

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Isospora canis*
NEMESÉRI, 1959 (SIN. *Cystoisospora canis*), EM CÃES**

**EXPERIMENTAL INFECTION WITH *Isospora canis*
NEMESÉRI, 1959 (SIN. *Cystoisospora canis*), IN DOGS**

Andressa Karina Piacenti

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO/ 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Isospora canis*
NEMESÉRI, 1959 (SIN. *Cystoisospora canis*), EM CÃES**

**EXPERIMENTAL INFECTION WITH *Isospora canis*
NEMESÉRI, 1959 (SIN. *Cystoisospora canis*), IN DOGS**

Andressa Karina Piacenti

Orientador: Prof. Dr. Fernando Paiva

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2008**

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve...e a vida é muita para ser insignificante.”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eduardo e Angelina,

"Foi o tempo que dedicaste a tua rosa que fez tua rosa tão importante"

(Antonie de Saint-Exupéry)

Ao meu amor, Marcello,

"Ser profundamente amado por alguém nos dá força;

Amar alguém profundamente nos dá coragem"

(Lao-Tsé)

In memoriam de minha querida avó Marina

por tantos ensinamentos, palavras de conforto e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que se faz presente em todos os momentos.

Aos meu pais, **Angelo Eduardo Piacenti** e **Angelina Clemente Piacenti**, pela oportunidade de estudar, por todo esforço, sacrifício, amor e dedicação.

Ao meu marido **Marcello Takaki Amaral**, por todas as palavras de incentivo, amor e compreensão.

Às minhas irmãs **Adriana Cristina Piacenti** e **Patrícia Veruska Piacenti Botini**, por todo o carinho e companheirismo.

Aos meus afilhados **Clara Piacenti** e **Cauê Piacenti Botini**, pelos incontáveis momentos de descontração e alegria.

À minha amiga **Tarcilla Corrente Borghesan**, pelo apoio incondicional e pelas infinitas demonstrações de amizade.

À minha amiga **Jaqueline Moreira da Silva**, pela valiosa amizade e grande ajuda na execução deste trabalho.

À amiga **Thaís de Andrade Farias**, pelo incentivo e amizade dedicada.

À amiga **Silvia Roberta Cieslak**, pelo apoio e ajuda nas coletas.

À **Ana Carolina Aniz**, pelo apoio na realização prática deste trabalho.

Aos amigos de laboratório **José Bráz de Menezes** e **Átilla Gomes**, pela colaboração e momentos de descontração.

Aos pesquisadores e professores **Dr. Renato Andreotti**, **Dr. Ricardo Antonio do Amaral de Lemos** e **Dra. Karine Bonucielli Brum**, pela prestatividade e importante colaboração neste trabalho.

Ao meu orientador **Dr. Fernando Paiva**, pela valiosa orientação, dedicação e confiança depositada.

Aos meus colegas de graduação e pós-graduação, pelos anos maravilhosos que me proporcionaram.

SUMÁRIO

	"Página"
1 INTRODUÇÃO	02
1.1 Histórico.....	02
1.2 Estrutura.....	03
1.2.1 Oocistos.....	04
1.2.2 Esquizontes.....	04
1.2.3 Gamontes.....	04
1.3 Ciclo de vida.....	05
1.3.1 Esporogonia.....	05
1.3.2 Excistação.....	05
1.3.3 Desenvolvimento endógeno.....	06
1.3.4 Estágios extraintestinais.....	07
1.4 Epidemiologia.....	08
1.5 Sinais clínicos da Isosporose.....	09
1.5.1 Cães.....	09
1.5.2 Gatos.....	10
1.5.3 Roedores.....	10
1.6 Diagnóstico.....	10
1.6.1 Exame de fezes.....	10
1.6.2 Exame histopatológico.....	10
1.6.3 Isolamento <i>in vivo</i>	11
1.6.4 Isolamento <i>in vitro</i>	11
1.7 Imunidade.....	11
1.8 Tratamento.....	12
1.9 Controle e Prevenção.....	12
2 PERSPECTIVAS	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
4 ANEXO	21

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Isospora* apresenta várias espécies em uma ampla variedade de hospedeiros, sendo mais frequentemente encontradas infectando o trato intestinal de cães e gatos. São parasitas intracelulares obrigatórios do filo Apicomplexa, classe Esporozoa, ordem Eucoccidida, família Eimeridae (URQUHART et al., 1998). Os membros desse gênero completam seu ciclo em um único hospedeiro e podem, excepcionalmente, utilizar um hospedeiro paratênico como ratos, camundongos e hamsters (DUBEY & GREENE, 2006).

Estas espécies podem causar infecções severas em humanos, suínos e cães. Quatro delas são descritas em cães: *I. canis*, *I. ohioensis*, *I. burrowsi* e *I. neorivolta*, identificadas pelo tamanho de seus oocistos (BUEHL et al., 2006).

Alguns animais domésticos utilizados para o consumo humano, tais como: bovinos e coelhos, podem conter em suas vísceras, formas císticas das espécies do gênero *Isospora*. No entanto, é pouco conhecida a ação do parasita no desenvolvimento destes animais; se causam ou não lesões importantes ou mesmo se interferem no ganho de peso. Ressaltando que essas criações têm como propósito econômico o atendimento da demanda por carnes e vísceras comestíveis (OLIVEIRA et al., 2002).

A isosporose canina tem ampla distribuição geográfica, com maior incidência em cães jovens. A contaminação ocorre pela ingestão de oocistos esporulados ou cistos monozóicos nos hospedeiros paratênicos, podendo causar diarreia, perda de peso, lesões intestinais e, em alguns casos, a morte desses animais (CONBOY, 1998).

Animais que tenham sido submetidos, ao longo de suas vidas, à condições inadequadas de criação ou condições higiênico-sanitária precárias, dificilmente terão essa parasitose controlada (RODRIGUES, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento de oocistos de *Isospora canis* em cães naturalmente infectados, oriundos da área urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul e a indução de infecções com esse parasita em grupos de cães jovens, criados em isolamento, observando o desenvolvimento da infecção e os aspectos da patogenia/patologia deste parasita nos hospedeiros experimentais.

1.1 Histórico

A primeira espécie do gênero, *Isospora rivolta*, foi descrita por Grassi (1879), em gatos. Wenyon (1923), revisou o grupo e registrou a presença do mesmo parasita em cães.

Isospora canivelocis (WEIDMAN, 1915) Wenyon, 1923, foi a primeira espécie descrita em canídeos, encontrada em fezes de raposas.

Infecções experimentais foram realizadas por Nemeséri (1959), para estudos dos estágios endógenos do parasita, tendo concluído tratar-se de *I. canis* e não *I. rivolta*, pois esta espécie apresentava o cão como hospedeiro definitivo. Dubey (1975), baseado em infecções experimentais com oocistos originários de cães e gatos, válida a *I. rivolta*, como parasita de felídeos, e propõem a distinção em dois grupos para aquelas parasitas de cães: *I. ohioensis* e *I. canis*. Posteriormente, Dubey & Marth (1978), propuseram uma nova espécie para cães, considerando estudos sobre estágios endógenos com *I. ohioensis*, a *I. neorivolta*.

I. burrowsi foi descrita por Trayser & Todd (1978), diferenciada de *I. ohioensis* por desenvolve-se apenas na lâmina própria dos terços finais do intestino delgado. Considerando, que *I. ohioensis* foi descrita antes de *I. burrowsi* e *I. neorivolta* e também por seus oocistos serem indistinguíveis morfológicamente, estas espécies são referidas como pertencentes ao complexo *I. ohioensis* (OLIVEIRA, 2001).

Existe uma controvérsia sobre as espécies de *Isospora* que são facultativamente heteroxenas e que formam cistos contendo um único esporozoíta (hipnozoíta) no hospedeiro intermediário. Diante deste fato, Dubey (1977) propôs que estas espécies heteroxenas fossem agrupadas em um gênero separado, o *Levineia*; porém, Frenkel (1977), propôs a criação de um novo gênero, o *Cystoisospora*. Embora as espécies de *Isospora* apresentem diferenças em seus ciclos de vida, elas são agrupadas, atualmente, em um único gênero, o *Isospora*, independente das diversas formas extraintestinais demonstradas no grupo (LONG et al., 1990).

