

ASPECTOS IMUNOPARASITOLÓGICOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL
POR *Sarcocystis cruzi* (HASSELMANN, 1926) WENYON, 1926
(APICOMPLEXA: SARCOCYSTIDAE) EM BOVINOS

PEDRO PAULO PIRES

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

ASPECTOS IMUNOPARASITOLÓGICOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL
POR *Sarcocystis cruzi* (HASSELMANN, 1926) WENYON, 1926
(APICOMPLEXA: SARCOCYSTIDAE) EM BOVINOS

PEDRO PAULO PIRES

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR: CARLOS WILSON GOMES LOPES

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Itaguaí, Rio de Janeiro

Março: 1987

TÍTULO DA TESE

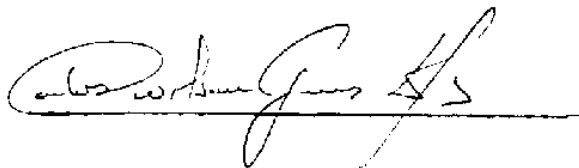
ASPECTOS IMUNOPARASITOLÓGICOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL
POR *Sarcocystis cruzi* (HASSELMANN, 1926) WENYON, 1926
(APICOMPLEXA: SARCOCYSTIDAE) EM BOVINOS

AUTOR

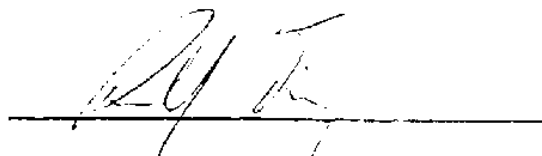
PEDRO PAULO PIRES

APROVADA EM: 20/03/1987

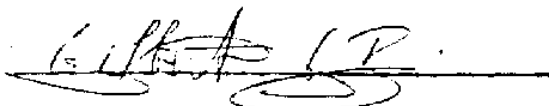
CARLOS WILSON GOMES LOPES



RONALD BASTOS FREIRE



GILBERTO GARCIA BOTELHO



Pelo sonho, apoio e es-
perança à minha família

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao CNPq e à Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal - EMBRAPA - RJ, pelas facilidades oferecidas durante o período de mestrado.

Aos amigos e companheiros que sempre prontamente me auxiliaram e ampararam nesse período.

BIOGRAFIA

PEDRO PAULO PIRES, filho de João Evangelista Pires Neto e Lydia Rojas Pires, nascido a 2 de dezembro de 1961 em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul, ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em março de 1980, terminando o curso de Medicina Veterinária em outubro de 1984. Durante esse período frequentou vários cursos de extensão universitária. Estagiou em instituições como a Cooperativa Agro-Pecuária Holambra, Hospital Octávio Dupont, do Jockey Club Brasileiro, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, CNPGC e Sendas Agropecuária e no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UFRRJ.

Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) na categoria de iniciação científica durante dois anos, quando publicou dois trabalhos científicos.

Ingressou em março de 1985 no Curso de Pós-Graduação a nível de mestrado em Medicina Veterinária com área de concentração em Parasitologia Veterinária na UFRRJ; concomitantemen-

te, iniciou trabalho de pesquisa na Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal (EMBRAPA-RJ) e foi aprovado em concurso público de âmbito nacional para o cargo de Pesquisador para essa mesma empresa.

ÍNDICE

	Págs.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Aspectos gerais	4
2.2. Espécies do gênero <i>Sarcocystis</i> em bovinos	5
2.3. Aspectos sistemáticos	6
2.4. Aspectos biomorfológicos	9
2.4.1. Ciclo vital	9
2.4.2. Formas exógenas	14
2.4.3. Formas endógenas	14
a. Hospedeiro intermediário	14
b. Hospedeiro definitivo	17
2.5. Aspectos clínicos	18
2.5.1. Hospedeiro intermediário	18
a. Sinais clínicos	18
b. Desenvolvimento ponderal	20
c. Temperatura, pulso e movimentos respiratórios	21
2.5.2. Hospedeiro definitivo	22
2.6. Aspectos epidemiológicos	22
2.6.1. Prevalência das formas do <i>sarcocystis</i>	22
a. Hospedeiro intermediário	22
b. Hospedeiro definitivo	23

