

## INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE EQUÍNOS COM TAQUIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA GONDII*.

E.SPÓSITO FILHA<sup>1,3</sup>, V.do AMARAL<sup>1</sup>, R.MACRUZ<sup>1</sup>, M.M.REBOUÇAS<sup>1</sup>, S.M.SANTOS<sup>1</sup> & F.BORG<sup>2</sup>

(1) Instituto Biológico de São Paulo, Caixa Postal 7119, CEP 01051, São Paulo, SP. - Brasil; (2) Jockey Club de São Paulo, Rua Bento Frias, 248, CEP 05423, São Paulo, SP. - Brasil; (3) Bolsista da FAPESP.

**SUMÁRIO:** Os autores relatam os resultados obtidos após infecção experimental em equínos com *T.gondii*, pela via endovenosa. Foram utilizados 3 animais: um inoculado com  $3,28 \times 10^7$  taquizoítos, outro com  $2,19 \times 10^7$  e um terceiro como controle. Nos animais inoculados foi observada ligeira elevação de temperatura entre o 4º e 8º dia após a inoculação (DAI) e corrimento ocular do 10º ao 26º DAI. Os equínos inoculados apresentaram títulos baixos para anticorpos antitoxoplasma na reação de hemaglutinação indireta. Parasitemia foi detectada entre o 6º e 12º DAI. Exames hematológicos e bioquímicos realizados no sangue dos animais não apresentaram alterações. O parasita não foi evidenciado nos cortes histológicos dos tecidos dos equínos nem reisolado, porém o parasitismo tecidual ficou demonstrado por meio de sorologia positiva dos camundongos inoculados com músculo diafragmático, músculo esquelético, esôfago, fígado, baço, rins, cérebro e linfonodos mesentéricos.

**FRASE CHAVE:** SPÓSITO FILHA *et alii*; Infecção de equínos com taquizoítos de *T. gondii*.

**PALAVRAS CHAVE:** *Toxoplasma gondii*, equínos, infecção experimental.

### INTRODUÇÃO

A toxoplasmose equina tem sido objeto de estudo em vários países, sob diversos aspectos: estudos sorológicos (CIHABRA & GAUTAM, 1980; EUGSTER & JOYCE, 1976; RIEMANN *et alii*, 1975; SATO, 1977), isolamentos do protozoário (AL-KHALIDI & DUBLEY, 1979; MAYER & BOEIRINGER, 1968) e infecções experimentais (AL-KHALIDI *et alii*, 1980; ALTAN *et alii*, 1977; DUBLEY, 1985, 1987; GOLOSOV & GORBYNOVA, 1970).

No Brasil, a maioria dos trabalhos descreve resultados obtidos em inquéritos sorológicos sobre a prevalência de anticorpos antitoxoplasma em equínos clinicamente sadios (ISHIZUKA *et alii*, 1975a; SILVA *et alii*, 1981; SILVA *et alii*, 1984; LARANJEIRA *et alii*, 1985; COSTA *et alii*, 1986; SPÓSITO *et alii*, 1986) ou com sintomatologia relacionada com incoordenação motora, abortamentos e irritabilidade (MACRUZ *et alii*, 1975; ISHIZUKA *et alii*, 1975b).

Considerando representativas as prevalências de equínos com anticorpos antitoxoplasma relatadas em nosso país bem como o valor zootécnico dos animais desta espécie, executamos o presente trabalho que teve como objetivo observar aspectos parasitológicos, bioquímicos, hematológicos e histológicos em equínos experimentalmente inoculados com *Toxoplasma gondii*.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Animais

Foram utilizados três equínos, dois machos e uma fêmea, com três a quatro anos de idade e das raças brasileiro de hipismo e mangalarga, previamente testados pela técnica da

hemaglutinação indireta e negativos para anticorpos antitoxoplasma.

Para a inoculação dos equínos, pela via endovenosa, nas dosagens de  $2,19 \times 10^7$  (animal nº 01) e  $3,28 \times 10^7$  (animal nº 02) taquizoítos, foi utilizada a amostra RH do *T. gondii* previamente mantida em camundongos albinos indicadores por passagens sucessivas. O equino de nº 03 permaneceu como controle.

#### Acompanhamento clínico

De cada equino foram medidas a temperatura e as frequências respiratória e cardíaca durante um período que compreendeu 7 dias antes e 41 dias após a inoculação (DAI).

Os animais foram observados diariamente, manhã e tarde, a fim de se constatar alguma alteração clínica que eventualmente ocorresse.