1.2 Estrutura

O subfiló dos esporozoários é caracterizado pela presença, em determinadas fases do ciclo de vida, de estruturas celulares que formam o complexo apical, destinado à fixação e à penetração nas células dos hospedeiros (REY, 1991).

Três diferentes formas do parasita, são encontradas no ciclo de vida de *Isospora*: oocistos, liberados pelas fezes dos hospedeiros definitivos; esquizontes, na fase de reprodução assexuada, e gamontes, na fase de reprodução sexuada do parasita.

1.2.1 Oocistos

Os oocistos são ovóides, medem entre 34-42 μm x 23-36 μm (*I. canis*) e 17-27 μm x 15-24 μm (grupo *I. ohioensis*, incluindo *I. neorivolta* e *I. burrowsi*) (CONBOY, 1998), são liberados pelas fezes do hospedeiro definitivo, na forma não esporulada e tornam-se infectivos no ambiente após 3 dias, quando apresentam dois esporocistos elipsóides, de parede lisa, não apresentando corpo de *stieda*, com resíduo granular contendo glóbulos lipídicos, ocupando cerca de 1/3 do volume do esporocisto, contendo, cada um, quatro esporozoítas dispostos em paralelo e ao lado do resíduo do esporocisto (LEEP & TODD, 1974).

Os esporozoítas das espécies de *Isoospora* contêm uma ou duas inclusões de corpos cristalinos similares às partículas de beta-glicogênio, diferente das espécies de *Eimeria* que apresentam duas. Estas inclusões são perdidas no processo de conversão dos esporozoítas para o estágio de merozoítas *in vivo*, mas podem persistir em parasitas multiplicados *in vitro* (LINDSAY et al., 1997)

1.2.2 Esquizontes

Os primeiros esquizontes, que ocorrem na lâmina própria do intestino, são encontrados cerca de 72 horas após a infecção e o número de gerações no ciclo de vida é variável para cada espécie (MAHRT, 1967).

Os esquizontes maduros medem aproximadamente 21x15 μm e podem ser identificados histologicamente por sua localização, tamanho e número de merozoítas que contém. Os merozoítas dispõem-se como uma série de microorganismos em formato de meia-lua (5 a 10 μm) (URQUHART et al., 1998).

O número de merozoítas na primeira geração variam de 2-24 e 3-28 e na segunda de 3-12 e 3-22, respectivamente nas espécies *I. canis* e *I. ohioensis*. Eles medem cerca de 10 x 6 μm e apresentam núcleo na região central. A espécie *I. ohioensis* tem apenas duas gerações de esquizontes e *I. canis*, três gerações (DUBEY, 1978; LEEP & TODD, 1974).

1.2.3 Gamontes

Os merozoítas diferenciam-se em células especializadas, os gamontes ou gametócitos. Aqueles que se destinam a produzir gametas masculinos são os microgametócitos, e os que produzirão gametas femininos são os macrogametócitos. Os microgametas são menores e flagelados e os macrogametas são maiores e imóveis (REY, 1991).

Os primeiros macrogametas medem cerca de 11x 6 µm, similares à última geração de merozoítas. Maduros, os macrogametas medem entre 25 x 18 µm, são ovóides e apresentam núcleo e nucléolo. Os primeiros microgametas medem 6 x 5 µm e após divisões nucleares sucessivas, com cerca de 120 núcleos presentes, os microgametócitos maduros com 29 x 20 µm apresentam microgametas alongados e flagelados de cerca de 5 x 0,8 µm (LEEP & TODD, 1974).

1.3 Ciclo de vida

O ciclo de vida deste protozoário compreende uma fase exógena e outra endógena, podendo utilizar ou não um hospedeiro paratênico (LINDSAY et al., 1997); ele é dividido em: esporulação, excistância, infecção, esquizogonia, gametogonia e, finalmente, a formação do oocisto (URQUHART *et al.*, 1998).

1.3.1 Esporogonia

Os oocistos são liberados pelas fezes dos hospedeiros definitivos na forma não esporulada, constituídos de uma massa protoplasmática nucleada envolta por uma parede (MAHRT, 1968). A esporogonia ocorre fora do hospedeiro e depende de umidade, temperatura e oxigenação adequada. Temperaturas superiores a 40°C e inferiores a 20°C inibem a esporogonia dos oocistos (LINDSAY, 1990).

O núcleo divide-se duas vezes formando dois esporoblastos. Cada esporoblasto secreta uma parede retrátil e passa a ser denominado como esporocisto, enquanto o protoplasma em seu interior divide-se em dois esporozoítos. Quando dois esporocistos, contendo quatro esporozoítas cada, são visíveis, o oocisto é considerado esporulado (MAHRT, 1968).

1.3.2 Excistância

Os oocistos ingeridos pelos hospedeiros definitivos ou pelo hospedeiro paratênico, desencistam-se na presença da bile (DUBEY & GREENE, 2006). Diferente das espécies de *Eimeria* que respondem mais rapidamente à excistância na presença de CO₂, os oocistos de *Isospora* podem excistar ou não na presença desse gás e, os esporozoítas livres são ativados pela ação da bile ou tripsina (SPEER et al., 1973).

A excistância *in vitro* pode ser feita na presença de diferentes surfactantes associados ou não com tripsina, com os esporocistos pré-tratados com hipoclorito de sódio (FREIRE &

LOPES, 1995). A tripsina elimina as associações celulares, destruindo as células parenquimatosas e, conseqüentemente, liberando as formas infectantes dos cistos (DUBEY & FRENKEL, 1972).

1.3.3 Desenvolvimento endógeno

Após ingestão dos oocistos ou de cistos monozóicos e do processo de excitação, os esporozoítos livres invadem o intestino, penetram em células epiteliais e, diferente das espécies de *Eimeria*, usualmente não formam trofozoítos, que são células arredondadas e uninucleadas (DUBEY, 1977; LINDSAY, 1990), dando origem, após varias divisões por fissão binária, aos esquizontes constituídos por merozoítos (URQUHART *et al.*, 1998). A partir de cada merozoíto o ciclo assexuado pode se repetir, sucedendo-se as fases de crescimento e de multiplicação esquizogônica, por várias gerações, ou então, a evolução caminhar-se para um processo de reprodução sexuada, conhecido como esporogonia (REY, 1991).

A esquizogonia termina quando alguns merozoítas dão origem aos gametócitos masculinos e femininos, denominados microgametócitos e macrogametócitos, respectivamente. Os fatores responsáveis por essa mudança não são totalmente conhecidos. Os microgametócitos sofrem várias divisões formando numerosos microgametas. Os macrogametas são fertilizados por microgametas formando o zigoto (LINDSAY, 1990). Não se observa desenvolvimento até que o zigoto, também chamado de oocisto, seja liberado pelas fezes na forma não esporulada (URQUHART *et al.*, 1998).

No ciclo de vida de *I. canis*, trofozoítas arredondados, medindo de 4 à 6 µm de diâmetro, que formam a primeira geração de esquizontes, foram encontrados de 1 à 3 dias após a infecção. Em dois ou três dias, esses trofozoítas tornam-se elipsóides, medem de 6-8 x 3-5 µm e são encontrados no interior de vacúolos parasitóforos. A primeira esquizogonia termina seis dias após a inoculação e os esquizontes maduros contém cerca de 14 merozoítos, quando começa a segunda esquizogonia. Os esquizontes maduros desta segunda geração chegam a conter 12 merozoítas. O núcleo, de alguns merozoítas, começa, então, a se dividir sem deixar os esquizontes, iniciando a terceira esquizogonia sete dias após a inoculação do parasita. Esses esquizontes, de terceira geração, podem conter até 72 merozoítas. Posteriormente, esses merozoítas originam os macro e microgametas, iniciando a fase sexuada do parasita. O período pré-patente dessa infecção é de nove a onze dias (LEEP & TODD, 1974).