	Págs.
2.6.2. Fatores inerentes à dispersão do <i>Sarcocystis</i>	24
a. Hospedeiro intermediário	24
1. Sarcocistose agudas	24
2. Sarcocistose crônica	25
b. Hospedeiro definitivo	26
c. Hospedeiros-transporte	28
2.7. Imunologia e sorologia	30
2.7.1. Relações imunológicas do <i>Sarcocystis</i>	30
2.7.2. Imunocinética da sarcocistose	32
2.7.3. Imunidade a reinfecções	34
a. Hospedeiro intermediário	34
b. Hospedeiro definitivo	36
2.8. Diagnóstico imunológico	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Locais de trabalho	44
3.2. Origem dos animais	44
3.2.1. Bovinos	44
3.2.2. Camundongos e coelhos	45
3.3. Obtenção do material infectante	45
3.3.1. Bradizoítas	45
3.3.2. Esporocistos	45
3.4. Infecção experimental	46
3.4.1. Bovinos	46
3.4.2. Cães	47
3.5. Acompanhamento clínico e colheita de amostras para análise	47
3.5.1. Exame clínico	47
3.5.2. Amostras de sangue e soro para análise	47
3.6. Condutas laboratoriais	48
3.6.1. Teste de imunofluorescência indireta	48
3.6.2. Teste <i>in vitro</i> de supressão da fagocitose	49

	Págs.
3.6.3. Teste <i>in vivo</i> de supressão da fagocitose	51
3.6.4. Teste da "Placa de Jerne" (quantificação da produção de anticorpos por células imunoativas <i>in vitro</i>)	52
3.6.5. Observação da formação de "capping" pela forma de bradizoíta do <i>Sarcocystis cruzi</i>	52
3.7. Representação gráfica dos dados	53
3.8. Análise estatística	53
4. RESULTADOS	55
4.1. Aspectos clínicos	55
4.2. Aspectos imunológicos	56
4.2.1. Flutuação das imunoglobulinas	56
4.2.2. Teste <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de supressão da fagocitose	58
4.2.3. Avaliação da produção de anticorpos pelas células imunoativas de baço de camundongos com soro de animais inoculados com <i>S. cruzi</i>	59
5. DISCUSSÃO	82
5.1. Aspectos gerais	82
5.2. Aspectos clínicos	84
5.3. Flutuação das imunoglobulinas	84
5.4. Avaliação da supressão imunológica	85
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8. APÊNDICES	106

ÍNDICE DAS TABELAS

	Págs.
TABELA 1. Porcentagem de fagocitose <i>in vitro</i> de eritrócitos de carneiro por macrófagos de camundongos previamente sensibilizados, frente ao soro de bovinos experimentalmente infectados com <i>S. cruzi</i>	80
TABELA 2. Porcentagem de fagocitose <i>in vivo</i> de eritrócitos de carneiro por macrófagos de camundongos previamente sensibilizados, frente ao soro de bovinos experimentalmente infectados com <i>S. cruzi</i>	81

ÍNDICE DAS FIGURAS

	Págs.
FIGURA 1. Ciclo biológico do <i>Sarcocystis cruzi</i>	11
FIGURA 2. Valores médios de pulso de vacas mestiças sadias e com sarcocistose experimental, infectadas com 10.000 esporocistos de <i>Sarcocystis cruzi</i> , a partir do 5º mês de gestação	60
FIGURA 3. Valores médios de pulso de vacas mestiças sadias e com sarcocistose experimental, infectadas com 50.000 esporocistos de <i>Sarcocystis cruzi</i> , a partir do 5º mês de gestação	61
FIGURA 4. Valores médios de pulso de vacas mestiças sadias e com sarcocistose experimental, infectadas com 100.000 esporocistos de <i>Sarcocystis cruzi</i> , a partir do 5º mês de gestação	62
FIGURA 5. Valores médios de temperatura de vacas mestiças sadias e com sarcocistose experimental, infectadas com 10.000 esporocistos de <i>Sarcocystis cruzi</i> , a partir do 5º mês de gestação	63
FIGURA 6. Valores médios de temperatura de vacas mestiças sadias e com sarcocistose experimental, infectadas com 50.000 esporocistos de <i>Sarcocystis cruzi</i> , a partir do 5º mês de gestação	64

- FIGURA 7. Valores médios de temperatura de vacas mestiças sadias e com sarcocistose experimental, infectadas com 100.000 esporocistos de *Sarcocystis cruzi*, a partir do 5º mês de gestação 65
- FIGURA 8. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM e IgG anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias, a partir do 5º mês de gestação 66
- FIGURA 9. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM e IgG anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose, infectadas experimentalmente a partir do 5º mês de gestação 67
- FIGURA 10. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM e IgG anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental, infectadas com 10.000 esporocistos, a partir do 5º mês de gestação 68
- FIGURA 11. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM e IgG anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental, infectadas com 50.000 esporocistos, a partir do 5º mês de gestação 69
- FIGURA 12. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM e IgG anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental,

