

**VIABILIDADE E MORFOBIOLOGIA DOS OOCISTOS DE
Cystoisospora ohioensis (DUBEY, 1975) FRENKEL, 1977
(APICOMPLEXA: CYSTOISOSPORINAE) ELIMINADOS
POR CÃES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE***

*VIABILITY AND MORPHOBIOLOGY OF Cystoisospora ohioensis
(DUBEY, 1975) FRENKEL, 1977 (APICOMPLEXA:
CYSTOISOSPORINAE) OOCYSTS SHED BY DOGS
EXPERIMENTALLY INFECTED*

Walter Leira Teixeira Filho¹, Sergian Vianna Cardozo² & Carlos Wilson Gomes Lopes³

ABSTRACT. Teixeira Filho W.L., Cardozo S.V. & Lopes, C.W.G. [**Viability and morphobiology of *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) oocysts shed by dogs experimentally infected**] Viabilidade e morfobiologia dos oocistos de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) eliminados por cães infectados experimentalmente. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32(3):161-165, 2010. Escola de Ciências da Saúde, Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Grande Rio, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brasil. E-mail: sergianvc@oi.com.br

With the purpose of estimating the viability, sporulation time, prepatent period (PPP), patent period (PP) and morphologic patterns of *Cystoisospora ohioensis*, dogs were divided in two groups and were infected with 5×10^4 sporulated oocysts, two of these were infected with stoked oocysts that were storage at refrigeration temperature for a period of two years, where were obtained first passing oocysts, were obtained by infection of two other animals. Then the total quantity of feces daily eliminated for each group, were submitted to forced aeration to obtain sporulated oocysts. The stoked oocysts had 23.82 ± 0.98 by $21.24 \pm 1.65 \mu\text{m}$ length and width respectively, whereas sporocysts measured 19.78 ± 1.80 by $14.35 \pm 2.07 \mu\text{m}$ of diameter. The first passing oocysts last twelve days to complete the sporulation, the PPP was three days and the PP was eight days. Oocysts were 26.17 ± 2.66 by $23.23 \pm 2.67 \mu\text{m}$ whereas sporocysts measured 16.43 ± 2.50 by $12.67 \pm 1.67 \mu\text{m}$ of diameter. The second passing oocysts had PPP of five days, PP of nineteen days and sporulated in six days, whereas oocysts and sporocysts measured 20.84 ± 1.38 by $18.59 \pm 1.75 \mu\text{m}$ and 13.61 ± 1.25 by $9.59 \pm 0.90 \mu\text{m}$, respectively. Significant differences between PPP and PP were observed, and in the morphometry of the sporocysts from second passage with oocysts varying from subspherical to elliptical.

KEY WORDS. *Cystoisospora ohioensis*, dogs, morphobiology, experimental infection.

RESUMO. Com o objetivo de estimar a viabilidade, o tempo de esporulação, o período pré-patente (PPP), o período de patência (PP) e os aspectos morfológicos

de *Cystoisospora ohioensis*, foram feitas infecções experimentais em cães, divididos em dois grupos. Os animais foram infectados com 5×10^4 oocistos esporu-

*Recebido em 3 de fevereiro de 2010

Aceito em 20 de maio de 2010

¹ Biólogo, *PhD*, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: leira@ufrj.br

² Médico-veterinário, *Dr. Patol.*, Escola de Ciências da Saúde, Curso de Ciências Biológicas, UNIGRANRIO, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brasil. E-mail: sergianvc@oi.com.br