Trofozoítas não são encontrados no desenvolvimento de *I. ohioensis*. Na descrição do ciclo, Dubey (1978) identificou apenas duas gerações assexuadas do parasita. Segundo esse autor, em 48 horas são encontrados zoítas medindo entre 9-7 x 2,5-3 µm na superfície do epitélio intestinal. Esquizontes, de 9-19 x 6-13µm, ocorrem em 72 horas após a inoculação, apresentando de 2-8 merozoítas. O número máximo de núcleos dos zoítas é quatro nesse estágio e três no de binucleados, em cada vacúolo parasitóforo. De 96 à 120 horas são visualizados dois tipos de merozoítas nas vilosidades, sendo a medida do primeiro 9-15 x 5-9 µm e do segundo 9-12 x 2-4 µm, com merozoítas de 6-12 x 5-12 µm e de 6-8 x 1-2 µm, respectivamente. Ainda, segundo Dubey (1978), a presença de zoítas uni e multinucleados no mesmo vacúolo parasitóforo dificulta a verificação dos estágios dos merozoítas, o que o impossibilitou determinar a existência de uma terceira esquizogonia do parasita.

Porém, Mahrt (1967), relatou que a reduzida patogenicidade de *I. ohioensis* em cães jovens deve-se à ocorrência de somente uma esquizogonia na mucosa intestinal desses hospedeiros.

1.3.4 Estágios extraintestinais

Os estágios extraintestinais ocorrem em tecidos dos hospedeiros de espécies de *Isoospora* de cães e gatos e de humanos. Alguns esporozoítas podem invadir órgãos extraintestinais e, normalmente, encontram-se únicos na célula, porém algumas divisões podem ocorrer e até quinze parasitas serem observados infectando uma célula (LINDSAY et al., 1997).

Os esporozoítas nos tecidos aumentam de tamanho e permanecem encistados envoltos por um vacúolo parasitóforo, constituído de uma delgada parede cística de tecido conjuntivo, chamados de cistos monozóicos (DUBEY & MEHLHORN, 1978). Estes cistos podem ocorrer nos tecidos dos hospedeiros definitivos e paratênicos e, são assim chamados por conterem apenas um zoíta, sendo denominado de hipnozoíta. Este fato reforça a idéia da não multiplicação de parasita no hospedeiro não definitivo (DUBEY, 1992).

Nos hospedeiros intermediários, os hipnozoítas possuem maior tropismo pelos órgãos com atividade linfóide, como linfonodos mesentéricos, as placas de Peyer, baço, além do fígado (CARVALHO-FILHO et al., 2004).

Em cães e gatos esses cistos podem levar a re-infecção intestinal e a re-incidência da coccidiose entérica. A ingestão dos cistos presentes no hospedeiro paratênico leva a infecção do hospedeiro definitivo (DUBEY & GREENE, 2006).

1.4 Epidemiologia

As condições de criação podem favorecer a infecção, quando no ambiente de confinamento, a cama com densas camadas oferecem condições ideais de temperatura e umidade para esporulação dos oocistos; quando o número de animais ou a densidade por unidade de área for grande o risco de contágio é ainda maior. Embora a esporulação de oocistos possa ocorrer em dois dias, depois de sua eliminação nas fezes, este período pode ser muito mais longo no pasto. Os oocistos têm longevidade considerável e podem persistir por vários anos (URQUHART et al., 1998).

Espécimes do gênero *Isospora* são mais comumente reconhecidos infectando cães e gatos e são espécie-específicos para seus hospedeiros definitivos (DUBEY & GREENE, 2006).

A isosporose em cães é uma infecção que atinge cães em todo o mundo. A longa sobrevivência dos oocistos e sua alta habilidade de sobreviver à desinfecção mantêm a população de cães sob risco permanente (BUEHL et al., 2006).

A aglomeração e falta de higiene promovem a disseminação do parasita, podendo ocorrer surtos em canis de criação ou enfermarias de clínicas veterinárias, quando do aumento no número de nascimentos ou de animais incluídos na população por aquisição e que se apresentem infectados (RODRIGUES, 2000).

Devido ao pequeno tamanho dos oocistos, eles podem ser facilmente dispersos pelo vento, pela água ou através das roupas, sapatos e mãos de criadores ou médicos veterinários, sendo então, transportados de um local para outro, disseminando a infecção (FAYER, 1980).

Formas latentes nos tecidos dos hospedeiros paratênicos, os cistos monozóicos, podem permanecer infectantes por um longo período, sendo, então, um importante meio de dispersão do parasita (LOSS, 1991).

Estudos feitos no sul da Alemanha, com cadelas em lactação constataram que 25% delas eram positivas para alguma espécie do gênero *Isospora* (GOTHE & REICHLER, 1990). Também na Alemanha, Barutzki e Schaper (2003) demonstraram que em 2717 amostras de fezes colhidas em cães, processadas pela técnica de centrifugo-flutuação em açúcar, 8% eram positivas para *I. canis* e 17% para *I. ohioensis*.

Em Assam, na Índia, foi verificado que, de 328 exames de fezes de cães analisados, 9% apresentavam coccídios e 2% desses eram *Isospora* (TRAUB et al., 2002). Sager et. al. (2006), na Suíça, também verificaram a presença do parasita em 149 amostras (4,5%) de um total de 3289 amostras analisadas.

Prevalência maior do parasita foi encontrada em cães de rua, em Córdoba, na Espanha. Dos 1800 animais, 22% apresentavam oocistos de *Isospora* em suas fezes (MARTINEZ-MORENO et al., 2006).

Buehl e colaboradores (2006) demonstraram que 8,7%, de 3590 exames de fezes realizados em cães em Viena, na Áustria, apresentavam *Isospora*. Destes, 28,6% era *I. canis*, 53,5% *I. ohioensis* e 17,8% outras espécies. Esses autores verificaram também que, dos casos positivos para *Isospora*, 77,2% apresentavam diarreia, sendo 66,6% delas hemorrágicas.

No Brasil, amostras de fezes de 271 cães, sem evidência de diarreia, em Botucatu, São Paulo, foram examinadas e 8,49% delas apresentaram oocistos de *Isospora* (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002). Nesse estudo, proporções similares do parasita foram encontradas em animais jovens e adultos, 7,4% e 8,2% respectivamente. Porém, o contrário seria esperado já que os cães mais jovens, geralmente, se apresentam mais susceptíveis à isosporose (CONBOY, 1998).

Em Itapema, Santa Catarina, 6,2% das amostras fecais analisadas foram positivas para *Isospora*, de um total de 158 amostras fecais colhidas em cães apreendidos nos logradouros públicos, (BLAZIUS et al., 2005).

1.5 Sinais clínicos da Isosporose

1.5.1 Cães

I. canis é primariamente patogênico para cães jovens. Estudos histológicos demonstram lesões epiteliais em diferentes partes do intestino delgado, associadas ao desenvolvimento endógeno do parasita, podendo formar petéquias e ulcerações de diferentes tamanhos (BUEHL et al., 2006; MITCHELL, et al., 2007).

Infecções sem sintomas são descritas, particularmente em casos com *I. ohioensis* (DAUGSCHIES et al., 2000), porém, sinais clínicos como alterações na consistência das fezes, diarreia com sangue, dores abdominais, anemia, apatia e morte podem ocorrer em cães jovens. Alterações respiratórias e neurológicas também são reportadas (CONBOY, 1998).

Infecções causadas por *I. canis* são geralmente acompanhadas de sintomas e a patogenicidade dessa espécie é causada pelo desenvolvimento nas camadas mais profundas das paredes do intestino, diferente de *I. ohioensis* que parasitam as células da lâmina própria (DUBEY, 1978).

Sabe-se pouca coisa sobre a patogenicidade de *I. burrowsi* em cães, não causando doença clínica em animais infectados experimentalmente (LINDSAY & BLAGBURN, 1994).

1.5.2 Gatos

Os gatos positivos para *I. felis*, principalmente os animais jovens e imunodeprimidos, podem apresentar diarreia severa, perda de peso, anorexia e desidratação (DUBEY & GREENE, 2006).