	Págs.
infectadas com 100.000 esporocistos, a partir do 5º mês de gestação	70
FIGURA 13. Níveis de imunoglobulina M anti <i>Sarcocystis cruzi</i> , detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental e sadias, a partir do 5º mês de gestação	71
FIGURA 14. Níveis de imunoglobulina G anti <i>Sarcocystis cruzi</i> , detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental e sadias, a partir do 5º mês de gestação	72
FIGURA 15. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM e IgG anti <i>Sarcocystis cruzi</i> , detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental, que pariram crias aparentemente sadias, a partir do 5º mês de gestação	73
FIGURA 16. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM e IgG anti <i>Sarcocystis cruzi</i> , detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental, que abortaram ou pariram natimortos, a partir do 5º mês de gestação	74
FIGURA 17. Níveis de imunoglobulina M anti <i>Sarcocystis cruzi</i> , detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias, e com sarcocistose experimental que abortaram ou pariram natimortos, a partir do 5º mês de gestação	75
FIGURA 18. Níveis de imunoglobulina G anti <i>Sarcocystis</i>	

- cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias e com sarcocistose experimental que abortaram ou pariram natimortos, a partir do 5º mês de gestação 76
- FIGURA 19. Níveis de imunoglobulina M anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias e com sarcocistose experimental que pariram crias aparentemente sadias, a partir do 5º mês de gestação 77
- FIGURA 20. Níveis de imunoglobulina G anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias, e com sarcocistose experimental que pariram crias aparentemente sadias, a partir do 5º mês de gestação 78
- FIGURA 21. Fotomicrografia da reação positiva do teste de imunofluorescência indireta 79

RESUMO

Três grupos de quatro vacas mestiças prenhes, no 5º mês de gestação, foram infectadas experimentalmente com $104,5 \times 10^4$ e 10^5 esporocistos de *Sarcocystis cruzi* respectivamente; outras quatro não infectadas permaneceram como controle. Estabeleceu-se a curva de flutuação das imunoglobulinas das classes IgG e IgM dos animais e observaram-se picos aos 35 e 74 DPI e dos 46 aos 68 DPI respectivamente. Não houve diferença significativa entre as curvas de flutuação das imunoglobulinas, nem nos animais separados em grupos por diferentes inóculos, e nem nos separados por diferentes sintomas clínicos. Observou-se supressão na produção de anticorpos por células de baço de camundongos e da fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos, quando estas células foram testadas frente ao soro sanguíneo de animais com sarcocistose, positivo pelo TIFI. Finalmente, observou-se que a forma de bradizoíta do *S. cruzi* faz "capping".

SUMMARY

Three groups of four cross-breeding cow each, in the 5th month of gestation were infected experimentally with 10^4 , 5×10^4 and 10^5 sporocysts of *Sarcocystis cruzi*, respectively, and another four pregnant cows were considered as controls.

The levels of IgG and IgN classes of immunoglobulins were checked in the sera of animals weekly and the righ points were obtained at 35 and 74, and from 46 to 68 days post infection respectively. Nosignificant differences were observed in the levels of immunoglobulins when they were compared between groups with different inocula or when they were compared among groups with different clinical signs. Supression was observed in the production of antibodies by mouse spleen cells and in the phagocytosis by mouse peritoneal macrophages when these cells were got together with positive sera to indirect immomoflorecentage-test (TIFI) from bovines infected with *S. cruzi* . Finally, it was observed that bradizoites of *S. cruzi* were capable to get capping.

I. INTRODUÇÃO

A bevinocultura no Brasil, tem estado sujeita a indesejáveis perdas econômicas decorrentes de problemas zootécnicos e de sanidade animal, incluindo-se, nestes últimos, doenças limitantes do desenvolvimento dos animais jovens e da produção dos animais adultos.

Entre essas doenças, tais como viroses, bacterioses, rickettsioses e parasitoses, encontram-se aquelas responsabilizadas, na maioria das vezes, por perdas de caráter econômico e aquelas consideradas, ainda hoje, pouco patogênicas devido ao pouco conhecimento de seus aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos no Brasil.

