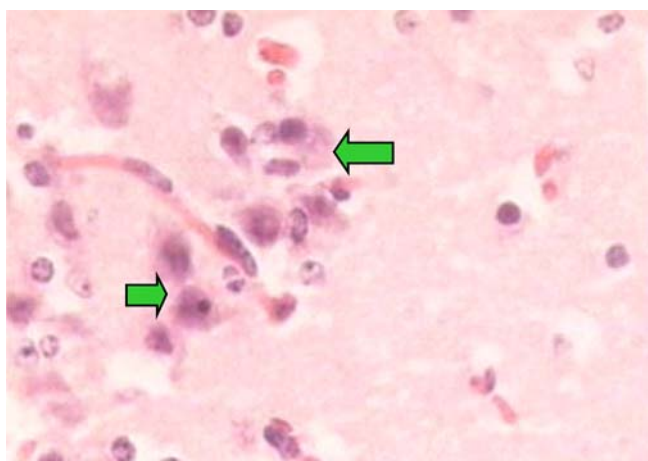


Figura 2. Feto ovino. Cérebro, córtex. Encefalite toxoplásmica. Microgliose (setas). HE, 100X.

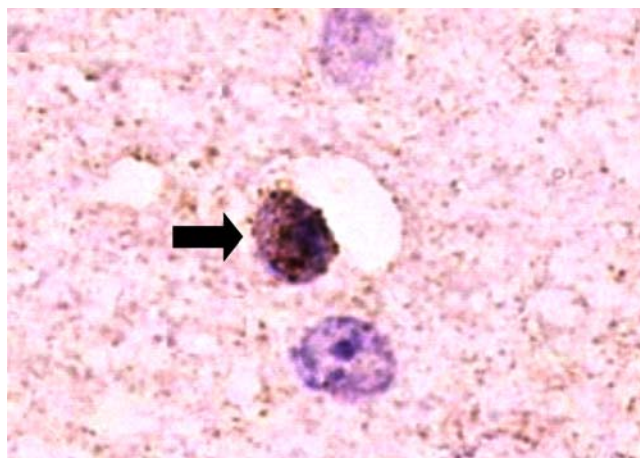


Figura 3. Feto ovino. Cérebro, córtex. Cisto de *Toxoplasma gondii* (seta). Marcação positiva (seta). Imunoistoquímica, 400X.

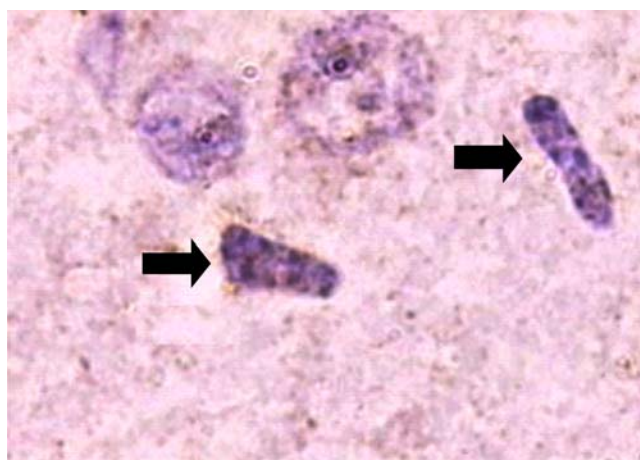


Figura 4. Feto ovino. Cérebro, córtex. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Marcação positiva (setas). Imunoistoquímica, 1000X.

focais. O fígado apresentava marcada congestão e focos de necrose centrolobular onde havia, em cortes corados com o PAS, estruturas compatíveis com taquizoítos. Foram observadas, também, miocardite linfocitária focal e nefrose tubular aguda associada à marcada congestão. A imunoistoquímica evidenciou marcação positiva para *T. gondii* (Figuras 3 e 4). Os achados anátomo-patológicos e imunoistoquímicos revelaram tratar-se de encefalite toxoplásmica. De acordo com Weismann et al. (2003), o cérebro é considerado a melhor amostra a ser submetida para análise imunoistoquímica para confirmação diagnóstica de toxoplasmose. De acordo com Weismann et al. (2003), em ovinos, a toxoplasmose cursa com placentite necrótica e infecção do feto, especialmente do sistema nervoso central, tal qual lesão constatada no feto necropsiado. Os achados histológicos observados foram similares aos mencionados por Okuda et al. (2007) em surto de aborto ovino diagnosticado no estado de Minas Gerais, onde quatro fetos necropsiados apresentaram encefalite não-purulenta com necrose multifocal, miocardite e hepatite não purulenta, necrose hepática difusa, além de infiltrado mononucle-

ar pulmonar e renal, sendo o diagnóstico confirmado pela PCR. Em ovinos, os abortos são causados principalmente por *T. gondii*, *Listeria monocytogenes* e *Chlamydomyxa abortus*. Entretanto, esses agentes não têm sido observados como causa de aborto em ovinos no Brasil (RIET-CORREA, 2007). Até o presente não tem sido registrados no Rio Grande do Sul surtos de aborto ovino por *T. gondii*. O presente trabalho enfatiza a importância de associar ferramentas diagnósticas no esclarecimento da causa de abortamento ovino concordando com outros trabalhos (PEREIRA-BUENO et al., 2004).