³ Médico-veterinário, *PhD*, LD, DPA, IV, UFRRJ, BR 465, km 7, Seropédica, 23890-000, RJ. E-mail: lopescw@ufrj.br – bolsista CNPq

lados, mais dois animais infectados, com oocistos armazenados que foram mantidos previamente por um período de dois anos em refrigeração, onde se obteve após infecção oocistos de 1ª passagem, os quais foram utilizados para a infecção de mais outros dois animais. A seguir, a quantidade total de fezes eliminadas diariamente, para cada grupo, foi submetida à aeração, para que ocorresse a esporulação dos oocistos. Os oocistos armazenados mediram $23,82 \pm 0,98$ por $21,24 \pm 1,65 \mu\text{m}$ com os respectivos esporocistos medindo $19,78 \pm 1,80$ por $14,35 \pm 2,07 \mu\text{m}$ de diâmetro. Os de 1ª passagem levaram 12 dias para esporular, sendo o PPP de três dias e o PP de oito dias, cujas medidas dos oocistos foram $26,17 \pm 2,66$ por $23,23 \pm 2,67 \mu\text{m}$ com esporocistos medindo $16,43 \pm 2,50$ por $12,67 \pm 1,67 \mu\text{m}$. Os oocistos de 2ª passagem tiveram PPP de cinco dias, PP de 19 dias e esporularam em seis dias, cujas medidas dos oocistos e esporocistos foram $20,84 \pm 1,38$ por $18,59 \pm 1,75 \mu\text{m}$ e $13,61 \pm 1,25$ por $9,59 \pm 0,90 \mu\text{m}$, respectivamente. Foram observadas ainda diferenças significativas entre o PPP e PP e na morfometria dos esporocistos de 2ª passagem, com os oocistos variando da forma subsférica à elipsoidal.

PALAVRAS-CHAVE. *Cystoisospora ohioensis*, cães, morfobiologia, infecção experimental.

INTRODUÇÃO

A coccidiose tem sido considerada uma das protozooses mais importantes para cães e gatos, devido à sua frequência e patogenicidade (Rachman & Pollock 1961). Quatro espécies são conhecidas tendo o gato e o cão como hospedeiros definitivos: *Cystoisospora felis*, *C. rivolta*, *C. canis* e *C. ohioensis* (Smith 1981).

A disseminação das espécies de *Cystoisospora* tem sido observada com maior frequência em criações onde a aglomeração, falta de higiene e manejo inadequado dos animais são fatores que facilitam a instalação da doença (Loss & Lopes 1992, Dubey 1992, Greene 1993).

Cystoisospora ohioensis é um parasita que faz seu desenvolvimento nas células epiteliais do jejuno, ceco e cólon de seu hospedeiro definitivo, estando associadas a um quadro de diarreia com presença de muco ou sangue, desidratação, anorexia e depressão (Dubey 1978). Este parasito, ao infectar seus hospedeiros intermediários, apresenta um ciclo biológico extra-intestinal, com formação de cistos monozóicos, contendo em seu interior apenas um hipnozoíta (Dubey 1979) e ocorre principalmente em órgãos linfóides, onde não se observa a multiplicação de *C. ohioensis* (Dubey 1992).

O cão pode infectar-se ao ingerir oocistos esporulados que se encontram dispersos no meio ambiente ou,

pela ingestão de vísceras de seus hospedeiros intermediários, como camundongos, ratazanas, hamster dourado, frangos, onde hipnozoítas podem ser encontrados no baço, fígado, bursa cloacal, linfonodos mesentéricos e esporadicamente na musculatura esquelética (Dubey & Mehlhorn 1978, Massad et al. 2002).

A capacidade de sobrevivência de um coccídeo torna-se maior quando encontra as condições ideais no meio ambiente, como temperatura, oxigenação e umidade, no entanto, ainda que em condições adversas os oocistos sobrevivem durante semanas no solo contaminado facilitando, dessa maneira sua dispersão no ambiente (Fayer 1980).

Para o diagnóstico deste coccídeo tomam-se por base seus hospedeiros definitivos e algumas vezes os intermediários, assim como, as características morfológicas e morfométricas dos oocistos além do tempo de esporulação, período pré-patente e de patência, que os diferenciam entre si nas fezes dos animais contaminados (Dubey et al. 1978).