Dos protozoários, os hematozoários e os coccídeos intestinais constam como agentes etiológicos responsáveis por vultosas perdas econômicas. Recentemente, pesquisas têm avaliado a importância sanitária de alguns desses parasitos considerados pouco patogênicos, como, por exemplo, as espécies do gênero *Sarcocystis* Lankester, 1882, as quais podem causar doença e morte em bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Portanto, faz-se

necessária a utilização de meios específicos para diagnosticá-las. Algumas espécies de *Sarcocystis* podem ser identificadas pelas características dos cistos intramusculares; esse meio de identificação serve, até o presente, para o diagnóstico de três espécies de *Sarcocystis* em bovinos, a saber: *Sarcocystis cruzi* (Hasselman 1926) Wenyon, 1926, *Sarcocystis hirsuta* Muolé, 1888 e *Sarcocystis hominis* (Railliet & Lucet, 1891) Dubey, 1976. Da mesma maneira, essas espécies podem ser caracterizadas pela afinidade ao hospedeiro definitivo (*S. cruzi* tem como hospedeiros definitivos, caninos, *S. hirsuta*, felinos e *S. hominis*, primatas). Outras espécies também têm sido diferenciadas pela especificidade aos hospedeiros definitivo e intermediário. Com apenas esses dados biomorfológicos prepararam-se técnicas de diagnóstico com baixo índice de confiabilidade.

Atualmente, ao se estudar a natureza de *Toxoplasma* Nicolle & Manceaux, 1909, *Besnoitia* Henry, 1913, *Hammondia* Frenkel & Dubey, 1975, *Frenkelia* Biocca, 1968 e *Sarcocystis*, tem-se levado em consideração os estudos comparativos sobre aspectos imunológicos da relação hospedeiro-parasito.

Nesses estudos de imunoparasitologia enfocam-se os pontos de ineficiência do sistema imune no controle destas parasitoses, com o intuito de se conhecer o nível de interação desses parasitos obrigatórios com os seus hospedeiros, e presumivelmente avaliar sua adaptabilidade, esclarecendo se, ao confrontar-se com o sistema imune, o parasito vence-o, evi-

ta-o ou até mesmo o utiliza. Tais conhecimentos permitiram estimar a cinética imunológica do sistema imune nos animais doentes, respostas essas que, em correlação com boas condições de saúde do hospedeiro, desfavoráveis à instalação do parasitismo (antagonismo) ou, em correlação a condições de saúde favoráveis ao desenvolvimento da doença (sinergismo), como pela ocorrência de fatores estressantes biológicos (gestação, lactação, cio, crescimento, má nutrição e formação genética) ou abiológicos (condições climáticas e tipo de trabalho), podem elucidar o comportamento do parasito frente aos meios orgânicos do sistema imune, bem como as particularidades imunoquímicas desses microrganismos, possibilitando com isso o estabelecimento de técnicas de diagnóstico mais precisas.

Este trabalho tem como objetivo estudar as relações *Sarcocystis* - bovino, necessárias para: a) avaliar a flutuação de imunoglobulinas em animais infectados experimentalmente com esporocistos de *S. cruzi*, de acordo com diferentes inóculos e com a sintomatologia clínica observada, através da imunofluorescência indireta; b) determinar o período de imunossupressão nos animais infectados; c) observar a formação de "capping" pela forma de bradizoíta do *S. cruzi*.

2. RESISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos gerais

Formas císticas de *Sarcocystis* spp. são freqüentemente encontradas em exames histológicos de musculatura estriada de bovinos assim como bradizoítas são facilmente liberados desses músculos pela técnica da digestão tríptica, podendo então ser observados no precipitado da solução digestiva. *Sarcocystis* spp. foi considerado apatogênico até 1973, quando FAYER & JOHNSON relataram a patogenicidade e o ciclo de vida de *S. cruzi* em bovinos.

A partir de tal conhecimento, surtos de sarcocistose bovina têm sido relatados em vários pontos do mundo. A primeira citação foi feita por CORNER et al. (1963), que relatavam a infecção de um rebanho por protozoário até então não identificado, na cidade de Dalmeny, no Canadá. Outras citações se seguiram a esta: a de MEADS (1976) no Canadá, as de FRELIER et al. (1977), SCHMITZ & WOLF (1977) e GILES et al. (1980) nos Estados Unidos da América, a de COLLERY & WEAVERS (1981) na Ir-

landa e a de CARRIGAN (1986) na Austrália.

Recentemente, estudos têm mostrado que certas espécies de *Sarcocystis* podem causar aborto, reduzir a produção, promover perda de peso, retardar o crescimento e eventualmente causar a morte de animais domésticos (DUBEY & FAYER, 1983). Outros trabalhos têm mostrado a alta patogenicidade do gênero *Sarcocystis* para bovinos e ovinos e uma incidência de 75 a 100% de sarcocistose bovina (JOHNSON et al., 1975; MUNDAY et al., 1975; GESTRICH et al., 1975 e BOTELHO, 1985).