#### Sorologia

Amostras de sangue de cada equino, colhidas por punctura da jugular antes da inoculação e 6, 17, 21, 28, 35, 67 e 116 dias após a infecção (DAI), foram impregnadas em papel de Nobuto e posteriormente submetidas à reação de hemaglutinação indireta para a pesquisa de anticorpos antitoxoplasma.

#### Parasitemia

Após a inoculação e durante 35 dias, em intervalos de 48 horas, os equínos foram sangrados e o sangue total, sem anticoagulante, imediatamente inoculado, pela via intraperitoneal na quantidade de 1 ml, em um lote de três camundongos para cada equino do experimento. Os camundongos inoculados foram observados diariamente por um período de 30 dias, findo o qual foram sangrados - para exames

sorológicos de acompanhamento - e a seguir sacrificados. Parte das vísceras foi utilizada para exames histopatológicos, por meio de cortes corados pela hematoxilina e eosina. Foram realizadas, também, pesquisa de possíveis cistos teciduais em exame a fresco do cérebro desses camundongos, por meio de "squashes", e decalques de órgãos corados pelo Giensa.

### Estudos hematológicos e bioquímicos do sangue

Por punctura da jugular, realizada com agulha 40x15 montada em tubo vacutainer contendo o anticoagulante EDTA, foram colhidas amostras de sangue de cada um dos três eqüinos 100 e 36 dias antes da inoculação e 12,65 e 116 dias após a infecção dos animais. Foram realizados, nas amostras colhidas, os seguintes exames: eritograma (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média) leucograma (leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e basófilos) eletroforese de proteínas (proteína total, albumina, alfa-1 globulina, alfa-2 globulina, beta-2 globulina e gama-globulina) e bioquímico (uréia, glicose, creatinina, bilirrubina total, direta e indireta, fosfatase alcalina e transaminase GOT e GPT).

### Exames histopatológicos

No 116º DAI (para os animais de nºs 02 e 03) e no 145º DAI (para o animal de nº 01) os eqüinos foram sacrificados, necropsiados e suas vísceras examinadas macroscopicamente para a evidencição de alguma alteração. Amostras de coração, pulmão, esôfago, músculo diafragmático, músculo esquelético, baço, fígado, rins, cérebro, medula e linfonodos mesentéricos foram colhidas para a realização de exames histopatológicos por meio de cortes corados pela hematoxilina e eosina.

### Reisolamento da amostra de *T.gondii* inoculada

A fim de se tentar o isolamento da cepa inoculada, amostras das vísceras, dos três eqüinos, mencionadas no item anterior, foram utilizadas para a inoculação em camundongos albinos.

Cada amostra foi trabalhada segundo método descrito por JACOBS & MELTON (1957) e posteriormente inoculada pela via intraperitoneal, na quantidade de 1 ml, em 5 camundongos. Os camundongos foram observados por um período de 30 dias e depois sacrificados. De cada camundongo foram feitos "squashes" de cérebro a fim de se visualizar possíveis cistos teciduais do protozoário. O restante do cérebro foi utilizado para nova passagem em outro lote de camundongos. Amostras de sangue foram colhidas para a pesquisa de anticorpos, antitoxoplasma, por meio da reação de hemaglutinação indireta, e amostras de algumas vísceras (coração, cérebro, pulmão, fígado, baço, rins, intestinos e músculos) foram colhidas para a realização de exames histopatológicos em cortes corados pela hematoxilina e eosina.

## RESULTADOS

### Acompanhamento clínico

Os resultados registrados em relação à temperatura, frequência respiratória e cardíaca, obtidos antes e após a inoculação de

*T.gondii* nos eqüinos, quando comparados, permitiram concluir o seguinte:

#### *temperatura* -

eqüino de nº. 01: febril durante 4 dias a partir do 4º DAI

eqüino de nº. 02: febril durante 3 dias a partir do 6º DAI

eqüino de nº. 03: sem alterações

#### *frequência respiratória* -

eqüinos de nºs. 01, 02 e 03: sem alterações

#### *frequência cardíaca* -

eqüino de nº. 01: acentuado do 4º ao 41º DAI

eqüinos de nºs. 02 e 03: sem alterações

#### *outras alterações clínicas observadas* -

eqüinos de nºs. 01 e 02 ficaram apáticos do 4º ao 6º DAI

eqüino de nº. 01, entre 0 10º e 26º DAI, apresentou discreto corrimento ocular bilateral.

eqüino de nº. 02, entre 0 10º e 25º DAI, apresentou corrimento ocular no olho esquerdo com leve prolapso da terceira pálpebra.

eqüino de nº. 02, no 25º DAI, apresentou discreta dificuldade em deglutir alimentos.