Este estudo teve como objetivos: avaliar se os oocistos mantidos sob refrigeração durante um período de dois anos continuariam viáveis; infectar novos animais com esses oocistos de modo que se obtenham oocistos de 1ª e 2ª passagem; determinar o tempo de esporulação, o período pré-patente e de patência, além das curvas de eliminação dos oocistos dos cães infectados em todas as etapas do estudo e, finalmente, avaliar os aspectos morfológicos desses oocistos esporulados.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ). Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram utilizadas três cadelas prenhas oriundas do Município do Rio de Janeiro, das quais foram separados dois filhotes de cada ninhada, totalizando seis animais, utilizados ao longo do estudo. Estes nasceram em períodos distintos e foram separados em dois grupos: grupo infectado, constituído por quatro animais e grupo controle com dois animais, sendo um para cada etapa do estudo. As cadelas prenhas foram tratadas com sulfadiazina (410mg) e trimetopim (90mg), nos últimos 10 dias de prenhez, conforme Oliveira et al. (2000). Os filhotes, com 30 dias de idade, foram mantidos em gaiolas, separadamente.

Exame diário de fezes por um período de quinze dias foi realizado para se constatar que estavam livres de infecção parasitária até o dia da infecção experimental.

Os quatro animais foram colocados em gaiolas individuais, de acordo com o grupo, porém em boxes separa-

dos, previamente esterilizados por flambagem com auxílio de vassoura de fogo, sendo fornecidos água e ração comercial ad libitum para os filhotes, até o término do estudo. Na primeira etapa, foram utilizados oocistos de *C. ohioensis*, oriundos da infecção de cães com baço, fígado e bursa cloacal, de frangos infectados experimentalmente, com 10^4 oocistos e mantidos sob refrigeração a 4°C , por um período de dois anos.

Os dois cães, com aproximadamente um mês de idade, foram infectados por via oral, com 5×10^4 oocistos esporulados misturados à ração úmida. A partir do primeiro dia após a infecção (DAI) as fezes destes animais foram recolhidas, pesadas e examinadas, para verificar a presença de oocistos; em seguida, foram dissolvidas em água e a elas adicionada uma solução de dicromato de potássio 2,5%, em partes iguais e acondicionadas em frasco limpo, que foi submetido à areação com auxílio de uma bomba de aquário convencional, à temperatura ambiente.

Após este procedimento, retirou-se uma alíquota da suspensão para ser examinada ao microscópio óptico. Durante alguns dias, repetiu-se esta operação até que o índice de esporulação dos oocistos atingisse 80% ou valor superior. Em seguida, o material contendo oocistos esporulados foi processado de acordo com a Técnica de Centrífluo-flutuação, descrita por Teixeira Filho et al. (2001). Após serem ressuspensos, o sobrenadante foi vertido em placas de Petri com 14 cm de diâmetro, até a formação de um menisco, quando então foi sobreposta a parte externa da placa de Petri com diâmetro de 15 cm, de modo que fosse formada uma interface entre a placa e o menisco já existente. Durante o período de uma hora, a intervalos de 15 minutos, removeu-se a placa de cima, para que o fundo fosse lavado com solução tampão fosfato (PBS), pH 7,2, com auxílio de um borrifador de água. Este “lavado” contendo oocistos esporulados foi centrifugado por quatro vezes em água destilada, com a finalidade de remover o excesso de solução saturada, sendo o sedimento final ressuspensado em 2 ml de PBS e, em seguida, colocado em tubos plásticos tipo “ependorf”, com capacidade para 2 ml e armazenados sob refrigeração.

Para a segunda etapa do estudo, foram utilizados dois cães, com aproximadamente um mês e meio de idade, mantidos em gaiolas separadas e quando desmamados foram colocados em boxes individuais e inoculados por via oral, com 5×10^4 oocistos esporulados, só que desta vez utilizando-se os oocistos de 1ª passagem, com a finalidade de obter oocistos de 2ª passagem, com seus respectivos período pré-patente (PPP), período de patência (PP) e ainda o tempo de esporulação e as curvas de eliminação.

