

# ***Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) do cão: diferenças biológicas associadas com as vias de infecção\***

## ***Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) of the dog: biological differences associated with the ways of infection**

Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira,\*\* Fabiana Valadão Massad,\*\*\* George Rego Albuquerque,\*\*\*\*  
Carlos Wilson Gomes Lopes\*\*\*\*\*

### **Resumo**

Diferenças biológicas e pleomorfismo nos oocistos foram observadas, quando cãesinhos foram infectados experimentalmente com *Cystoisospora ohioensis*. Para tanto, utilizaram-se seis filhotes recentemente desmamados de uma cadela livre de coccídios, com aproximadamente um mês de idade. Dois deles foram infectados com oocistos esporulados, dois outros com vísceras trituradas, contendo hipnozoítas, e os dois últimos deixados como controles. Diariamente, o total de fezes eliminadas por cada grupo foi recolhido e os oocistos deixados esporular em bicromato de potássio a 2,5% por 72 horas à temperatura ambiente. Os animais infectados com hipnozoítas eliminaram oocistos em suas fezes quatro dias após a infecção (DAI), persistindo por um período de 27 DAI, enquanto os infectados com oocistos esporulados eliminaram oocistos em suas fezes aos cinco DAI, persistindo a eliminação por 23 DAI. Os filhotes infectados com hipnozoítas eliminaram mais oocistos com um máximo de 2.565 oocistos aos 25 DAI que os outros infectados com oocistos que tiveram uma eliminação máxima de 2.778 oocistos aos 5 DAI. Foi observada ainda diferença significativa entre os diâmetros maiores dos oocistos presentes nas fezes dos cães infectados com hipnozoítas em comparação com os dos cães infectados com oocistos. Os oocistos eliminados nas fezes dos cães, sejam infectados com hipnozoítas ou oocistos esporulados, mediram  $26,40 \pm 1,69$  por  $24,47 \pm 1,36$  e  $25,28 \pm 2,12$  por  $23,32 \pm 2,18$   $\mu\text{m}$  respectivamente.

*Palavras-chave:* *Cystoisospora ohioensis*, cães, infecção experimental, oocistos, hipnozoítas.

### **Abstract**

Biological differences and pleomorphism of the oocysts were observed, when puppies were experimentally infected by *Cystoisospora ohioensis*. For so much, six animal with approximately a month of age and recently weaned of a beach free of coccidia were infected. Two of them were infected by sporulated oocysts, two other infected by grinded mice visceras, contended hypnozoites. The last ones were left as controls. Daily, the total volume of feces shed by each group were collected e to obtained sporulated oocysts were left to aeration in potassium dicromate 2.5% for 72 h at environment temperature. The animals inoculated with hypnozoites shed oocysts in their feces at 4 days after infection (DAI) persinsting up to 27 DAI, while which those inoculated with oocysts shed oocysts in their feces at 5 DAI persisting up to 23 DAI. Puppies infected by hypnozoites eliminated more oocysts with a maximum of 2,565 oocysts at 25 DAI than other ones infected by oocysts with a maximum of 2,778 oocysts at 5 DAI. A side these results, the way of infection determined significant difference in the length of oocysts, when they were shed by dogs induced by hypnozoites ( $26.40 \pm 1.69$  by  $24.47 \pm 1.36$   $\mu\text{m}$ ) or sporulated oocysts. ( $25.28 \pm 2.12$  by  $23.32 \pm 2.18$  mm).

*Keywords:* *Cystoisospora ohioensis*, dogs, experimental infection, oocysts, hypnozoites.

\* Sob os auspícios do CNPq/FAPERJ

\*\* Laboratório de Sanidade Animal, CCTA, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.

\*\*\* Bolsista de IC/CNPq, Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRuralRJ, CEP 23890-000 Seropédica, RJ.

\*\*\*\* CursodePós-GraduaçãoemMedicinaVeterinária-ParasitologiaVeterinária,UFRuralRJ, CEP 23890-000 Seropédica, RJ.