Estudos experimentais apontam que *I. felis* não é patogênica para gatos com mais de um mês de idade. Apenas pequenas alterações, como congestão e erosão de enterócitos superficiais e infiltrados podem ser observados em gatos de 6-13 semanas de vida, inoculados com 1×10^5 e $1,5 \times 10^5$ oocistos esporulados (DUBEY, 1979).

1.5.3 Roedores

As espécies do gênero *Isospora* têm a capacidade de formar estágios extraintestinais em uma variedade de hospedeiros paratênicos, incluindo ratos, camundongos e hamsters (CARVALHO-FILHO et al., 2004) e não causam sinais clínicos nesses hospedeiros (DUBEY & GREENE, 2006).

A ausência de patogenicidade nos hospedeiros paratênicos pode ser decorrente de uma ação enzimática sobre as formas parasitárias, lesando-as quando ingeridas (FAYER & FRENKEL, 1979).

1.6 Diagnóstico

1.6.1 Exame de fezes

O exame utilizado para detecção de oocistos nas fezes do hospedeiro definitivo é o de Centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar ou Exame de Sheather (LEVINE & IVENS, 1965) e a identificação das espécies é feita após esporulação *in vitro* e mensuração dos oocistos (DUBEY, 1992).

1.6.2 Exame Histopatológico

Para a verificação das lesões provocadas pelo parasita e seus estágios extraintestinais utiliza-se o exame histopatológico. Fragmentos de diversos órgãos são fixados em formol a 10%, embebidas em parafina e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina ou giemsa

para visualização dos estágios endógenos do parasita (DUBEY, 1976; DUBEY & MAHRT, 1978).

O exame histopatológico, em casos positivos de *Isoospora canis*, revela mucosa atrofiada, alterações nas vilosidades, inflamação na lâmina própria do intestino e hiperplasia dos linfócitos nas placas de Peyer. O parasita é encontrado dentro de vacúolos no citoplasma das células epiteliais (MITCHELL, et al., 2007).

1.6.3 Isolamento *in vivo*

Em alguns casos, além do exame de fezes com a verificação dos oocistos após esporulação e mensuração é necessária também a bioprova ou isolamento do parasita *in vivo* com a inoculação de oocistos esporulados em roedores para a verificação de estágios endógenos do parasita.

Estudos sobre a frequência de hipnozoítas em vísceras de camundongos experimentalmente infectados com oocistos esporulados de *Isoospora*, demonstram que estas formas estão largamente distribuídas por todos os órgãos do hospedeiro infectado, sendo o fígado, baço e linfonodos mesentéricos os locais de maior incidência das formas latentes do parasita (DUBEY, 1992). Após dois dias de infecção, cistos monozóicos já podem ser observados no fígado e baço dos hospedeiros paratênicos (MEHLHORN & MARKUS, 1976).

1.6.4 Isolamento *in vitro*

Todas as espécies de *Isoospora* se desenvolvem em cultura de células (FAYER, 1972). Esporozoítas obtidos através da excitação dos oocistos são utilizados como inóculo. Esses penetram nas células hospedeiras e se dividem por endodiogenia. Em culturas primárias de células embrionárias de rim de bovinos e caninos são observados merontes binucleados e merozoítos saindo das células hospedeiras (FAYER, 1972; LINDSAY & BLAGBURN, 1987).

Estágios sexuais e oocistos não se desenvolvem em cultura de células (LINDSAY et al., 1997).

1.7 Imunidade

Após a infecção, desenvolve-se imunidade, e os estágios imunogênicos variam de acordo com a espécie, mas em geral são aqueles envolvidos com esquizogonia. O mecanismo

de resposta não é totalmente conhecido, mas supõe-se que seja uma combinação de fatores celulares e humorais (URQUHART et al., 1998).

Segundo FAYER (1980) a resistência natural ao parasita pode aumentar com a idade do hospedeiro e diminuir a produção de oocistos ou, conforme os animais envelhecem, tornam-se imunes como resultado de uma infecção natural pelos coccídeos.

1.8 Tratamento

Algumas sulfonamidas, como sulfadimetoxina, sulfadiazina, e trimetopim são utilizados no tratamento de cães. Essas drogas diminuem o período patente da infecção (KIRKPATRICK & DUBEY, 1987). Sulfadimetoxina pode ser administrada 50mg/kg de forma oral por cerca de 10 dias e combinações de ormetoprim (11mg/kg) e sulfadimetoxina (55mg/kg) durante 23 dias (LINDSAY & BLAGBURN, 1995).

Amprolium também administrado de forma oral (300 à 400mg/kg durante 5 dias ou 110 à 220 mg/kg de 7 à 12 dias) pode se utilizado no tratamento de coccidioses em cães (LINDSAY et al., 1997).

Segundo Buehl e colaboradores (2006), o tratamento com triazinone no período patente da infecção reduz, mas não elimina completamente a excreção de oocistos nas fezes.

Toltrazuril utilizado em condições experimentais tem se mostrado eficiente contra a Isosporose. Rommel et al. (1986) e Dauschies et al. (2000), demonstraram que uma única dose de toltrazuril (10 ou 20 mg/kg), elimina totalmente a excreção de oocistos em cães. Mundt et al. (2003) também comprovaram a eficácia deste tratamento em suínos experimentalmente infectados com *I. suis*.

1.9 Controle e Prevenção

Higiene e isolamento dos cães doentes são efetivos na prevenção da coccidiose, assim como a limpeza diária do local que os animais vivem, além de boa nutrição e abrigos adequados. Essas medidas poderão não erradicar, mas ajudarão no controle da infecção (RODRIGUES, 2000).

Kirkpatrick & Dubey (1987) também afirmam que a rápida destruição das fezes e dispersão dos oocistos de áreas comuns a animais, através da limpeza, reduz a concentração de oocistos no ambiente.

Comedores e bebedouros devem ser desinfetados com água fervente ou em soluções de amônia à 10%, além de se evitar o acesso dos cães aos hospedeiros intermediários (DUBEY & GREENE, 2006).

2 PERSPECTIVAS

A infecção experimental com *Isoospora canis* em cães jovens permitiu a avaliação do curso da infecção e a observação de alguns aspectos da patogenicidade causada pelo agente. Além de fornecer subsídios sobre aspectos de manejo e manutenção das instalações experimentais, pois vários aspectos desfavoráveis foram registrados.

O experimento relatado, servirá de referência e modelo para infecções experimentais futuras com espécies de *Isoospora* sp ou com outros coccídios, naqueles hospedeiros nos quais o ciclo enterogônico é observado.

A utilização das re-inoculações nesse experimento possibilitou, também, verificar que as lesões ou danos causados pelo parasita, no hospedeiro, aumentam quando das re-infecções sucessivas, o que poderá ser utilizado ou considerado em estudos sobre o assunto.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARUTSKI, D., SCHAPER, R. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. *Parasitology Research*, v.90, Supl 3, p.148-150, 2003.

BLAZIUS, R. D.; EMERICK, S.; PROPHIRO, J. S.; ROMAO, P. R.; SILVA, O. S. Occurrence of protozoa and helminthes in faecal samples of stray dogs from Itapema City, Santa Catarina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38(1), p.73-74, 2005.

BUEHL, I. E., PROSL, H., MUNDT, H. C., TICHY, A. G., JOAQUIM, A. Canine Isosporosis – Epidemiology of field and experimental infections. *Journal of veterinary medicine*, v.53, p.482-487, 2006.

CARVALHO FILHO, P. R.; MASSAD, F. V.; BEZERRA, M. M.; OLIVEIRA, F. C. R.; LOPES, C. W. G. *Cystoisospora felis* e *Cystoisospora rivolta* (Apicomplexa: Cystoisosporine) em vísceras de gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) e sua transmissão para gatos livres de coccídeos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13 (4), p. 169-172, 2004.

CONBOY, G. Canine coccidiosis. *Canadian Veterinary Journal*, v.39, p.443-444, 1998.

DAUGSCHIES, A.; MUNDT, H. C; LETKOVA, V. Toltrazuril treatment of cystoisosporosis in dogs under experimental and field conditions. *Parasitology Research*, v. 86(10), p. 797-799, 2000.