Não foram observadas alterações clínicas no eqüino de nº. 03 (animal controle).

### Sorologia

Os eqüinos inoculados (nºs. 01 e 02) apresentaram títulos baixos para anticorpos antitoxoplasma a partir do 6º até o 116º DAI. O animal controle (nº. 03) permaneceu negativo.

Os resultados dos exames sorológicos se encontram na Tabela 1.

### Parasitemia

A parasitemia foi detectada somente por meio de anticorpos antitoxoplasma constatados nos camundongos inoculados com sangue dos eqüinos de nºs. 01 e 02. Ela foi observada entre o 6º e o 12º DAI. Os camundongos que apresentaram maiores títulos (1:4096), na reação de hemaglutinação indireta, foram aqueles inoculados com sangue colhido do eqüino de nº. 01 no 10º DAI.

### Estudos hematológicos e bioquímicos do sangue

Os resultados do eritograma, leucograma, eletroforese de proteínas e bioquímico do sangue - obtidos antes e após a inoculação dos animais com taquizoítos de *T.gondii* - quando comparados permitiram afirmar que nenhuma alteração digna de nota foi observada.

### Exames histopatológicos

Os exames macroscópicos e histopatológicos realizados nas vísceras dos três eqüinos não demonstraram alterações patológicas nem tampouco a presença do protozoário.

### Reisolamento da amostra de *T.gondii* inoculada

As amostras das várias vísceras dos três eqüinos inoculadas nos camundongos não proporcionaram o reisolamento da cepa de *T.gondii*. Porém, a presença do parasita foi demonstrada em alguns órgãos dos eqüinos de nºs 01 e 02 pela presença de anticorpos antitoxoplasma nos camundongos inoculados.

No eqüino de nº. 01 o parasitismo tecidual foi demonstrado nos seguintes órgãos: músculo diafragmático, fígado e linfonodos mesentéricos. E no eqüino de nº 02 nos seguintes órgãos:

Tabela 1 – Títulos de anticorpos antitoxoplasma medidos pela reação de hemaglutinação indireta em soros de eqüinos experimentalmente inoculados com taquizoítos de *T. gondii*

Eqüino nº	6ºDAI	17ºDAI	21ºDAI	28ºDAI	35ºDAI	67ºDAI	116ºDAI
01	1:64	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256
02	1:16	1:16	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64
03	—	—	—	—	—	—	—

DAI = dias após a inoculação;

— = negativo.

músculo diafragmático, músculo esquelético, esôfago, baço, rins, cérebro e linfonodos mesentéricos.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho aproximam-se daqueles encontrados por GOLOSOV & GORBYNOVA (*Op.cit.*), ALTAN *et alii* (*Op.cit.*), AL-KHALID *et alii* (*Op.cit.*), DUBEY (1985, 1987), LACERDA NETO *et alii* (1989a, 1989b) e MARQUES *et alii* (1989), apesar das diferentes vias de inoculação, quantidades e estágios do parasita utilizado nessas infecções experimentais.

Elevação de temperatura na primeira semana e lacrimejamento e apatia - também observados por nós - parecem ser os sintomas mais freqüentes em eqüinos infectados experimentalmente com *T. gondii*.

Em que pese as diferentes especificidades das provas sorológicas utilizadas para a avaliação de anticorpos antitoxoplasma em soros dos eqüinos inoculados com *T. gondii*, o que se observa é que existe uma resposta imunitária que pode ser detectada, em média, a partir do 4ºDAI.

A parasitemia observada no presente trabalho - entre o 6º e o 12ºDAI - esteve próxima da encontrada por GOLOSOV & GORBYNOVA (*Op.cit.*), mas diferiu das relatadas por LACERDA *et alii* (*Op.cit.*) e MARQUES *et alii* (*Op.cit.*).

Divergências maiores parecem ocorrer com relação ao isolamento de *T. gondii* a partir de tecidos dos animais inoculados. GOLOSOV & GORBYNOVA (*Op.cit.*) não conseguiram isolar o parasita nem mesmo do eqüino que morreu após o 17ºDAI. ALTAN *et alii* (*Op.cit.*) só conseguiram o isolamento a partir de coração de um entre quatro animais inoculados e questionaram se não teriam sido mais bem sucedidos se a quantidade de *T. gondii* inoculada por eqüino fosse maior. AL-KHALID *et alii* (*Op.cit.*) relataram que o isolamento foi mais freqüente a partir dos animais mais jovens e necropsiados entre 36 e 63 DAI. DUBEY (1985, 1987) obteve mais resultados positivos a partir de animais com títulos elevados para a presença de anticorpos antitoxoplasma, incluindo um eqüino necropsiado no 476ºDAI.