\*\*\*\*\* Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRuralRJ, CEP 23890-000 Seropédica, RJ, Brasil. E.mail: lopescwg@ufrj.br

## Introdução

A diarreia é muito comum em filhotes de cães e gatos. Nestes animais essa síndrome pode ser desencadeada principalmente por fatores ambientais, virais e parasitários, levando a desidratação e morte (Alves, 2000).

*Cystoisospora ohioensis* é um parasita que tem seu desenvolvimento nas células epiteliais do jejuno, ceco e cólon de seu hospedeiro definitivo, canídeos, promovendo então um quadro caracterizado por diarreia com presença de muco ou sangue, desidratação, anorexia e depressão (Dubey, 1978), onde os animais podem se infectar por duas formas: pela ingestão de oocistos esporulados presentes no meio ambiente, ou pela ingestão de vísceras de animais previamente infectados contendo cistos. Estes cistos são caracterizados como monozóicos por conter apenas um hipnozoíta no seu interior, além de possuir parede fina ao seu redor. São, em sua maioria, encontrados em órgãos linfóides (Smith, 1981).

As infecções por espécies de *Cystoisospora* têm sido observadas com mais frequência em criações, onde a aglomeração facilita a disseminação desta parasitose. Desta maneira, os animais jovens são os mais afetados, podendo-se observar um quadro de diarreia associado a formas enteroepiteliais livres destes parasitos, apesar de serem observados poucos oocistos nas fezes (Loss, Lopes, 1992; Dubey, 1992; Greene, 1993). Além disso, a idade é um importante fator na determinação da severidade da doença, o filhote é mais propenso à doença (Georgi, Georgi, 1992), do que os adultos (Levine, 1985).

Este trabalho teve como objetivo analisar comparativamente o período pré-patente, patente e avaliar a quantidade de oocistos eliminados diariamente nas fezes e suas diferenças morfológicas em dois grupos de filhotes infectados experimentalmente com oocistos esporulados e com macerado de vísceras de camundongos contendo hipnozoítas.

## Material e métodos

Neste experimento, foram utilizados cinco camundongos albinos provenientes do Biotério Central da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e seis filhotes de uma cadela livres de coccídios. Estes foram vermifugados aos 25 e desmamados aos 35 dias de idade. Os animais foram colocados em gaiola apropriada para a espécie, sendo fornecidas aos mesmos água e ração *ad libitum*.

Oocistos oriundos de uma infecção natural foram concentrados e contados em câmara de Neubauer, sendo o tamanho do inóculo definido de modo que cada camundongo e cãozinho recebesse 0,5 ml da suspensão contendo  $10^5$  oocistos esporulados de *C. ohioensis*.

Cinco camundongos foram inoculados com  $10^5$  oocistos de *C. ohioensis*. Estes foram sacrificados aos 60 dias após inoculação (DAI), sendo seus órgãos triturados com ajuda de um mixer (Braun Handblender MR 310- Brasil), homogeneizado em solução 0,9% salina, e divididos em volumes iguais.

Os seis filhotes selecionados foram divididos em três grupos aleatoriamente, constituídos de dois filhotes cada. O primeiro grupo foi infectado por via oral, com homogeneizado de órgão de camundongos contendo hipnozoítas, o segundo

com  $10^5$  oocistos esporulados, por via oral e o terceiro grupo serviu como controle. Os oocistos recuperados nas fezes destes filhotes foram quantificados diariamente pela Técnica de Centrífugo-Flutuação, com pequena modificação descrita a seguir. A quantidade individual de fezes eliminada diariamente foi coletada, pesada e homogeneizada, sendo retirado um grama, colocado em um frasco de Erlenmayer de 125ml, adicionando-se 100ml de água destilada e misturados, obtendo-se uma suspensão, de onde foram retirados 10ml que foram colocados em tubo de Centrífuga de 15ml e centrifugado por cinco minutos a 200 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10ml de solução saturada de açúcar, seguida de nova centrifugação por 5min a 200 x g. Após a centrifugação o tubo de centrífuga foi preenchido com solução saturada de açúcar até a formação de um menisco onde foi sobreposta uma lamínula, e deixada por 10 minutos. A lamínula foi retirada e colocada sobre lâmina e observada ao microscópio. O total de oocistos presentes entre lâmina e lamínula foi multiplicado por 10, para se obter o número de oocistos por grama de fezes (OoPG). O total de oocistos eliminados pelos cães diariamente foi calculado multiplicando-se o OoPG pelo total do peso em gramas das fezes coletadas diariamente.