2.2. Espécies do gênero *Sarcocystis* em bovinos

No gênero *Sarcocystis* se incluem três espécies que passam a fase cística de seus ciclos biológicos na musculatura cardíaca e estriada de bovinos e bisão.

Sarcocystis cruzi tem sido a espécie mais patogênica para o gado bovino; com as fases de seu desenvolvimento conhecidas, diferencia-se das outras duas espécies, entre outras características, por apresentar sarcocistos microscópicos de parede cística fina e ter como hospedeiro definitivo o cão (*Canis familiaris*), O coiote (*Canis latrans*), O lobo (*Canis lupus*), a raposa (*Vulpes vulpes*) e o mão-pelada (*Procyon lotor*).

Sarcocystis hirsuta, espécie pouco patogênica para o gado bovino, também com o ciclo biológico conhecido, tem sarcocistos macroscópicos e parede cística grossa, tendo o gato (*Felis catus*) como hospedeiro definitivo.

Sarcocystis hominis talvez seja apatogênica para o gado bovino, e ainda não se conhecem todos os seus estádios de desenvolvimento; apresenta sarcocistos microscópicos e parede cística grossa, tendo o homem (*Homo sapiens*), O babuíno (*Papio spp.*) e o macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) como hospedeiros definitivos (LEVINE, 1982; DUBEY & FAYER, 1983).

2.3. Aspectos sistemáticos

Os coccídeos pertencem ao reino Protista Haeckel, 1966, caracterizado por seres primariamente unicelulares ou organismos unicelulares que formam colônia, com células eucarióticas, nutrição diversificada (fotossíntese, absorção e ingestão, ou a combinação desses três tipos), ciclo reprodutivo variado, mas tipicamente incluindo divisão assexual na forma haplóide e processo sexual verdadeiro com cariogamia e meiose, apresentando motilidade por flagelo anterior ou outros meios, podendo ainda ser imóveis (KREIER, 1977).

O sub-reino é Protozoa Goldfuss, 1817, que se caracteriza por seres unicelulares ou em colônias de células semelhantes, apresentando simetria esférica, bilateral ou ausente, de tamanho geralmente microscópico, havendo aproximadamente 30.000 espécies (STORRER & USINGER, 1977).

Segundo a classificação de LEVINE (1973), LEVINE & IVENS (1981) e LEVINE (1982), o filo é Apicomplexa Levine, 1970, que se caracteriza pelo complexo apical, geralmente cons-

tituído de anel polar, roptrias, micronemas, conóide e microtúbulos subpeliculares, presentes no mesmo estágio, microporo, geralmente presente no mesmo estágio, "chilia" ausente, e sexualidade por singamia; todas as espécies são parasitas, contando-se, já descritas, cerca de 4.000 espécies.

A classe é Esporozoasida Leuckart, 1879, que se caracteriza por ter a conóide que, quando presente, forma um completo cone truncado; a reprodução é geralmente sexual ou asexual; oocistos contêm esperozoítas infectivos que resultam de esporogonia; a locomoção se faz por flexão, deslizamento, ondulação ou açoites flagelares do corpo; flagelos estão presentes apenas em microgametas de alguns grupos; pseudópodes estão ordinariamente ausentes, e se presentes, são usados para alimentação, não para a locomoção; são homoxenos ou heteroxenos, com cerca de 4.000 espécies descritas.

A subclasse é Coccidiasina Leuckart, 1879, representada por gamontes ordinariamente presentes, pequenos e tipicamente intracelulares; conóides são modificados e sizígia geralmente ausente; anisogamia é marcada; o ciclo vital consta caracteristicamente de merogonia, gametogonia e esporogonia; há cerca de 2.400 espécies, a maioria em vertebrados.

A ordem é Eucoccidiorida Léger & Dubosco, 1910, constituída por protozoários que têm merogonia presente; ocorre em vertebrados e/ou invertebrados, com cerca de 2.400 espécies.

A subordem é Eimeriorina Léger, 1911, caracterizada

por ter macrogameta e microgameta que se desenvolvem independentemente; sizígia normalmente ausente; microgamonte produz tipicamente muitos microgametas; zigoto não móvel e esporozoítas tipicamente inclusos num esporocisto; endodiogenia ausente ou presente; homo ou heteroxenos; cerca de 1.500 espécies descritas.

A família é *Sarcocystidae* Poche, 1913, constituída por parasitos heteroxenos, produzindo oocistos após singamia; sizígia ausente; oocistos com dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítas, desenvolvendo-se no intestino de um hospedeiro definitivo; os estádios assexuais ocorrem num hospedeiro intermediário; há cerca de 105 espécies descritas.