No presente estudo os animais inoculados tinham quatro anos de idade e a tentativa de determinar o parasitismo tecidual foi mais positiva no eqüino que recebeu  $3,28 \times 10^7$  taquizoítos de *T. gondii* e foi necropsiado no 116ºDAI do que naquele que

recebeu  $2,19 \times 10^7$  taquizoítos e foi sacrificado no 145ºDAI. No entanto, essa diferença pode ter sido causada por outros fatores já aventados anteriormente por AL-KHALID *et alii* (*Op.cit.*) e DUBEY (*Op.cit.*): cepa de *T. gondii* utilizada, baixa densidade de parasitas nos tecidos, distribuição desigual dos cistos pelos tecidos ou desaparecimento do protozoário dos tecidos dos eqüinos.

A ausência de alterações patológicas e de *T. gondii* nos cortes de tecidos dos eqüinos inoculados também foi relatada por GOLOSOV & GORBYNOVA (*Op.cit.*) e por DUBEY (*Op.cit.*). AL-KHALID *et alii* (*Op.cit.*), que administraram corticosteróides antes da inoculação dos animais, apesar de terem encontrado algumas alterações histológicas não puderam relacioná-las ao *T. gondii*, pois não foi possível visualizar a presença do parasita nesses tecidos.

Os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos do sangue, obtidos por nós, diferiram daqueles encontrados por MARQUES *et alii* (*Op.cit.*) que citaram a ocorrência de leucopenia com basopenia no 3º DAI e elevações dos níveis séricos de TGO no 18º DAI.

Os nossos resultados ratificaram, portanto, as evidências da resistência da espécie eqüina ao desenvolvimento de toxoplasmose clínica.

## AGRADECIMENTOS

Consignamos nossos agradecimentos ao Dr. Francisco R. A. Perdigão de Oliveira, do Instituto de Zootecnia, pela cessão dos animais; à Diretoria do Jockey Club de São Paulo, pela ajuda financeira e ao Sr. José Pinto de Andrade, "in memoriam", pela inestimável colaboração durante o andamento do trabalho.

## SUMMARY

The authors describe the results obtained after experimental infection of horses with *Toxoplasma gondii*, by intravenous route. Utilized were three animals: one inoculated with  $3.28 \times 10^7$  tachyzoites, another one with  $2.19 \times 10^7$  and the third remained as the control. In the inoculated animals a slight increase in the temperature was observed between the 4th and 8th days after inoculation (DAI), and ocular discharge from the 10th to 26th days. The inoculated horses showed slow titers for specific antibodies by indirect hemagglutination test. Parasitemia was detected between the 6th and 12th DAI. No alterations were detected in hematological and biochemical tests realized on the blood of the animals. The parasite was not found in their tissues - neither in histological preparations, nor isolated by bioprobe - but the tecidual parasitism was demonstrated by means of positive serology in inoculated mice with the following materials: muscles from the base of the diaphragm, skeletal musculature, esophagus, liver, spleen, kidney, brain and mesenteric lymph glands.

RUNNING HEAD: SPÓSITO FILHA *et alii*; Infection of horses with *T. gondii* tachyzoites.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*, horses, experimental infection.

