

AVALIAÇÃO DO PARASITISMO POR *CYSTOISOSPORA FELIS* (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977 (APICOMPLEXA: CYSTOISOSPORINAE) EM COELHOS TIPO CARNE.

P. S. DA COSTA¹ & C. W. G. LOPES².

(1) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Vital Brazil, 24230-340 Niterói, RJ e Serviço de Inspeção Federal, Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária; (2) Departamento de Parasitologia Animal, IB, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 Km-07, 23.890-000 Seropédica, RJ, Brasil.

SUMÁRIO: Vinte e quatro coelhos mestiços tipo carne, foram utilizados com a finalidade de se avaliar o efeito do parasitismo frente a infecção experimental por *Cystoisospora felis*. Com auxílio de uma sonda gástrica foi dado a oito coelhos, 10⁶ oocistos esporulados do parasito. Os demais coelhos foram divididos em oito controles alimentares e oito controles do experimento. Nos animais parasitados, comprovou-se a ação parasitária sobre o hospedeiro, onde se observou formas do parasito, hipnozoítas, nas placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, baço, fígado e intestinos, a partir do 2º dia após infecção. Como sinais clínicos foram caracterizados: perda de peso e inapetência na primeira semana pós-infecção, redução no rendimentos das carcaças, hipertrofia de linfonodos mesentéricos, assim como do fígado e baço foram as alterações mais importantes. Não foram observadas alterações nos animais controles.

PALAVRAS - CHAVE: *Cystoisospora felis*, coelhos, parasitismo, hipnozoíta, gato.

INTRODUÇÃO

A infecção por *Cystoisospora felis* e *C. rivolta* em felinos pode ser diagnosticada a partir da caracterização dos oocistos encontrados nas fezes, feita por WENYON (1923), quando descreveu a espécie *C. felis* como *Isoospora felis*. Também, contribuíram para o conhecimento da biologia deste parasito HITCHCOCK (1945), LICKFELD (1959) e principalmente SHAH (1971), LOSS (1984) e LOSS & LOPES (1992).

Ao descreverem o ciclo para o gênero *Cystoisospora*, DUBEY & FRENKEL (1972) e DUBEY (1979), identificaram duas possíveis formas de infecção pelas espécies *C. felis* e *C. rivolta* em felinos. Estes podem se infectar pela ingestão de oocistos esporulados ou por hospedeiros vertebrados infectados previamente com oocistos. Desta maneira, vários animais foram considerados como hospedeiros das formas extra-intestinais, cistos monozóicos, de *C. felis* e *C. rivolta*, tais como camundongos, ratos, cobaios, cães, bovinos e pássaros (FRENKEL & DUBEY, 1972; FAYER & FRENKEL,

1979; LOSS, 1991; FREIRE, 1993; HERZOG *et alii*, 1993). Além destes resultados, MARKUS (1976) denominou estas formas de hipnozoítas, mencionando também que as mesmas podem permanecer infectantes por períodos de até 15 meses.

Estudos sobre a frequência de hipnozoítas de *C. rivolta* em vísceras de camundongos experimentalmente infectados, demonstraram que estas formas estão amplamente distribuídas pelo organismo do hospedeiro infectado, excetuando o cérebro (BRÖSIGKE, 1981; BRÖSIGKE *et alii*, 1982). Ainda, os mesmos autores, consideraram que os órgãos de maior frequência para hipnozoítas seriam o fígado, baço e linfonodos mesentéricos. Além destes, as placas de Peyer também foram incluídas por FREIRE & LOPES (1996) como parasitadas por *C. felis*.

Estudos sobre a infecção experimental de camundongos por *C. felis* (LOSS & LOPES, 1992; FREIRE & LOPES, 1996), ao considerar o camundongo como hospedeiro intermediário, observaram alteração no ganho de peso do mesmo, chamando atenção para a importância que esta protozoose poderia ter. Desta maneira, este trabalho tem como objetivo contribuir ao estudo do parasitismo por *C. felis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e manutenção dos animais: Foram utilizados 54 coelhos tipo carne, de ambos os sexos, mestiços, predominando as raças Nova Zelândia Branca e Califórnia, procedentes do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, município de Seropédica - RJ, pesando em média 1.586 gramas e com 58 dias de idade.

Os coelhos foram alojados e mantidos em gaiolas suspensas, higienizadas diariamente, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

O experimento foi realizado nas dependências do Projeto Sanidade Animal (EMBRAPA-UFRRJ).

Obtenção de inóculo: Oocistos de *C. felis* foram obtidos a partir de fezes eliminadas de gatos, com idade aproximada de seis semanas, oriundos da cidade do Rio de Janeiro e mantidos à disposição dos pesquisadores.