A subfamília é *Sarcocystinae* Poche, 1913, constituída por parasitos obrigatoriamente heteroxenos, com multiplicação assexual no hospedeiro intermediário (presa); a última geração de merontes na musculatura ou sistema nervoso central do hospedeiro intermediário dá os bradizoítas, infectivos para o hospedeiro definitivo (predador); oocistos esporulam em tecidos do hospedeiro predador, que eliminam esporocistos esporulados em suas fezes.

O gênero é *Sarcocystis* Lankester, 1882; a última geração de merontes localiza-se em músculos estriados; os merozoítas são alongados; há cerca de 90 espécies descritas.

Outros gêneros dessa subfamília são *Frenkelia* Biocca, 1968, cuja última geração de merontes se localiza tipicamente no sistema nervoso central e cujos merozoítas são alonga-

dos, e *Arthrocystis* Levine, Beamer & Simon, 1970, cuja última geração de merontes se situa tipicamente em músculo estriado, em agrupamentos como gomos de bambu, e cujos merozoítas são esféricos.

2.4. Aspectos biomorfológicos

Segundo MARKUS (1978) a maioria dos trabalhos experimentais sobre *Sarcocystis*, anteriores a 1972 reivindica sucesso em transmitir o parasito entre mamíferos, ou destes a pássaros, havendo mais de 20 relatos de infecção desses animais pela administração de cistos tissulares ou injeção de organismos de cistos tissulares de *Sarcocystis*; entretanto, com a recente elucidação do ciclo vital desse parasito, ficou claro que vários dos experimentos não foram devidamente conduzidos e analisados, podendo ter havido contaminação dos ambientes por oocistos ou esporocistos, além de interpretações errôneas, dando uma falsa conclusão de como *Sarcocystis* tinha sido transmitido.

2.4.1. Ciclo vital

As bases do ciclo vital dos membros da família Sarcocystidae são as mesmas que as da família Eimeriidae, diferindo em que as espécies da primeira família são heteroxenos facultativos ou obrigatórios e as fases sexual e assexual o-

correm em diferentes hospedeiros. Carnivorismo por predadores e transmissão de oocisto/espocisto aos animais presas são essenciais, parecendo provável que, na natureza, a ingestão de poucos esporocistos é suficiente para iniciar a reprodução assexual nos tecidos da presa, resultando disso grande número de parasitos (LEVINE, 1982).

A primeira descrição convincente de merontes de *Sarcocystis* em animais de experimento foi feita por FAYER & JOHNSON (1973), quando essas formas foram vistas em todos os tecidos de bezerros em necropsias realizadas de 26 a 33 dias pós-infecção (DPI) com esporocistos eliminados nas fezes por cães infectados experimentalmente. Em outro experimento, merontes foram primeiro encontrados 20 DPI e não mais vistos aos 40, 46 e 54 DPI (FAYER & JOHNSON, 1974).

DUBEY & FAYER (1983) descreveram minuciosamente o ciclo vital desse parasito (Fig. 1), considerando que *Sarcocystis* geralmente alternam entre um hospedeiro intermediário herbívoro (presa) e um hospedeiro definitivo carnívoro (predador). Geralmente eles são mais específicos para seus hospedeiros intermediários do que para os definitivos. Ambos os hospedeiros podem ser infectados por mais de uma espécie de *Sarcocystis*, ocorrendo, por exemplo, pelo menos três espécies em bovinos e nove em cães. Pode-se dizer, então, que bovinos domésticos e bisão são os hospedeiros intermediários para *S. cruzi*, e cão, coiote, lobo, raposa e mão-pelada são seus hospedeiros definitivos. Os hospedeiros intermediários e finais de ou-