Para análise morfoométrica foram mensurados, com auxílio de ocular micrométrica SK-15X acoplada ao microscópio biocular Carl Zeiss, em cada etapa do experimento, os diâmetros maior (DM) e menor (dm) de 100 oocistos esporulados e esporocistos. O índice morfoométrico (IM), razão entre o DM e dm, foi calculado para ambos diâmetros.

A análise estatística dos resultados foi feita com base em Sampaio (2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de *C. ohioensis*, nas fezes dos cães, foi verificada através da contagem dos oocistos por grama de fezes (OoPG). Pode-se observar que os cães infectados com os oocistos de 1ª e 2ª passagem começaram a eliminar oocistos nas fezes no 3º e 5º DAI, respectivamente. Constatou-se que os picos de eliminação ocorreram no 3º e 8º DAI, diminuindo rapidamente a partir do 9º DAI, cessando a eliminação dos oocistos, a partir do 12º DAI para os oocistos de 1ª passagem. Fica evidente, portanto, que os animais infectados com oocistos de 1ª passagem, tiveram um PPP e PP menor, e um tempo de esporulação maior, quando comparado com os animais infectados com oocistos de 2ª passagem (Figura 1).

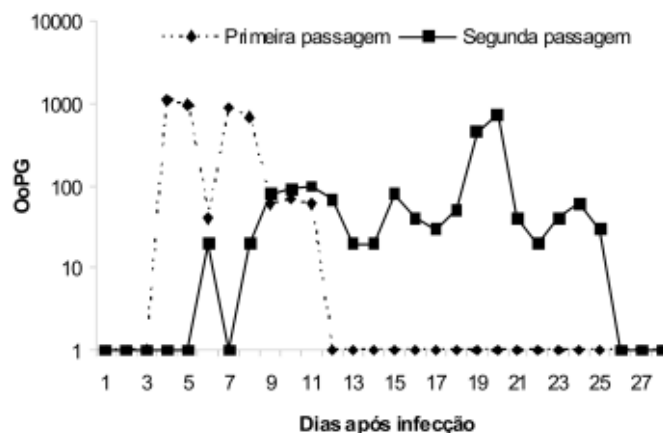


Figura 1. Eliminação de oocistos por grama de fezes (OoPG) de cães infectados por via oral com 5×10^4 oocistos esporulados de *Cystoisospora ohioensis*.

A eliminação dos oocistos de 1ª passagem nas fezes dos cães iniciou-se no 3º DAI persistindo até o 10º DAI, apresentando um PPP de três dias e PP de 8 dias, concordando com os resultados obtidos por Rocha & Lopes (1971) para o PPP, mas discordando dos resultados encontrados por Lepp & Todd (1974) e Dubey (1977), que observaram um PPP de seis dias; Baek et al. (1993) observaram um PPP de quatro dias; Lindsay & Blagburn (1994) e Oliveira et al. (2000), que verificaram um PPP de cinco dias. Em relação ao PP, o resultado obtido foi igual ao encontrado por Rocha & Lopes (1971) e se-

Tabela 1. Medidas dos oocistos e esporocistos de *Cystoisospora ohioensis* de acordo com as etapas do experimento.

Etapas	Oocistos (μm)			Esporocistos (μm)		
	DM	dm	IM	DM	dm	IM
Armazenados	23,82 \pm 0,98	21,24 \pm 1,65	1,12	19,78 \pm 1,80 ^a	14,35 \pm 2,07	1,37
1 ^a passagem	26,17 \pm 2,66	23,23 \pm 2,67	1,12	16,43 \pm 2,50 ^{a,d}	12,67 \pm 1,67	1,29
2 ^a passagem	20,84 \pm 1,38	18,59 \pm 1,75	1,12	13,61 \pm 1,25 ^{b,d}	9,59 \pm 0,90	1,41

Letras diferentes significância em nível de $p < 0,05$ pelo teste t de Tukey.