Os gatos foram previamente vermifugados e mantidos em gaiolas metálicas. Sua alimentação consistiu de ração comercial e vísceras de camundongos infectados experimentalmente com *C. felis*. As gaiolas foram forradas com papel e as fezes recolhidas diariamente em frascos de vidro identificados e encaminhados ao laboratório.

O material fecal coletado foi pesado e aproximadamente uma parte dele foi diluído em duas partes de PBS 0,15 M, em frascos limpos, em temperatura ambiente, sob aeração de uma bomba de aquário convencional.

Após 72 horas sob aeração, uma gota da suspensão foi retirada, colocada entre lâmina e lamínula e examinada em microscópio óptico, para se estabelecer a presença de oocistos esporulados de *C. felis*. Sempre que o índice de esporulação atingisse valor superior a 80%, a suspensão fecal seria diluída em PBS e centrifugada 900 x g durante 10 minutos. Os oocistos foram recuperados, a partir da flutuação em solução saturada de açúcar, onde o sobrenadante obtido foi vertido para uma placa de Petri com 25 cm de diâmetro, sobre a qual se depositou o fundo externo de um placa de Petri de material plástico, descartável, de modo a se oferecer uma interface entre a tampa plástica e o menisco convergente da superfície da solução saturada de açúcar. A intervalos de 30 minutos, durante duas horas, removeu-se a placa plástica para que o fundo da mesma fosse lavado com PBS com auxílio de uma seringa de 10 ml acoplada a uma agulha hipodérmica. A suspensão de oocistos esporulados, obtida das lavagens com PBS, foi colocada em recipientes de vidro previamente resfriado em banho de gelo. Estes oocistos foram submetidos a nova centrifugação, seguida de ressuspensão em PBS por duas vezes consecutivas, afim de se eliminar o excesso de sacarose. O sedimento final, contendo elevada concentração de oocistos, foi ressuspensionado em pequeno volume de PBS (1 ou 2 ml).

Uma alíquota de suspensão de oocistos purificados foi diluída a 1:10 ou 1:20 e colocada em câmara de Neubauer para contagem, onde foram quantificados.

Foram realizadas cem mensurações dos diâmetros polar e equatorial dos oocistos esporulados, utilizando-se um microscópio Leitz mod. H.M. Lutz com ocular micrométrica PZO-SK. O índice morfométrico, obtido pela divisão do maior diâmetro pelo diâmetro menor, foi calculado para os oocistos esporulados.

Obtenção de hipnozoítas: Os hipnozoítas de *C. felis* foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por SHARMA & DUBEY (1981). Para isso, oito coelhos mestiços, tipo carne, pesando em média 1.586 gramas, foram inoculados por via oral com 10⁶ oocistos de *C. felis*, divididos em duas doses infectantes, administradas com intervalo de 24 horas.

Foram estabelecidos dois grupos de animais controle, cada um contendo oito coelhos. Um destes grupos foi denominado de controle alimentar, que durante toda a pesquisa recebeu a média da quantidade de ração consumida pelo grupo de coelhos inoculados com oocistos esporulados de *C. felis*.

O grupo controle recebeu ração comercial *ad libitum* e foram inoculados oralmente com 2 ml de PBS, solução utilizada como veículo dos oocistos esporulados de *C. felis*.

Um coelho de cada grupo experimental, foi sacrificado por corte dos grandes vasos da região cervical.

Os abates foram realizados nos dias 2^o, 4^o, 6^o, 8^o, 9^o, 16^o, 22^o e 29^o após a infecção (DAI).

Os hipnozoítas foram obtidos através da digestão péptica de fígado, baço, linfonodo mesentérico, placa de Peyer e intestinos, não tendo sido observados nos pulmões, rins, cérebro e músculos.

As vísceras foram cuidadosamente cortadas em pequenos fragmentos e acondicionadas em frascos de vidro estéreis previamente resfriados em banho de gelo, nos quais adicionou-se solução enzimática (5,2 mg.ml⁻¹ de pepsina Sigma, com atividade de ensaio de 1:10.000, 10 mg.ml⁻¹ de NaCl e HCl a 1,4% em água destilada). Os homogeneizados resultantes foram incubados à 37°C durante 30 minutos.

Os hipnozoítas foram obtidos pela filtração dos órgãos digeridos, previamente neutralizadas pela adição de PBS a 4°C, seguida de três filtrações consecutivas, em gaze dupla, com o intuito de se retirar os restos celulares aderidos aos protozoários. Os digeridos foram concentrados em centrifuga (600 x g/4°C/15 minutos) e ressuspensos em PBS (0,5 a 1,0 ml).