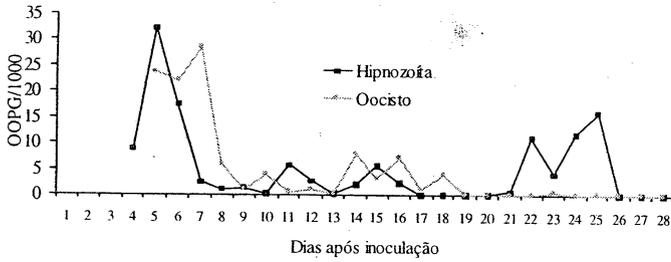
Os oocistos coletados, diariamente, dos dois grupos, foram acondicionados em dois frascos e a seguir adicionado bicromato de potássio 2,5% em dois frascos limpos, deixando-os esporular à temperatura ambiente. A aceleração da esporulação se deu com auxílio de uma bomba de aquário, seguida de armazenamento à temperatura de refrigeração para uso posterior. Do material de ambos os grupos foi retirada alíquota de 10ml e feitas dez mensurações dos diâmetros maior (DM) e menor (dm) dos oocistos esporulados e dos esporocistos obtidos a cada dia de eliminação. Para isso foi utilizado um microscópio biocular H. M. Lutz/ Leitz, com ocular micrométrica PZO-K15X. O índice morfológico foi calculado, tanto para os oocistos esporulados quanto para os esporocistos.

As médias, desvio-padrão e o Teste t de Student foram utilizados nos dados obtidos, conforme o programa Graph Pad Instat™, Copyright 1990-1994, Graf Pad Software v2-05 a 9504225.

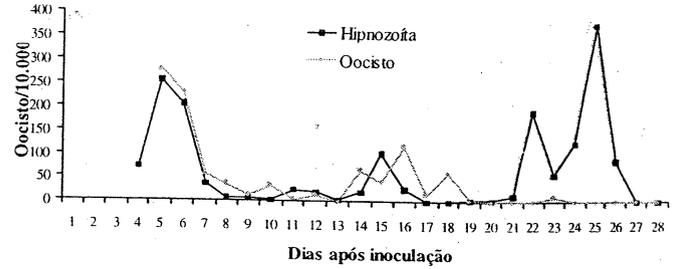
## Resultados e discussão

Os cães do grupo Hipnozoíta (GH) e os do grupo Esporozoíta (GE), eliminaram oocistos nas fezes no 4º e 5º DAI, respectivamente (Figura 1). Rocha, Lopes (1971) observaram um período pré-patente em cães inoculados com oocistos esporulados de 3 a 7 dias. Além disso, achados semelhantes a estes resultados foram observados por Dubey (1977), tanto para infecção com hipnozoítas quanto para esporozoítas, sugerindo uma distinção biológica entre as duas formas de infecção do parasita Dubey (1992).