Figura 2. Oocisto esporulado de *Cystoisospora ohioensis* obtido das fezes de camundongo *Mus musculus* após a segunda passagem. Técnica de centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar. Escala=10 μm .

melhantes aos observados por Levine (1985), Georgi & Georgi (1992). Pode-se observar ainda, que os piques de eliminação de oocistos ocorreram no 3^o e 6^o DAI, apresentando a partir do 8^o DAI diminuição da eliminação e cessando, completamente, no 10^o DAI. O tempo de esporulação observado foi de 12 dias com a temperatura ambiente variando entre 19 e 21 $^{\circ}\text{C}$.

Uma das características biológicas utilizadas no auxílio da identificação das diferentes espécies de coccídios tem sido o tempo de esporulação (Norton & Joyner 1981, Joyner 1982, Long & Joyner 1984), sendo este variável com temperatura, umidade e oxigenação.

Estes resultados mostraram que os oocistos de 1^a passagem não perderam sua infectividade e tiveram um tempo de esporulação rápido, apesar da temperatura no período ter sido relativamente baixa. Isto pode ter sido ocasionado por uma série de fatores, entre eles, a ação da baixa temperatura de conservação dos oocistos, ocasionando extravasamento do citossol do interior destes, o que pode ter facilitado o rompimento da parede e a conseqüente liberação dos esporocistos e esporozoítos, ou ainda, devido ao longo período em que este material ficou armazenado em dicromato de potássio a 2,5% sob resfriamento e que, de acordo com os trabalhos de Speer et al. (1973), em que eles relataram

que algumas espécies de *Isospora* (= *Cystoisospora*), existam pela ruptura da blindagem dos esporocistos, enquanto que outras, pelo escape dos esporozoítos, através de uma abertura dos esporocistos que estão ligados ao corpo de Stieda.

A eliminação dos oocistos de 2^a passagem nas fezes (Figura 2) teve seu início ao 5^o DAI, determinando um PPP de 5 dias, que persistiu até o 24^o DAI, apresentando assim um PP de 19 dias que concordando com os resultados obtidos por Dubey (1976), Levine (1985), Georgi & Georgi (1992), Rocha & Lopes (1971) e semelhantes aos observados por Oliveira et al. (2000), tanto para o PPP quanto ao PP. Estes animais tiveram piques de eliminação dos oocistos (OoPG) nas fezes, nos 10^o, 18^o e 19^o DAI. Demonstrando que esses oocistos em relação aos de 1^a passagem apresentaram-se mais infectantes, tomando-se por base a dose utilizada na infecção, que foi a mesma e a condição de que estes oocistos não foram mantidos por um longo período em dicromato de potássio a 2,5%. O processo de esporulação foi concluído em 6 dias com temperatura variando de 19, 2 a 26 $^{\circ}\text{C}$. Provavelmente a troca de ração tenha sido um fator de estresse para estes animais, concordando com os resultados obtido por Fayer (1980), onde ele observou que a mudança na alimentação pode influenciar na eliminação de oocisto nas fezes.

A alteração do aspecto morfológico observado no DM e dm dos oocistos armazenados, não foi suficiente para modificar em média o respectivo índice morfométrico, não alterando também os oocistos de 1^a e 2^a passagens. No entanto, foi observada diferença significativa na morfometria dos esporocistos de 2^a passagem (Tabela 1).

De acordo com Long & Joyner (1984) o tamanho do oocisto pode ser variável, entretanto seu índice morfométrico tem se mantido constante, sendo que essa variação pode estar relacionada à imunidade do animal, ao grau de infecção, como também ao período de patência.

Não foram observados micrópila, resíduos e grânulos polares nos oocistos de 1^a e 2^a passagem neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baek K.B., Chun S.K., Jin H.K., Kyu S.H. & Young G.K. Studies on isosporosis in dogs. I: Isolation and Sporulation of *Isospora ohioensis*. *Korean J. Parasitol.*, 31:201-206, 1993.