O número de hipnozoítas por órgão infectado foi estabelecido de acordo com a metodologia descrita por BRÖSIGKE (1981) para *C. rivolta*, com ligeiras modificações.

Alíquotas de 10 ou 25 microlitros de suspensão dos órgãos pesquisados foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio tri-ocular de contraste de fase,

modelo Jenaval, Zeiss Jena. O número de hipnozoítas foi obtido pela seguinte fórmula:

$$N = n \times d \times v,$$

onde "n" é o número de hipnozoítas obtidos na alíquota de 10 ou 25 microlitros, "d" é a correção para 1.000 microlitros e "v" o volume total da amostra do órgão digerido.

A morfometria dos hipnozoítas, foi realizada em microscópio modelo H. M. Lux, Leitz, com auxílio de ocular micrométrica PZO-SK, Polônia, como descrito anteriormente para medições dos oocistos. Para facilitar as mensurações, hipnozoítas foram fixados em solução a 25% de glutaraldeído que impediu a movimentação e manteve a forma original dos parasitos por um período de tempo maior (FREIRE, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os oocistos de *C. felis* obtidos e utilizados no experimento, caracterizam-se pela morfologia piriforme típica, dentro das seguintes dimensões $36,12 \pm 3,00 \times 25,59 \pm 2,5 \mu\text{m}$, com índice morfométrico de $1,33 \pm 0,58$. Estes oocistos foram oriundos de gatos com 6 semanas de vida, e com medidas semelhantes às observadas por FREIRE (1993).

Os hipnozoítas caracterizaram-se pela forma elipsóide, em formato comparado ao de uma banana, obtidos a partir de digestão péptica de vísceras de coelhos mestiços tipo carne, infectados oralmente. A média total das medidas realizadas nos diferentes dias após infecção foi de $14,51 \pm 2,40 \times 4,77 \pm 1,50 \mu\text{m}$, com um índice morfométrico de 3,04 (Tabela 1).

Tabela 1 - Medidas de hipnozoítas de *C. felis* em linfonodos mesentéricos, obtidos de coelhos mestiços do tipo carne, submetidos à digestão péptica, após diferentes intervalos a partir de infecção experimental com 10^6 oocistos esporulados, por via oral.

Dias após infecção	Diâmetro (μm)		Índice Morfométrico	Número de formas medidas
	Maior	Menor		
2	ND	ND	ND	ND
4	14,94	4,97	3,01	10
6	15,44	5,42	2,85	33
8	14,81	4,52	3,21	10
9	14,89	4,77	3,12	10
15	14,20	4,35	3,25	9
22	13,27	4,28	3,10	9
29	13,51	4,49	3,01	7
$\bar{X} \pm S_{(8)}$	$14,44 \pm 0,80$	$4,70 \pm 0,40$	$3,07 \pm 0,13$	88

ND= Não determinado

Comparando-se estes resultados com os dados apresentados por FREIRE (1993) ao estudar a infecção experimental de camundongos albinos com a mesma espécie ora estudada, verifica-se diferença expressiva nas medidas dos diâmetros polar e equatorial, ou seja, valores menores nos coelhos infectados, porém, maior índice morfométrico.

Os valores observados também são menores que os encontrados por BRÖSIGKE (1981) para a espécie *C. rivolta*, embora o índice morfométrico tenha sido, no nosso caso, superior àquele encontrado pela autora em questão.

Os coelhos mestiços tipo carne, inoculados com 10^6 oocistos de *C. felis*, quando comparados com os animais do sistema de controle, com alimentação *ad libitum*, tiveram comprometidos seus ganhos de peso durante os 29 dias de avaliação do ganho ponderal, isto talvez devido à anorexia que se seguiu à infecção, fato já mencionado por LOSS (1991).

De outro modo, ao compará-los com o grupo de animais que receberam alimentação controlada, verificou-se que, em realidade, a perda no ganho de peso dos animais inoculados manifestou-se somente nas três primeiras semanas do experimento, superando-se na última semana.

A perda no ganho de peso, relativa unicamente ao parasitismo, parece ser temporária e está relacionada com a evolução das formas infectantes, esporozoítas, para a conseqüente instalação de hipnozoítas extra-intestinais, com comprometimento de órgãos importantes como o fígado, baço e intestinos.

Estes dados, referentes à perda de peso dos animais inoculados, estão em concordância com os achados de LOSS & LOPES (1992) e FREIRE (1993) ao trabalharem com camundongos albinos, diferindo apenas quanto aos valores encontrados, devido às diferenças das espécies estudadas, sendo as diferenças de ganhos de pesos expressivas, principalmente na primeira semana após a infecção dos animais.