O número de oocistos eliminados por grama de fezes (OoPG) diariamente pelos cães dos GH e GE foram semelhantes até o 21º DAI, quando os animais do GH tiveram um novo aumento de oocistos eliminados (Figura 1). Os animais deste grupo tiveram eliminação média máxima diária no 25º DAI de  $3,7 \times 10^6$  e eliminaram oocistos em suas fezes até o 27º DAI, diferindo dos animais do GE, que tiveram eliminação média máxima diária no 5º DAI de  $2,7 \times 10^6$  OoPG e eliminaram oocistos



**Figura 1:** Eliminação média diária de oocistos por grama de fezes dividido por 1.000 (OOPG/1000) dos cães inoculados por via oral com vísceras de camundongos, previamente infectados com 100.000 oocistos esporulados de *Cystoisospora ohioensis* (Hipnozoítas) e inoculados por via oral com 100.000 oocistos esporulados de *C. ohioensis* (Oocisto).

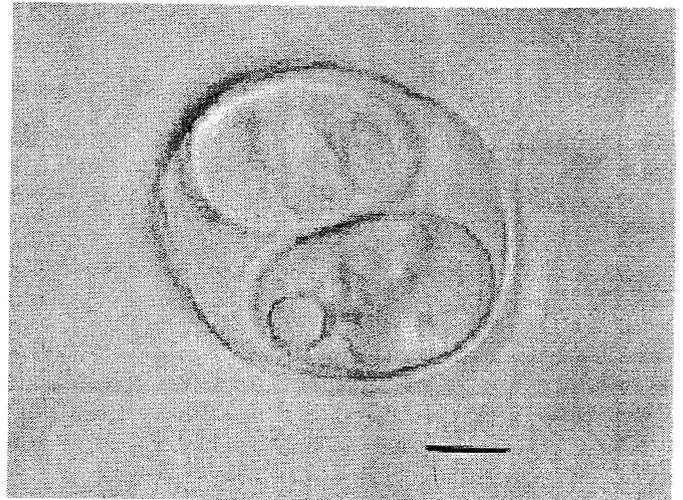


**Figura 2:** Eliminação média diária total de oocistos dividido por 10.000 dos cães inoculados, via oral, com vísceras de camundongos, previamente infectados com 100.000 oocistos esporulados de *Cystoisospora ohioensis* (Hipnozoítas) e inoculado por via oral com 100.000 oocistos esporulados de *C. ohioensis* (Oocisto).

até o 23º DAI (Figura 2). A patência de *C. ohioensis* pode variar de 13 a 23 dias de acordo com Mahrt (1966) e Dubey (1975). No entanto, estudos comparativos da patência induzida pelas duas formas de infecção não foram encontrados na literatura consultada. Fica evidente, portanto, que os animais que foram inoculados com hipnozoítas (GH) tiveram um período pré-patente menor, eliminaram um maior número de oocistos e apresentaram uma patência maior, reforçando a hipótese de serem distintos biologicamente os dois estágios do parasita como foi sugerido por Dubey, 1992.

Os oocistos de *C. ohioensis* recuperados dos cães do grupo que foi inoculado com vísceras de camundongos infectados, previamente, com 10<sup>5</sup> oocistos esporulados (GH) e do grupo que foi inoculado com 10<sup>5</sup> oocistos esporulados (GE) tiveram as médias de 100 oocistos DM de 26,40 ± 1,69 e dm de 24,47 ± 1,36 µm e DM 25,28 ± 2,12 e dm de 23,32 ± 2,18 µm respectivamente (Tabela 1). As medidas do DM dos oocistos do GH foram maiores (P < 0,05) que as do GE e as medidas do dm para os mesmos grupos não foram significantes (P > 0,05) (Tabela 1). Não foram ainda observadas diferenças (p > 0,05) para os DM e dm dos esporozoítas medidos, comparando-se as duas formas de infecção (Tabela 1). Estas medidas correspondem às medidas dos oocistos de *C. ohioensis* observadas por Rocha, Lopes (1971), Dubey (1975) e Dubey (1992).

O IM para as medidas dos oocistos e esporocistos recuperados dos GH e GE foram semelhantes (Tabela 1). Em que pese a aparente diferença morfológica dos DM dos oocistos eliminados pelos cães dos grupos pesquisados, estas não foram suficientes para modificar a forma subsférica a ovóide de *C. ohioensis* conforme as observações prévias de Rocha, Lopes (1971) (Figura 3).