DUBEY, J. P. Experimental *Isospora canis* and *Isospora felis* infection in mice, cats, and dogs. *Journal of Protozoology*, v.22, p.416–417, 1975.

DUBEY, J. P. Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. *Nature*, v.262 p.213–214, 1976.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: DUBEY, J. P, Parasitic protozoa, vol. 3, New York, Academic Press, p.101-237, 1977.

- DUBEY, J. P. Life cycle of *Isospora ohioensis* in dogs. *Parasitology*, v.77, p.1–11. 1978.
- DUBEY, J. P. Life cycle of *Isospora rivolta* (Grassi 1879) in cats and mice. *Journal of Protozoology*, n. 26, p.433–443, 1979.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: KRIER, J. P., *Protozoa*, New York, Academic Press, p. 120–128, 1992.
- DUBEY, J. P., FRENKEL, J. K. Extra-intestinal stages of *Isospora felis* and *I. rivolta* (Protozoa: *Eimeriidae*) in cats. *Journal of Protozoology*, v.19, p. 89–92, 1972.
- DUBEY, J. P., MAHRT, J. L. *Isospora neorivolta* sp. n. from the domestic dog. *Journal of Parasitology*, v.64, p.1067–1073, 1978.
- DUBEY, J. P., MEHLHORN, H. Extraintestinal stages of *Isospora ohioensis* from dogs in mice. *Journal of Parasitology*, v.64, n.4, p.689–695, 1978.
- DUBEY, J. P., GREENE, C. E. *Enteric Coccidiosis*. In: GREENE, C.E, *Infectious Diseases of the dog and cat*, St. Louis, Missouri, Canadá, Elsevier, 3^a edição, p.775–784, 2006.
- FAYER, R. Cultivation of feline *Isospora rivolta* in mammalian cells. *Journal of Parasitology*, v. 58, p.1207–1208, 1972.
- FAYER, R. Epidemiology of protozoa infections: the coccidia. *Veterinary Parasitology*, v.6, p.75–103, 1980.
- FAYER, R.; FRENKEL, J. K. Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidia: *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis*, and *Toxoplasma*. *Journal of Parasitology*, v. 65, p. 756–762, 1979.
- FREIRE, R. B.; LOPES, C. W. *In vitro* excystation of *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4 (1), p. 15–19, 1995.

FRENKEL, J. K. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporid coccidia. *Journal of Parasitology*, v.63, p.611–628, 1977.

GRASSI, B. De protozoi parassiti e specialmente di quelli che sono nell uomo. *Gaz. Méd. Ital. Lombard.*, v. 39, p. 445, 1879.

GOTHE, R., REICHLER, I. Zur Befallshäufigkeit von Coccidien bei Hundefamilien unterschiedlicher Haltung und Rassen in Süddeutschland. *Tierärztliche Praxis.*, v.18, p. 192-197, 1990.

KIRKPATRICK, C. E.; DUBEY, J. P. Enteric coccidial infections *Isospora*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium*, *Besnoitia*, and *Hammondia*. *Veterinary Clinical North American Small Animal Practice*, v. 17, p.1405–1420, 1987.

LEEP, D. L., TODD, K. S. Life cycle of *Isospora canis*, Nemeseri, 1959, in the dog. *Journal of Protozoology*, v. 21, p.199–206., 1974.

LEVINE, N. D.; IVENS, V. *Isospora* species in the dog. *Journal of Parasitology*, v. 51, p. 859-864, 1965.

LINDSAY, D. S. *Isospora*: Infections of intestine: Biology. In: LONG, P. L., *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1990.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Development of *Isospora suis* from pigs in primary porcine and bovine cell cultures. *Veterinary Parasitology*, v. 24, p.301–304, 1987.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Biology of mammalian *Isospora*. *Parasitology Today*, v. 10(6), p. 214-220, 1994.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Practical treatment and control of infections caused by canine gastrointestinal parasites. *Veterinary Medicine*, v. 89, p.441–455, 1995.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. Biology of *Isospora* spp. from Humans, Nonhuman Primates, and Domestic Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v.10, n. 1, p.19-34, 1997.

LONG, P. L., CURRENT, W. L., UPTON, S. J. Taxonomy and Life Cycles. *In: LONG, P. L. Coccidiosis of Man and Domestic Animals*, Boca Raton, Flórida, CRC Press, 1990.

LOSS, Z.G. Cistoisoporose felina. 1991. 104p Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1991.

MAHRT, J. L. Endogenous stages of the life cycle of *Isospora rivolta* in the dog. *Journal of Protozoology*, v.14, p.754–759, 1967.

MAHRT, J. L. Sporogony of *Isospora rivolta* oocysts from the dog. *Journal of Protozoology*, v. 15, p. 308–312, 1968.

MARTINEZ-MORENO, F. J.; HERNANDEZ, S.; LOPEZ-COBOS, E.; BECERRA, C; ACOSTA, I.; MARTINEZ-MORENO, A. Estimation of canine intestinal parasites in Cordoba (Spain) and their risk to public health. *Veterinary Parasitology*, v.143, n.1, p.7-13, 2006.

MEHLHORN, H.; MARKUS, M. B. Electron microscopy of stages of *Isospora felis* of the cat in the mesenteric lymph node of the mouse. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 51, p.15–24, 1976.

MITCHELL, S. M.; ZAJAC, A. M.; CHARLES, S.; DUNCAN, R. B.; LINDSAY, D. S. *Cystoisospora canis* Nemeséri, 1959 (syn. *Isospora canis*), infections in dogs: clinical signs, pathogenesis, and reproducible clinical disease in beagle dogs fed oocysts. *Journal of Parasitology*, Apr.93(2), p.345-352, 2007.

MUNDT, H. C.; DAUGSCHIES, A.; WUSTENBERG, S.; ZIMMERMANN, M. Studies on the efficacy of toltrazuril, diclazuril and sulphadimidine against artificial infections with *Isospora suis* in piglets. *Parasitology Research*, v. 90, Supl. 3, p.160-162, 2003

NEMESÉRI, L. Adatok a kutya coccidiosisához. I. *Isospora canis*. *Magyar Allatorvosok Lapja*, v.14, p.91-92, 1959.

OLIVEIRA, F. C. R. Avaliação da infecção experimental em camundongos albinos com oocistos esporulados de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa:

Cystoisosporine) e sua transmissão ao cão doméstico. 2001.172p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

OLIVEIRA, F. C. R., LOPES, C.W.G. , MASSAD, F.V., MELO, P.S. Influência da infecção por *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel,1977 no ganho de peso de camundongos albinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.11, n.2, p.103-107, 2002.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.; AMARANTE, A. F.; FERRARI, T. B.; NUNES, L.C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 103(1-2), p.19-27, 2002.

REY, L. Os Esporozoários e as Coccidioses: Parasitologia, 2ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991.

RODRIGUES, N. A. Importância do manejo em dois sistemas de criação na infecção natural de cães por *Cystoisospora* Frenkel 1977 (Apicomplexa: *Cystoisosporine*). 2000. 52p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

ROMMEL, M.; SCHNIEDER, T.; WESTERHOFF, J.; KRAUSE, H. D.; STOYE, M. The use of toltrazuril-medicated food to prevent the development of *Isospora* and *Toxoplasma* oocysts in dogs and cats. *Symposium Biology Hungarica.*, v. 343, p.445-449, 1986.

SAGER, H.; MORET, C.S.; MULLER, N.; STAUBLI, D.; ESPOSITO, M.; SCHARES, G.; HASSIG, M.; STARK, K.; GOTTSTEIN, B. Incidence of *Neospora caninum* and other intestinal protozoan parasites in populations of Swiss dogs. *Veterinary Parasitology*, v.139, n.1-3, p.84-92, 2006.

SPEER, C. A.; HAMMOND, D. M.; J. L. MAHRT, J. L.; ROBERTS, W. L. Structure of the oocyst and oocyst walls and excystation of sporozoites of *Isospora canis*. *Journal of Parasitology.*, v. 59, p. 35–40, 1973.

TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R.C. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea-growing community in

northeastern India. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v.67, n.5, p.539-545, 2002.

TRAYSER, C. V., TODD, K. S. Life cycle of *Isospora burrowsi* sp (Protozoa: Eimeriidae) from the dog *Canis familiaris*. *American Journal Veterinary Research.*, v.39, p.95–98, 1978.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J., DUNCAN, J.L., DUNN, A.M., JENNINGS, F.W. Protozoologia Veterinária:: Parasitologia Veterinária, 2ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998.

WEIDMAN, F.D.. *Coccidium bigeminum* stiles in swift foxes (habitat western U.S.). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v.28, p. 320-324, 1915.

WENYON, C. M. Coccidiosis of cats and dogs and the status of the *Isospora* of man. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v.17,p. 231–288, 1923.

4 ANEXO

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Isospora canis* NEMESÉRI, 1959 (SIN.
Cystoisospora canis), EM CÃES**

**Andressa Karina Piacenti¹ Tarcilla Corrente Borghesan² Jaqueline Moreira da Silva²
Karine Bonucielli Brum³ Fernando Paiva³**

RESUMO

Infecções por *I. canis* são geralmente acompanhadas de sinais clínicos. Alterações na consistência das fezes, diarreia com sangue, anemia, apatia e morte podem ocorrer em cães jovens. Este trabalho teve como objetivo o isolamento de oocistos de *Isospora canis* em cães naturalmente infectados, recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, e a indução de infecções com esse parasita em grupos de cães jovens, observando os aspectos da patogenia/patologia nos hospedeiros experimentais. Foram realizados exames de fezes em 178 ninhadas, pela técnica da Centrifugo-flutuação com solução saturada de açúcar, destas 47 (26%) foram positivas para *Isospora* sp. Doze cães jovens foram selecionados; dez inoculados com $0,5 \times 10^4$ oocistos esporulados de *Isospora canis* e, destes, 4 animais foram re-inoculados após 9 dias da primeira infecção com 1×10^4 oocistos esporulados. Dois cães não inoculados foram mantidos como controle. Quando das necropsias nos dias 3, 6, 8, 15 e 19 após a inoculação observou-se pontuações hemorrágicas, hipertrofia das células caliciformes, alterações nas vilosidades e presença de formas parasitárias no estágio de macrogametócitos em todas as porções do intestino delgado.

Palavras-chave: *Isospora* sp, oocistos, patologia

ABSTRACT:-PIACENTI, A.K.; BORGHESAN,T.C; DA SILVA, J.M.; BRUM, K.B.; PAIVA,F. [Experimental infection with *Isospora canis* Nemeséri, 1959 (sin. *Cystoisospora canis*), in dogs]. Infecção experimental com *Isospora canis* Nemeséri, 1959 (sin. *Cystoisospora canis*), em cães. Infections *I. canis* are usually accompanied by clinical signs. Changes in the consistency of the faeces, diarrhea with blood, anemia, lethargy and death may occur in young dogs. This study aimed to the isolation of *Isospora canis* from naturally infected dogs, collected by the Center of Zoonoses Control of the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, and induce infection with this parasite in groups of young dogs, observing aspects of pathogenicity/pathology of this parasite in the experimental host. Faeces samples from 178 litters were examined using the Centrifugo-fluctuation in saturated solution of sugar technique, 47 (26%) of them were positive for *I. canis*. Twelve young puppies were

selected; ten were inoculated with $0,5 \times 10^4$ sporulated oocysts of *Isospora canis* and, 4 animals were re-inoculated after 9 days from the first infection with 1×10^4 oocysts. Two dogs were kept as control. When the necropsies occurred on days 3, 6, 8, 15 and 19 after inoculation there was observed small points of hemorrhages, changes in villies, hypertrophy of the caliciform cells and presence of parasitic forms in the macrogametocytes stage in all portions of the small intestine.

Key-words: *Isospora* sp, oocystis, pathology

INTRODUÇÃO

O gênero *Isospora* apresenta várias espécies em uma ampla variedade de hospedeiros, sendo mais freqüentemente encontradas infectando o trato intestinal de cães e gatos. São parasitas intracelulares obrigatórios do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidida, família Eimeriidae. Os membros desse gênero completam seu ciclo em um único hospedeiro e podem, excepcionalmente, utilizar um hospedeiro paratênico (DUBEY & GREENE, 2006).

Estas espécies podem causar infecções severas em humanos, suínos e cães. Quatro delas são descritas em cães: *I. canis*, *I. ohioensis*, *I. burrowsi* e *I. neorivolta*, identificadas pelo tamanho de seus oocistos (BUEHL et al., 2006).

A isosporose canina tem ampla distribuição geográfica, com maior incidência em cães jovens. A contaminação ocorre pela ingestão de oocistos esporulados ou cistos monozóicos nos hospedeiros paratênicos, podendo causar diarreia, perda de peso, lesões intestinais e, em alguns casos, a morte desses animais (CONBOY, 1998).

Infecções sem sintomas são descritas, particularmente em casos com *I. ohioensis* (DAUGSCHIES et al., 2000). No entanto, aquelas causadas por *I. canis* são geralmente acompanhadas de sintomas clínicos e a patogenicidade dessa espécie se deve ao desenvolvimento nas camadas mais profundas das paredes do intestino, diferente de *I. ohioensis* que parasitam as células da lâmina própria (DUBEY, 1978). Sinais clínicos e sintomas como alterações na consistência das fezes, diarreia com sangue, dores abdominais, anemia, apatia e morte podem ocorrer em cães jovens. Alterações respiratórias e neurológicas também são reportadas (CONBOY, 1998).

Animais que tenham sido submetidos, ao longo de suas vidas, a condições inadequadas de criação; sem manejo adequado ou condições higiênico-sanitárias precárias, dificilmente terão essa parasitose controlada (RODRIGUES, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento de oocistos de *Isospora canis* em cães naturalmente infectados, oriundos da área urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul e a indução de infecções com esse parasita em grupos de cães jovens, criados em isolamento, observando o desenvolvimento da infecção e os aspectos da patogenia/patologia deste parasita nos hospedeiros experimentais.

METODOLOGIA

1. Isolamento e concentração de oocistos *Isospora canis* de cães naturalmente infectados

Em cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura municipal de Campo Grande (CCZ-PMCG), foram realizados exames de fezes em 178 ninhadas, pela técnica da Centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar a 60 % (p/v). Aqueles animais positivos para *Isospora canis* foram mantidos em gaiolas individuais durante o período de eliminação e as fezes lavadas em peneiras de 60 e 45 μ m, sedimentadas, diluídas em solução de bicromato de potássio a 1% e mantidas em aeração e agitação por cerca de quatro dias, até que os oocistos apresentassem completa esporulação.

Após esporulação dos oocistos, foi confirmada a condição morfológica dos esporozoítos e feita a contagem para determinação dos inóculos, através de estimativas em função de volumes definidos.

2. Seleção, preparação e inoculação de cães jovens com *Isospora canis*

Doze cães jovens, com menos de um mês de idade, de ambos os sexos, de três ninhadas recolhidas pelo CCZ-PMCG, foram selecionados pelo estado sanitário, clinicamente saudáveis, vacinados contra cinomose, hepatite e raiva. Os animais foram mantidos em canis individuais, que eram higienizados diariamente com água sanitária e vassoura de fogo, alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Foram administrados, via oral, 2mL de Kaobiotic® (formulação contendo: Sulfato de neomicina, sulfaguanidina, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfatizol, caulin e pectina), diariamente, durante uma semana até três dias antes da inoculação, como medida profilática à infecção por coccídios.

Dez animais, ao atingirem, aproximadamente, três meses de idade, foram inoculados com $0,5 \times 10^4$ oocistos esporulados de *Isospora canis* e, após nove dias da primeira inoculação, quatro animais foram re-infectados com 1×10^4 oocistos esporulados.