O número de hipnozoítas obtidos através de digestão péptica de vísceras de coelhos mestiços tipo carne, infectados com 10^6 oocistos de *C. felis*, foi expressivo na primeira semana após infecção, e em sentido decrescente, até ao 8º DAI; atingiu valor máximo no 2º DAI, cerca de $5,6 \times 10^4$; $5,5 \times 10^4$ no 4º DAI e $4,0 \times 10^4$ no 6º DAI, sendo que o número final encontrado, foi $2,8 \times 10^3$ hipnozoítas no 29º DAI, coincidindo com o final do experimento.

A distribuição de hipnozoítas nas vísceras de coelhos inoculados, caracterizou, em ordem decrescente, um tropismo pelos intestinos, linfonodos mesentéricos, fígado, baço e placas de Peyer, conforme se observa na Tabela 2.

No 2º DAI, as vísceras que tinham maiores quantidades de hipnozoítas foram os intestinos, considerando-se que foram digeridos em conjunto os fragmentos dos intestinos delgado e grosso, além de raspados das respectivas mucosas (60,70%). Esta proporção continuou alta até ao 8º DAI, decaindo a seguir. Estes resultados não foram encontrados por BRÖSIGKE (1981) e FREIRE (1993), ao quantificarem hipnozoítas de *C. rivolta* e

Tabela 2 - Número de hipnozoítas quantificados em vísceras de coelhos tipo carne, inoculados com 10^6 oocistos esporulados de *Cystoisospora felis* por via oral.

DAI	Número de hipnozoítas/ vísceras ^a					Total
	Intestinos	Linfonodos mesentéricos	Fígados	Baço	Placas de Peyer	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	34.375 (60,70) ^b	2.291 (4,05)	16.807 (29,68)	2.618 (4,62)	536 (0,95)	56.627 (29,25)
4	29.316 (52,63)	10.853 (19,48)	9.396 (16,87)	4.964 (8,91)	1.171 (2,11)	55.700 (28,77)
6	22.628 (55,83)	13.478 (33,25)	1.117 (2,76)	913 (2,25)	2.396 (5,91)	40.532 (20,94)
8	13.559 (58,53)	9.055 (39,09)	366 (1,58)	128 (0,56)	56 (0,24)	23.164 (11,97)
9	646 (16,02)	1.817 (45,05)	834 (20,68)	680 (16,86)	56 (1,39)	4.033 (2,08)
16	1.220 (22,53)	2.664 (49,19)	1.044 (19,28)	316 (5,83)	172 (3,17)	5.416 (2,80)
22	357 (6,78)	1.026 (19,48)	3.125 (59,32)	518 (9,83)	242 (4,59)	5.268 (2,72)
29	510 (17,96)	404 (14,22)	1.180 (41,55)	485 (17,08)	261 (9,19)	2.840 (1,47)
Total	102.611 (53,00)	41.588 (21,48)	33.869 (17,50)	10.622 (5,49)	4.890 (2,53)	193.580 (100,00)

DAI - Dias após infecção

ND - Não determinados

^a Os resultados indicam os números de hipnozoítas encontrados em cada coelho inoculado para cada dia do experimento.

^b Percentual de hipnozoítas em cada dia de avaliação.

C. felis, respectivamente, quando utilizaram camundongos albinos como modelo experimental.

Os linfonodos mesentéricos foram a segunda localização preferencial dos hipnozoítas de *C. felis*, em proporção alta a partir do 4º DPI até à segunda semana do experimento (Tabela 2), sendo semelhantes aos dados de BRÖSIGKE (1981) para *C. rivolta* e FREIRE (1993) para *C. felis*, quando estudaram o processo em camundongos.

O fígado, por sua vez, teve a maior proporção de formas parasitárias no 2º e 4º DAI, porém, diferentes dos encontrados por FREIRE (1993) em camundongos, que as observou em maior proporção a partir do 21º DAI. Os resultados obtidos em coelhos foram semelhantes aos dados de BRÖSIGKE (1981) para *C. rivolta* em camundongos, onde foi observado a predileção deste parasito pelo fígado no 3º e 7º DAI. Porém, as maiores quantidades de hipnozoítas de *C. felis* foram encontradas nos coelhos no 2º e 4º DAI.

Quanto ao baço, a maior quantidade do parasito foi encontrada na primeira semana da infecção, semelhantemente ao que se observou no fígado, somente invertendo-se o dia, pois no caso do baço, prevaleceu o 4º DAI.