**Figura 3:** *Cystoisospora ohioensis*, solução saturada de açúcar (— = 5µm). Oocisto esporulado.

**Tabela 1:** Dimensões dos diâmetros dos oocistos, esporocistos e do respectivo índice morfométrico em uma infecção experimental por *Cystoisospora ohioensis* em cães.

FORMAS <sup>a</sup>	GH <sup>b</sup>			GE <sup>c</sup>		
	DIÂMETROS (µm)		ÍNDICE MORFOMÉTRICO	DIÂMETROS (µm)		ÍNDICE MORFOMÉTRICO
	MAIOR	MENOR		MAIOR	MENOR	
Oocisto	26,40±1,69	24,47±1,36 <sup>d</sup>	1,08±0,04	25,28±2,12	23,32±2,18	1,08±0,06
Esporocisto	18,97±1,77	12,00±1,45	1,59±0,17	18,02±1,91	11,59±1,57	1,57±0,12

<sup>a</sup>Número de formas medidas=100.

<sup>b</sup>Animais inoculados, via oral, com vísceras de camundongos, previamente, infectados com 10<sup>5</sup> oocistos esporulados de *C. ohioensis*.

<sup>c</sup>Animais inoculados, via oral com 10<sup>5</sup> oocistos esporulados de *C. ohioensis*.

<sup>d</sup>(p < 0,05)

**Conclusões**

- As duas formas infectantes de *C. ohioensis* tiveram diferenças biológicas quanto a infecção experimental em cães, sugerindo ser a via de infecção por carnivorismo, mais importante no ciclo do parasito estudado.
- O aparente pleomorfismo observado nos DM dos oocistos eliminados pelos cães, infectados seja com hipnozoítas ou esporozoítas, estão mais relacionados com as vias de infecção do parasito do que numa possível variante da espécie estudada.

**Referências**

- ALVES, C. *Diarréias*. <http://páginas.teleweb>. p.1, 2000.
- DUBEY, J. P. *Isoospora ohioensis* sp. n. proposed for *I. rivolta* of the dog. *J.Parasitol.*, v. 61, p. 462-465, 1975.
- DUBEY, J. P. Pathogenicity of *Isoospora ohioensis* in dogs. *Parasitology* v. 77, p.1-11, 1978
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis* and other tissue cystis-forming coccidia of man and animals. In: KREIER, J.P. (Ed.) *Parasitic Protozoa*. p. 101-237. New York: Academic Press, 1977.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Neospora, Besnoitia, Sarcocystis* and other tissue cystis-forming coccidia of man and animals. In: KREIER J.P. (Ed.). *Parasitic Protozoa*, New York: Academic Press, p. 120-128, 1992.
- GEORGI, J.R., GEORGI, M.E. *Canine Clinical Parasitology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 75-100, 1992.
- GREENE, C.E. *Enfermedades infecciosas perros y gatos*. México: Interamericana, 1020 p., 1993.
- LEVINE, N.D. (Ed.). *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press, Ames, 414 p., 1985.
- LOSS, Z.G., LOPES, C.W.G. Alguns aspectos clínicos da infecção experimental por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1926) Frenkel, 1976 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em gatos. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J.*, v. 15, p. 79-84, 1992.
- MAHRT, J. L. *Life cycle of Isoospora rivolta* (Grassi, 1979), Wenyon, 1923, in the dog. Ph.D Thesis, University of Illinois, Urbana, 1966.
- ROCHA, E.M., LOPES, C.W.G. Comportamento da *Isoospora canis, Isoospora felis* e *Isoospora rivolta* em infecções experimentais em cães e gatos. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J.* v. 1, p. 65-70, 1971.
- SMITH, D. D. The Sarcocystidae: *Sarcocystis, Frenkelia, Toxoplasma, Besnoitia, Hammondia*, and *Cystoisospora*. *J. Protozool.*, v. 28, p. 262-266, 1981.