Todos os cães foram acompanhados clínica e laboratorialmente, durante o período experimental. Foram monitoradas: temperatura retal, estado e coloração das mucosas conjuntivais e estado geral, bem como as fezes quanto a consistência, se firme, pastosa ou

aquosa, se hemorrágicas ou não e quanto à presença de oocistos característicos, usando a técnica de Centrífugo-flutuação em açúcar. Eritrograma e Leucograma foram realizados individualmente no dia da inoculação e da necropsia. Dois cães não inoculados foram utilizados como controle, sendo mantidos nas mesmas condições dos outros animais.

3. Necropsia e processamento anátomo-patológico

Nos dias 3, 6, 8, 15 e 19, após a inoculação, os cães foram necropsiados, sendo dois animais para cada dia de necropsia, uma seqüência pré-estabelecida. Nos dois últimos dias foram necropsiados os animais que receberam duas induções de infecção. A necropsia foi realizada pelos processos usuais em patologia e amostras de tecidos foram fixadas em formol a 10% para processamento histopatológico de rotina e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 178 amostras fecais examinadas, 47 (26%) apresentaram oocistos de *Isospora* sp com medidas entre 18 e 39 μm (fig.1). Segundo Conboy (1998), o tamanho dos coccídios desse gênero permite a distinção das espécies: *Isospora canis* (34-42 x 23-36 μm) e *Isospora ohioensis-like* (17-27 x 15-24 μm). Estas diferenças observadas entre os dois grupos de espécies, permitiram o isolamento monoespecífico (fig 1).

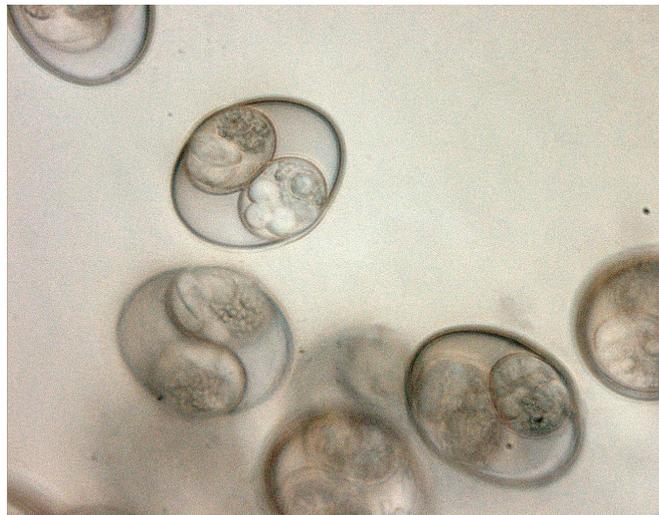


Figura 1. Oocistos esporulados de *I. canis* recuperados das fezes de cães naturalmente infectados, oriundos da cidade de Campo Grande, MS, em aumento de 400x.

Durante todo o experimento todos os animais apresentaram mucosa normocorada e estado clínico geral bom.

Os animais infectados experimentalmente com *I. canis* apresentaram elevação de temperatura nos primeiros seis dias após a inoculação. Período este que equivale às duas primeiras esquizogonias, na fase assexuada do ciclo de vida, quando o parasita invade as células do hospedeiro e se divide por fissão binária (URQUHART et al., 1998).

As fezes dos animais inoculados apresentaram consistência pastosa, após o quarto dia da infecção, o que se pode atribuir às lesões epiteliais em diferentes partes do intestino delgado, muitas vezes formando petéquias e ulcerações, provocadas pelo parasita (BUEHL et al., 2006), o que pode ser relacionado, também, às fezes hemorrágicas observadas em dois animais no décimo, décimo quarto e décimo quinto dia após a inoculação.

Todos os animais começaram a eliminar pequenas quantidades de oocistos de *I. canis* no primeiro dia após a inoculação, inclusive os dois animais controle, cessando a eliminação no oitavo dia após a inoculação. Este fato pode ser atribuído à persistência da infecção, que foi mantida em latência pela administração das sulfonamidas (Kaobiotic®), ou contaminação pela ingestão acidental de oocistos nas instalações experimentais, apesar de todas as medidas profiláticas adotadas (higienização, vassoura de fogo, entre outras).

Dos quatro animais remanescentes no nono dia do experimento, um animal, que já estava eliminando oocistos de *I. canis*, apresentou um aumento no número de oocistos em suas fezes. Outro animal voltou a eliminar oocistos no nono dia da re-inoculação. Estes fatos confirmam que os inóculos foram suficientes para causar infecções nos animais, apesar das variações individuais.

Quando da necropsia, foram observadas pontuações hemorrágicas (fig.2) e presença de muco em todas as porções do intestino delgado e enfartamento dos gânglios mesentéricos, nos animais inoculados.

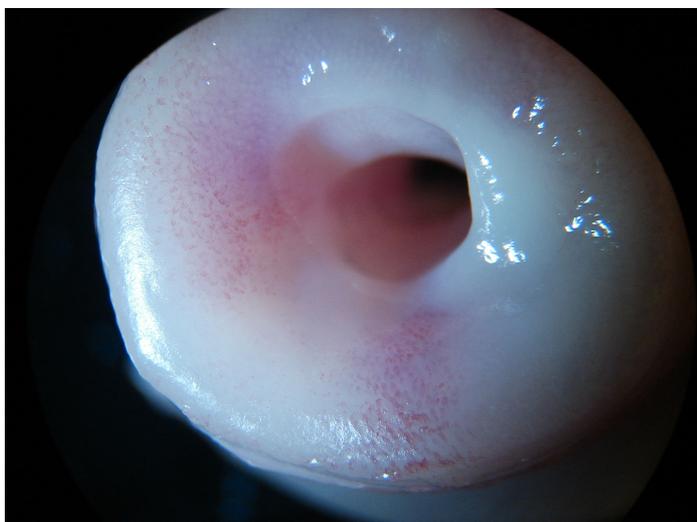


Figura 2. Corte transversal de jejuno com pontuações hemorrágicas, em observação ao estereomicroscópio.

A principal alteração histológica, observada em todos os animais, foi hipertrofia acentuada das células caliciformes em todo o intestino delgado (fig.3), o que explica a presença de muco observada nas diarréias. Os animais 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10 e 12 apresentaram, também, atrofia das vilosidades e desorganização no epitélio (fig.4), além de formas parasitárias encontradas no estágio de macrogametócito (fig.5).

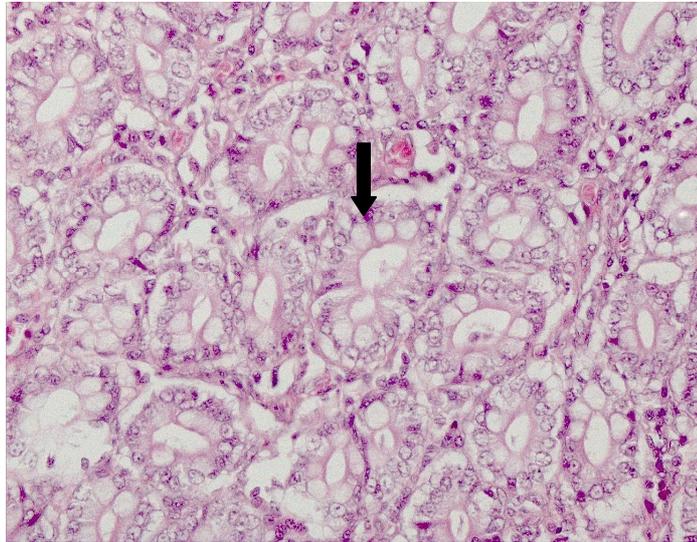


Figura 3. Hipertrofia das células caliciformes em corte histológico de íleo, corado por HE, em aumento de 400x.