## REFERÊNCIAS

- AL-KHALIDI, N.W. & DUBEY, J.P. (1979) Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. *J. Parasitol.*, 6:331-334.
- AL-KHALIDI, N.W.; WEISBRODE, S.E.; DUBEY, J.P. (1980) Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts to ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 41:1549-1551.
- ALTAN, Y.; HEYDORN, A.O.; JANITSCHKE, K. (1977) Zur infektiösität von *Toxoplasma* oozysten für das pferd. *Berl. Munch. Tierarztl. Wsch.*, 90:433-435.
- CHHABRA, M.B. & GAUTAM, O.P. (1980) Antibodies to *Toxoplasma gondii* in equids in north India. *Equine Vet. J.*, 12:146-148.
- COSTA, A.J.; ISHIZUKA, M.M.; MARQUES, L.C.; VIDOTTO, O.; ROCHA, U.F.; IKEDA, A. (1986) Toxoplasmosis frequency in equines from the north region of São Paulo State, Brazil. *Ars. Veterinária.*, 2:75-79.
- DUBEY, J.P. (1985) Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of equids fed oocysts. *Am. J. Vet. Res.*, 46:1753-1754.
- DUBEY, J.P. (1987) Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet. J.*, 19:337-339.
- EUGSTER, A.K. & JOYCE, J.R. (1976) Prevalence and diagnostic significance of *Toxoplasma gondii* antibodies in horses. *Vet. Med. & Small An. Cl.*, 71:1469-1471, 1473.
- GOLOSOV, V.I. & GORBYNOVA, Z.I. (1970) Toxoplasmosis of horses, asses and camels: "in" *Toxoplasmosis of animals*. Fitzgerald, P.R., Illinois, USA, 108-116.
- ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O.; BROGLIATO, D.F. (1975a) Avaliação da prevalência de anticorpos anti-toxoplasma em eqüinos PSI clinicamente normais. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S.Paulo*, 12:289-292.
- ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O.; BROGLIATO, D.F.; CUNHA, R.A.F.; GARRIDO, J.A. (1975b) Toxoplasmosis: estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos antitoxoplasma em soros de eqüinos PSI. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S.Paulo*, 12:283-288.
- JACOBS, L. & MELTON, M.L. (1957) A procedure for testing meat samples for *Toxoplasma* with preliminary results of a survey of pork and beef samples. *J. Parasitol.*, 43(supp.) 38-39.
- LACERDA NETO, J.C.; MARQUES, L.C.; COSTA, A.J. (1989a) Observações clínicas e hematológicas em eqüinos experimentalmente infectados pelo *Toxoplasma gondii*. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 13., Jaboticabal, *Resumos*. Jaboticabal, p.137.
- LACERDA NETO, J.C.; COSTA, A.J.; MARQUES, L.C. (1989b). Aspectos parasitológicos e imunológicos em eqüinos portadores de infecção toxoplásmica experimental. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 13., Jaboticabal, 1989. *Resumos*. Jaboticabal, p.113.
- LARANGEIRA, N.L.; ISHIZUKA, M.M.; HYAKUTAKE, S. (1985) Prevalência da toxoplasmosis eqüina avaliada pela técnica de imunofluorescência indireta, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 99:158-162.
- MACRUZ, R.; LENCI, O.; ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O.; CUNHA, R.A.F. da (1975) Toxoplasmosis em eqüinos PSI. Estudo sorológico. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S.Paulo*, 12:277-282.
- MARQUES, L.C.; COSTA, A.J.; LACERDA NETO, J.C.; LOPES, C.W.G.; CAMPOS FILHO, E. (1989) Infecção experimental de éguas gestantes com oocistos de *Toxoplasma gondii*. NICOLLE & MANCEAUX, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae). In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 13., Jaboticabal, 1989. *Resumos*. Jaboticabal, p.147.
- MAYER, H.F. & BOEHRINGER, I.K. (1968) Nuevos aislamientos de *Toxoplasma gondii* de material humano y animal. *Rev. Fac. Cienc. Vet. La Plata*, 10:175-180.
- RIEMANN, H.P.; SMITH, A.T.; STORMONT, C.; RUPPANNER, R.; BEIYMER, D.E.; SUZUKI, Y.; FRANTI, C.E.; VERNA, B.B. (1975) Equine toxoplasmosis: a survey for antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 36:1797-1800.
- SATO, N. (1960) Studies on the distribution of dye-test antibodies among animals in Hokkaido and the complement fixing antigen for toxoplasmosis. *Jap. J. Vet. Res.*, 8:217-218.
- "apud" HAGIWARA, T. (1977) Toxoplasmosis of animals in Japan. *Int. J. Zoon.*, 4:56-71.
- SILVA, N.R.S.; CHAPLIN, E.L.; ARAÚJO, F.A.P.; PEREIRA, E.A.P. (1981) Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em soros de eqüinos no município de Porto Alegre, R.S. *Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. R.G.S.*, 9:105-107.
- SILVA, S.; PIVATO, I.; NISHIKAWA, H.; ARNONI, J.V.; RASSIER, D.S.S. (1984) Prevalência de anticorpos antitoxoplásmicos em animais domésticos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19, Belém, 1984. *Anais*. Belém, p.130.
- SPÓSITO FILHA, E.; AMARAL, V. do; MACRUZ, R.; REBOUÇAS, M.M.; BARCI, L.A.G. (1986) *Toxoplasma gondii* em eqüinos: estudo sorológico e tentativa de isolamento. *Biológico*, 52:73-74.

(Received, February 19, 1992).