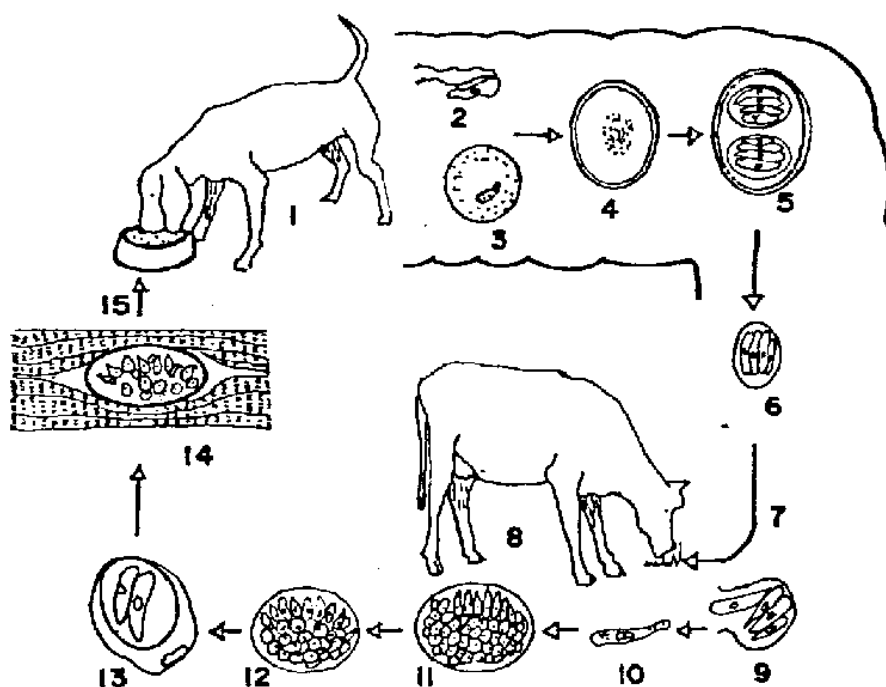


FIGURA 1. Ciclo biológico do *Sarcocystis cruzi* (I - canino, hospedeiro definitivo; 2 - gameta masculino; 3 - gameta feminino; 4 - oocisto não esporulado; 5 - oocisto esporulado; 6 - esporocisto nas fezes; 7 - ingestão do esporocisto pelo bovino; 8 bovino, hospedeiro intermediário; 9 - esporocisto no intestino delgado; 10 - esporozoita; 11 - primeira merogonia nas artérias; 12 - segunda merogonia nos capilares; 13 - terceira merogonia no sangue; 14 - cisto na musculatura e em células nervosas; 15 - ingestão de carne bovina pelo canino (DUBEY & FAYER, 1983).

tras espécies são listados no Apêndice I.

Hospedeiros finais tornam-se infectados com *Sarcocystis* quando ingerem formas maduras do parasito, encistadas em músculo estriado de hospedeiros intermediários; a parede cística é rompida por enzimas digestivas, sendo liberados os zoítas em forma de banana (bradizoíta ou cistozoíta) encistados; esses zoítas penetram nas células caliciformes da superfície do intestino delgado, rapidamente se diferenciam em gametas masculino e feminino e movem-se para baixo, atingindo a região da lâmina própria do intestino. Um dia após zoítas serem ingeridos por carnívoros, ocorre a fertilização e a parede começa a se formar em torno do zigoto. Ainda dentro da lâmina própria, o zigoto transforma-se em um oocisto, dentro do qual se desenvolvem dois esporocistos e, em cada um destes, quatro esporozoítas; assim sendo, há oito esporozoítas em cada oocisto esporulado. Oocistos, e mais freqüentemente esporocistos livres, saem com as fezes do hospedeiro carnívoro. Por outro lado, os bovinos tornam-se infectados pela ingestão desses oocistos ou esporocistos. Como resultado da ação de enzimas digestivas e bile, esporozoítas são liberados dos esporocistos. No intestino delgado, penetram na parede e encontram seu caminho nas células endoteliais de artérias, particularmente aquelas dos intestinos e linfonodos mesentéricos; os esporozoítas parecem permanecer dormentes nos primeiros 10 DPI, antes de passar por extensa proliferação nuclear para se tornarem merontes de primeira geração, que se desenvolvem em estreita associação com o en-

dotélio das artérias. Merontes maduros contende merozoítas parecem ficar entre o endotélio e a túnica elástica, projetando-se para o lúmen, entrando na corrente sanguínea e passando a merontes de segunda geração no endotélio de capilares viscerais, sendo a maioria encontrada em glomérulos renais; os merontes maduros da segunda geração são encontrados aproximadamente 4 a 5 semanas pós-infecção (SPI), e os merozoítas liberados desses merontes de segunda geração entram na corrente sanguínea e circulam extracelularmente; eles se multiplicam em células mononucleares na corrente sanguínea, dividindo-se em duas progênes que têm sido encontradas até 6 SPI; o número de tais gerações na corrente sanguínea é desconhecido, havendo pelo menos esta terceira geração de merogonia dentro do sangue; os merozoítas liberados da segunda geração de merontes ou os zoítas que se desenvolvem no sangue penetram nos músculos estriados ou fibras de Purkinge, crescendo em contato direto com o citoplasma da célula hospedeira, o estágio intramuscular é separado do citoplasma da célula hospedeira por um vacúolo parasitóforo; assim, a membrana circundante do vacúolo parasitóforo incorpora-se à parede cística de *sacocystis*, ocorrendo o encistamento em torno de 5 a 7 SPI; a formação cística inicial é de difícil visualização e frequentemente é negligenciada; contém parasitos globulares chamados metrócitos (célula-mãe) que se dividem em dois para produzir mais metrócitos; eventualmente, os metrócitos globulares dão, por endodiogenia, os zoítas em forma de banana que

caracterizam os cistos maduros de *s. cruzi*, que só são encontrados em torno de 11 SPI; somente esses cistos contendo bra-dizoítas são infectivos aos hospedeiros carnívoros.