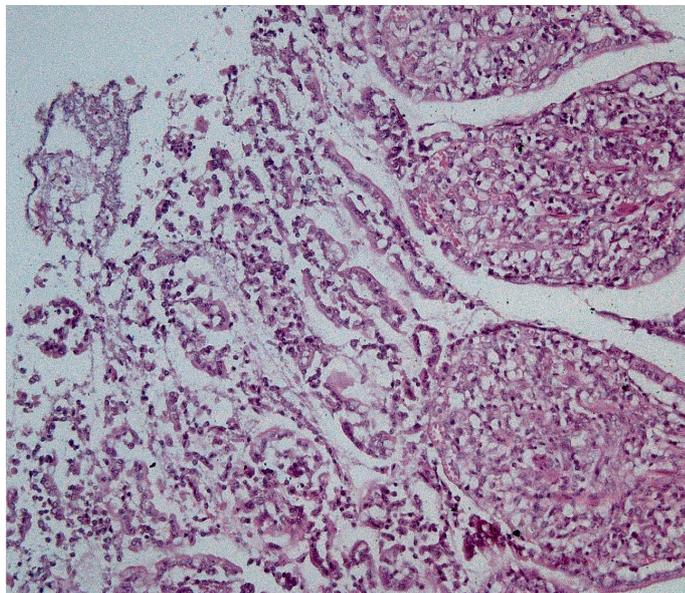


Figura 4. Atrofia e desorganização das vilosidades intestinais em corte histológico de duodeno, corado por HE, em aumento de 200x.

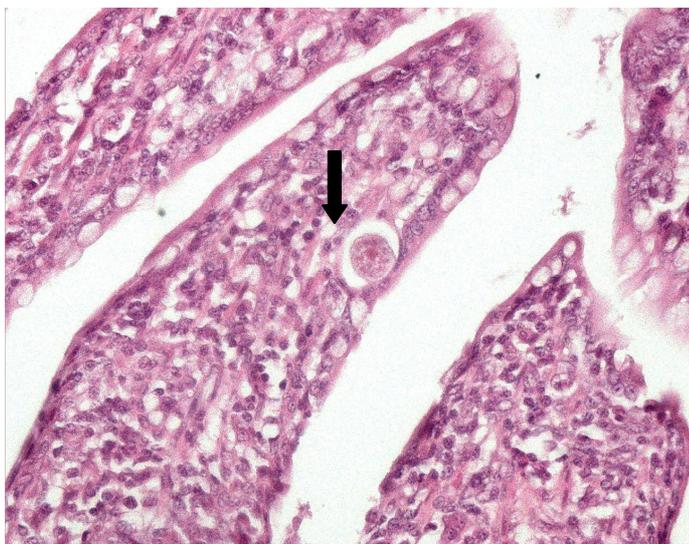


Figura 5. Macrogametócito de *Isospora canis* em corte histológico de duodeno, corado por HE, em aumento de 400x.

Vacúolos parasitóforos foram encontrados em todos os animais inoculados. A formação desses vacúolos nos hospedeiros indica a presença e o desenvolvimento intracelular dos coccídios (BEYER et al., 2002). Esses vacúolos podem conter, em seu interior, vários estágios evolutivos de *Isospora* (FERGUSON et al., 1980).

Os leucogramas realizados antes da inoculação e quando da necropsia, revelaram que os cães, apesar de apresentarem número de leucócitos dentro do padrão de normalidade, desenvolveram uma dinâmica de leucocitose, com aumento de células leucocitárias como bastonetes e segmentados, após a inoculação. Os animais 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 apresentaram, também, aumento do número de eosinófilos quando comparados ao exame pré-inoculação, apesar de estarem dentro do padrão de normalidade, indicando uma reação de resposta desses animais ao parasita inoculado

Segundo Levine e Ivens (1981), a patogenicidade de *I. canis* pode ser diferente para cada animal. Leep e Tood (1974) utilizaram $1,5 \cdot 10^5$ oocistos de um isolado obtido de cães em Illinois (EUA) e obtiveram patogenicidade semelhante à de Mitchell et al. (2007) que inocularam $1 \cdot 10^5$ oocistos esporulados em cães jovens. O exame histopatológico realizado por Mitchell et al. (2007) revelou alterações nas vilosidades, inflamação na lâmina própria do intestino e hiperplasia de linfócitos nas placas de Peyer, nos cães inoculados com *I. canis*, que apresentaram, também, sinais clínicos como diarreia, perda de peso e letargia.

Reinemeyer e colaboradores (2007), em ensaio piloto, inocularam $2,5 \cdot 10^5$, $3,75 \cdot 10^5$ e $5 \cdot 10^5$ e obtiveram infecção nos animais, apresentando período pré-patente de 10 dias e período patente de 8 à 10 dias, porém nenhum sinal clínico foi observado.

A baixa patogenicidade observada nesse experimento pode ser atribuída ao inóculo menor àqueles já descritos na literatura, porém suficiente para causar lesões importantes em todo o intestino delgado, e mais próximo às infecções naturais por esse parasita.

A manifestação clínica nas infecções experimentais pode ser variável em função do volume do inóculo, da patogenicidade e viabilidade do isolado e da variabilidade individual do hospedeiro.

Os resultados obtidos confirmam a patogenicidade de *Isospora canis* para cães jovens e, considerando a sua frequência nas amostras examinadas, que este agente está disseminado na cidade de CampoGrande, MS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEYER, T.V.; SVEZHOVA, N.V; RADCHENKO, A.I.;SIDORENKO, N.V. Parasithoforous vacuole: Morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). *Cell Biology Internacional*, v.26, n.10, p.861-871, 2002.

BUEHL, I. E., PROSL, H., MUNDT, H. C., TICHY, A. G., JOAQUIM, A. Canine Isosporosis – Epidemiology of Field and Experimental Infections. *Journal of Veterinary Medicine*. v.53, p.482-487, 2006.

CONBOY, G. Canine coccidiosis. *Canadian Veterinary Journal*, v.39, p.443-444, 1998.

DAUGSCHIES, A.; MUNDT, H. C; LETKOVA, V. Toltrazuril treatment of cystoisosporosis in dogs under experimental and field conditions. *Parasitology Research*, v. 86(10), p. 797-799, 2000.

DUBEY, J. P. Life cycle of *Isoospora ohioensis* in dogs. *Parasitology*, v.77, p.1–11. 1978.

DUBEY, J. P., GREENE, C. E. *Enteric Coccidiosis*. In: GREENE, C.E, *Infectious Diseases of the dog and cat*, St. Louis, Missouri, Canadá, Elsevier, 3ª edição, p.775-784, 2006.

FERGUNSON, D.J.P.; BIRCH-ANDERSEN, A.; RUCHISON, W.M. SIIM J. Ultrastructural observations on microgametogenesis and the structure of the microgamete of *Isoospora felis*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v. 88, p.151–159, 1980.

LEPP, D. L., TODD, K. S. Life cycle of *Isoospora canis*, Nemeseri,1959, in the dog. *Journal of Protozoology*, v. 21, p.199–206., 1974.

LEVINE, N. D.; IVENS. The coccidia parasites (Protozoa: Apicomplexa) of carnivores: *Illinois Biological Monographs*, n.51.University of Illinois Press, Urban, Illinois, 248 p,1981.

MITCHELL, S. M.; ZAJAC, A. M.; CHARLES, S.; DUNCAN, R. B.; LINDSAY, D. S. Cystoisospora canis Nemeséri, 1959 (syn. Isospora canis), infections in dogs: clinical signs, pathogenesis, and reproducible clinical disease in beagle dogs fed oocysts. *Journal of Parasitology*, Apr.93(2), p.345-352, 2007.

NEMESÉRI, L. Adatok a kutya coccidiosisához. I. *Isoospora canis*. *Magyar Allatorvosok Lapja*, v.14, p.91-92, 1959.

REINEMEYER, C.R.; LINDSAY, D.S.; MITCHELL, S.M.; MUNDT, H.C.; CHARLES, S.D.; ARTHUR, R.G.; SETTJE, T.L. Development of experimental *Cystoisospora canis* infection models in beagle puppies and efficacy evaluation of 5% Ponazuril (Toltrazuril sulfone) oral suspension. *Parasitology Research*, v.101, p.129–136, 2007.

RODRIGUES, N. A. Importância do manejo em dois sistemas de criação na infecção natural de cães por *Cystoisospora* Frenkel 1977 (Apicomplexa: *Cystoisosporine*). 2000. 52p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J., DUNCAN, J.L., DUNN, A.M., JENNINGS, F.W. Protozoologia Veterinária: *Parasitologia Veterinária*, 2ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998.