Infecções toxoplasmáticas têm sido descritas em fetos abortados e submetidas a diagnóstico em diferentes países (CHARLESTON, 1994). No Uruguai, no período 1992 a 1994, foi realizado um levantamento em diferentes regiões, que determinou que as perdas por toxoplasmose ovina, durante a gestação, foram de 1,4 a 3,9% (FREYRE et al., 1999). Na Espanha, a toxoplasmose ovina é amplamente prevalente em ovelhas (MAINAR et al., 1996; PEREIRA BUENO et al., 2004). No Brasil, têm sido realizados levantamentos soroepidemiológicos sobre a toxoplasmose ovina (FIGLIUOLO et al., 2004; OKUDA et al., 2007), mas, até o presente, não há relatos de toxoplasmose ovina utilizando-se análise imunistoquímica como ferramenta diagnóstica. Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir a ocorrência de toxoplasmose ovina no Planalto Médio do RS. Dessa forma, destaca-se o risco de infecção humana e ressalta-se a necessidade de alertar a população bem como os profissionais que atuam no meio rural, tendo em vista as perdas econômicas e seu potencial zoonótico. Assim, destaca-se a importância de estabelecer medidas de controle e prevenção da infecção no rebanho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, V.; SANTOS, S.M.; REBOUÇAS, M.M. Sobre a prevalência de anticorpos antitoxoplasma em soros de caprinos e ovinos procedentes respectivamente dos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul, *Biológico*, v.44, n.2, p.331-340, 1978.
- CHARLESTON, W.A.G. *Toxoplasma* and other protozoan infections of economic importance in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, v.21, n.1, p.67-81, 1994.
- CHIARI, C.A.; LIMA, W.S.; LIMA, J.D.; ANTUNES, C.M.F. Soro-epidemiologia da toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.39, n.4, p.587-609, 1987.
- DÍAS, R.A.F.; FREIRE, R.L. Surtos de Toxoplasmose em seres humanos e animais. *Semina: Ciências Agrárias*, v.26, n.2., p.239-248, 2005.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: KREIER, J. P. (Ed.). *Parasitic protozoa - gregarines, haemogregarines, coccidia, plasmodia and haemoproteids*. New York: Academic Press, 1977. v.3, p.101-237.
- DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v.66, n.1, p.111-114, 1980.
- DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Boca Raton: CRC Press, 1988. 220p.
- DUBEY, J.P.; KIRKBRIDE, C.A. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.195, n.12, p.1715-1716, 1989.
- FIGLIUOLO, L.P.C.; RODRIGUES, A.A.R.; VIANA, R.B.; AGUIAR, D.M.; KASAI, N.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. *Small Ruminant Research*, v. 55, n.1-3, p.29-32, 2004.
- FREYRE, A.; BONINO, J.; FALCÓN, J.; CASTELLS, O.; CORREA, A.; CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, v.81, n.1, p.85-88, 1999.
- MAINAR, R.C.; CRUZ, C. DA LA; DOMÍNGUEZ, L.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madrid region, Spain, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. *Veterinary Research Communications*, v.20, n.2, p.153-159, 1996.
- MALIK, M.A.; DEESEN, D.W.; CRUZ, A. Toxoplasmosis in sheep in northeastern United States. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.196, n.2, p.263-265, 1990.
- NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii*: isolamento de carne e cérebro de suínos. *Semina: Ciências Agrárias*, v.13, n.1, p.32-34, 1992.
- OKUDA L. H.; SILVA, G. J.; VILLALOBOS E. M. C.; DEL FAVA, C.; CUNHA E. M. S.; LARA M. C. C. S. H.; DE STEFANO E.; PITUCO E. M. Toxoplasmose em um rebanho ovino (*Ovis aries*) no Estado de Minas Gerais, Brasil. ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 13. Campo Grande, 2007. *Anais ... Campo Grande: Enapave*. 1 CDRoom.
- PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, v. 121, n.3, p.33-43, 2004.
- PESCADOR, C.A.; OLIVEIRA, E.C.; PEDROSO, M.O.; BANDARRA, P.M.; OKUDA, L.H.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n. 4, p. 167-171, 2007.
- PITA GONDIM, L.F.; BARBOSA J.R, H.V.; RIBEIRO FILHO, C.H.A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia, State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.82, n.3, p.273-276, 1999.
- RIET-CORREA, F. Mortalidade perinatal em ruminantes In: Riet-Correa, F.; Schild, A. L.; Lemos, R.A.A.;

- BORGES, J.R.J. *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. v. 2, Santa Maria: Palotti, 2007. p. 455-467.
- ROMMANELLI, P.R. Avaliação soropidemiológica de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do município de Guarapuava-PR. 2002, 53f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - Universidade Estadual de Londrina, 2002.
- SILVA, A.V.; CUTOLO, A.A.; LANGONI, H. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-toxoplasma em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.1, p.7-11, 2002.
- UGLA, A.; SJOLAND, L.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of toxoplasmosis in fetus and fetal membranes of sheep. *American Journal Veterinary Research*, v. 48, n.1 , p.348-351, 1987.
- VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; GIRALDI, N.; FREIRE, R. L.; MITSUKA, R. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina-PR. *Semina: Ciências Agrárias*, v.11, n.1, p.29-33, 1990.
- WEISSMANN, J. Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. *Canadian Veterinary Journal*, v.44. n.4 , p.322-324, 2003.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.