- Dubey J.P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and other coccidia of cats and dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 169:1061-1078, 1976.
- Dubey J.P. Taxonomy of *Sarcocystis* and other coccidia of cats and dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 170:778-782, 1977.
- Dubey J.P. Pathogenicity of *Isospora ohioensis* infection in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173:192-197, 1978.
- Dubey J.P. Life cycle of *Isospora rivolta* (Grassi, 1879). In cats and mice. *J. Protozool.*, 26:433-443, 1979.
- Dubey J.P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cystis-forming coccidia of man and animals, p.120-128. In: Kreier J.P. (Ed.), *Parasitic Protozoa.*, Academic Press, New York, 1992.
- Dubey J.P. & Mehlhorn H. Extraintestinal stages of *Isospora ohioensis* from dogs in mice. *J. Parasitol.*, 64:689-685, 1978.
- Fayer R. Epidemiology of protozoan infection. The coccidia. *Vet. Parasitol.*, 6:75-103, 1980.
- Green C.E. *Enfermedades infecciosas peros y gatos*. Interamericana, México, 1993. 1020p.
- Georgi J.R. & Georgi M.E. *Canine clinical Parasitology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.75-100.
- Joyner L.P. Host and site specificity, p.35-62. In: Long P.L. (Ed.), *The biology of the Coccidia*. Univ. Park Press, Baltimore, 1982.
- Lepp D.L. & Todd K.S. Life cycle of *Isospora canis*, Nemeséri 1959 in the dog. *J. Protozool.*, 21:199-206, 1974.
- Levine N.D. *Veterinary Protozoology*. ISU Press, Ames, 1985. 414p.
- Lindsay D.S., Blagburn B.R. Biology of mammalian *Isospora*. *Parasitol. Today*, 10:214-220, 1994.
- Long P.L. & Joyner L.P. Problems in the identification of species of *Eimeria*. *J. Protozool.*, 31:535-541, 1984.
- Loss Z.G. & Lopes C.W.G. Alguns aspectos clínicos da infecção experimental por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1976 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em gatos. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J.*, 15:79-84, 1992.
- Massad F.V., Oliveira F.C.R. de, Albuquerque G.R. & Lopes C.W.G. Hipnozoítas de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em frangos. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, 10:57-58, 2002.
- Norton C.C. & Joyner L.P. *Eimeria acervulina* and *E. mivati* oocysts, life-cycle and ability to develop in chicken embryo. *Parasitology*, 83:269-279, 1981.
- Oliveira F.C.R. de, Albuquerque G.R., Munhoz A.D. & Lopes C.W.G. Oocistos de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em cães de uma ninhada infectada em condições naturais. *Rev. Univ. Rur.: Ci. Vida*, 22(supl. 1):107-111, 2000.
- Rachman M. & Pollock S. Treatment of canine coccidiosis. *Vet. Med.*, 56:75-76, 1961.
- Rocha E.M. & Lopes C.W.G. Comportamento de *Isospora canis*, *Isospora felis* e *Isospora rivolta* em infecções experimentais em cães e gatos. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J.*, 1:81-96, 1971.
- Rodrigues A.N. & Menezes R. de C.A.A. de. Infecção natural de cães por espécies do gênero *Cystoisospora* (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em dois sistemas de criação. *Clin. Vet.*, 8:2430, 2003.
- Sampaio I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 2002. 265p.
- Speer C.A., Hammond D.M., Mahrt J.L. & Robert W.L. Structure of the oocyst and sporocyst walls and excystation of sporozoites of *Isospora canis*. *J. Parasitol.*, 59:35-40, 1973.
- Smith D.D. The Sarcocystidae: *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Hammondia*, and *Cystoisospora*. *J. protozool.*, 28:262-266, 1981.
- Teixeira Filho W.L., Menezes R. de C.A.A. de & Lopes C.W.G. *Eimeria ninakholyakimovae* (Apicomplexa: Eimeriidae) de caprinos leiteiros de um criatório na microrregião do Rio de Janeiro: aspectos morfobiológicos. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, 8:85-87, 2001.