A presença de hipnozoítas nas placas de Peyer dos coelhos, durante todo o experimento, teve número máximo no 4º e 6º DAI, prevalecendo maior quantidade neste último. Estes dados coincidiram com os encontrados por FREIRE (1993) ao estudar este parasito em camundongos albinos, onde esta localização preponderou do 3º até ao 6º DAI, diferenciando apenas quanto as espécies estudadas.

SUMMARY

Twenty four rabbits for meat production were used to study the effect of an experimental infection by *Cystoisospora felis*. By means of a gastric tube, 10^6 sporulated oocysts of *C. felis* were given to eight rabbits. Other 16 rabbits were used as controls, being either as pair fed, and the other eight as experimental controls. In the infected animals, the parasitism over the intermediated host was confirmed, where infective forms, hypnozoites, were recovered from Peyer's patches, lymph nodes, spleen, liver, and intestines, after the 2nd day after infection. Progressive loss of body weight and inapetence in the first week of infection, were the main clinical signs. Reduction in the carcasses, yield hypertrophy of lymph nodes, liver, and spleen were considered the most prominent changes and lesions at necropsy. Neither clinical signs nor pathologic lesions were observed in the control.

KEY WORDS: *Cystoisospora felis*, rabbits, parasitism, hypnozoites, cat.

REFERÊNCIAS

- BRÖSIGKE, S. (1981). Untersuchungen an extraintestinalen entwicklungsstadien (Dormozoitien) von *Cystoisospora rivolta* der katza in der Maus. Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen, München, 37p.

- BRÖSIGKE, S.; HEINE, J. & BOCH, J. (1982). Der Nachweis extraintestinalen Entwicklungsstadien (Dormozoitien) in experimentellen mit *Cystoisospora rivolta* oozysten infizierten Mäusen. *Kleintier- Praxis*, 27: 25-34.
- DUBEY, J.P. (1979). Life cycle of *Isospora rivolta* (Grassi, 1897) in cats and mice. *Journal of Protozoology*, 26: 433-442.
- DUBEY, J.P. & FRENKEL, J.K. (1972). Extraintestinal stages of *Isospora felis* and *Isospora rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. *Journal of Protozoology*, 19: 89-92.
- FAYER, R. & FRENKEL, J.K. (1979). Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidia: *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma*. *Journal of Parasitology*, 65: 756-762.
- FREIRE, R.B. (1993). *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae): caracterização, infecção experimental e resposta imune em camundongos albinos. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 110 p.
- FREIRE, R.B. & LOPES, C.W.G. (1995). Avaliação da digestão enzimática por pepsina e tripsina na obtenção de hipnozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 4: 21-23.
- FRENKEL, J.K. & DUBEY, J.P. (1972). Rodents as vectors for feline coccidia, *Isospora felis* and *Isospora rivolta*. *Journal of Infectious Diseases*, 125: 69-72.
- HERZOG, J.D.; COSTA, P.S. da; FREIRE, R.B.; SOUZA, A.L.G. de & FLAUSINO, W. (1993). Infecção por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae) em cobaias. VIII Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Londrina, Resumo expandido, p. 12.
- HITCHCOCK, D.J. (1955). The life cycle of *Isospora felis* in the kitten. *Journal of Parasitology*, 41: 388-397.
- LICKFELD, K. G. (1959). Untersuchungen über das katzencoccid *Isospora felis* Wenyon, 1923. *Archiv für Protistenkunde*, 103: 427-456. 1959.
- LOSS, Z.G. (1984). Biologia e patologia da *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae) em felinos. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 56 p., 1984
- LOSS, Z.G. (1991). Cistoisoporose felina. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 104 p.
- LOSS, Z.G. & LOPES, C.W.G. (1992). Efeito da infecção experimental por *Cystoisospora felis* (Apicomplexa: Cystoisosporinae) no ganho de peso de camundongos. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 15: 109-111.
- MARKUS, M. B. (1976). A term for extraintestinal stages of mammalian *Isospora* (Protozoa, Coccidia, Eimeriidae). *South Africa Journal of Science*, 72: 220.
- SHAH, H. L. (1971). The life cycle of *Isospora felis* Wenyon, 1923, a coccidium of the cat. *Journal of Protozoology*, 18: 3-7.
- SHARMA, S. P. & DUBEY, J.P. (1981). Quantitative survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in pepsin and trypsin solutions. *American Journal of Veterinary Research*, 42: 128-130.
- WENYON, C.M. (1923). Coccidiosis of cats and dogs, the status of *Isospora* of men. *Annals Tropical Medicine and Parasitology*, 17: 231-288.

(Received 20 August 1997, Accepted 5 December 1997)