2.4.2. Formas exógenas

Freqüentemente esporocistos, devido ao rompimento da quase totalidade dos oocistos à saída destes do interior das células epiteliais, são as formas eliminadas com as fezes dos hospedeiros definitivos e que contaminam o meio (DUBEY & FAYER, 1983).

2.4.3. Formas endógenas

a. Hospedeiro intermediário

Após ingestão de esporocistos pelo hospedeiro intermediário, segundo FAYER (1977), ocorrem pelo menos três gerações assexuadas: a primeira e a segunda são esquizontes; a primeira é encontrada nas células do endotélio vascular de artérias de pequeno e médio calibre do intestino grosso, rins, pâncreas e cérebro aos 15 DPI, e a segunda nas células do endotélio de capilares aos 28-35 DPI; a terceira geração é o estágio de cisto.

LEVINE & IVENS (1981) relatam que a segunda geração de merontes ocorre nas células endoteliais de muitos órgãos,

principalmente nos glomérulos renais (FAYER & JOHNSON, 1974). Os sarcocistos ocorrem nos músculos esqueléticos, esôfago, coração e outros músculos do bovino (FAYER et al., 1976a).

DUBEY (1982b), relatando observações pessoais e de outros autores, citou a existência de uma geração a mais de merontes precedendo a formação de sarcocistos intramusculares (HEYDORN et al., 1975; DUBEY, 1976, 1980, 1982a,b). Conforme citação de GESTRICH et al. (1975), ZAMAN & COLLEY (1975), HEYDORN & GESTRICH (1976) e HEYDORN (1977a), merozoítas de *S. orientalis*, *S. bovicanis* (*S. cruzi*) *S. ovicanis* (*S. tenella*) e *S. sui hominis* têm sido observados nos esfregaços de sangue periférico de ratos, bovinos, ovinos e suínos experimentalmente infectados, respectivamente. Também se observaram células brancas circulantes parasitadas com merozoítas em ratos, suínos e bovinos experimentalmente infectados (ZAMAN & COLEY, 1975; HEYDORN, 1977b; DUBEY, 1982a). Segundo LEVINE & IVENS (1981), essa maneira de transporte dos parasitos pode estar relacionada à proteção dos mesmos contra a ação dos anticorpos dos hospedeiros.

DUBEY (1982a), comparando os merozoítas intra e extracelulares na corrente sanguínea, cita a média dos intracelulares $6,8 \times 3,2 \mu\text{m}$ (5,2 a 8,4 x 2,8 a 4,2 μm N = 179) e a dos extracelulares $6,8 \times 210 \mu\text{m}$ (5,6 a 7,7 x 1,4 a 3,5 μm ; N= 8).

Como a duração da parasitemia, que varia de 25 a 46 DPI, coincidiu com a maturação da segunda geração de merontes (26 a 33 DPI), como foi reportado por FAYER & JOHNSON (1973),

esta pode ter relação com o ciclo vital do parasito e seus efeitos sobre o hospedeiro, mas se essas variações estão relacionadas ao parasito ou ao hospedeiro, permanece por ser determinado.

FAYER (1979), conforme cita CERNÁ (1983), considerou que merozoítas de *S. bovicanis* (*S. cruzi*) foram capazes de se multiplicar durante o transporte no sangue. Também CERNÁ (1981) considerou tal fato quanto a *S. dispersa*, estudado em sangue periférico e órgãos de camundongos experimentalmente infectados.

Quanto à evolução dessa parasitose, FAYER & JOHNSON (1973) e FAYER et al, (1976b) acusam a formação de merontes em órgãos do corpo de animais experimentalmente infectados. Após tal fase, apenas se encontram cistos típicos da infecção clássica por *Sarcocystis* na musculatura cardíaca e esquelética (FAYER & JOHNSON, 1974). e no tecido nervoso. A análise, quanto à infectividade, mostrou que cistos imaturos, na fase de metrócitos, não são infectivos para cães que não eliminaram esporocistos nas fezes até 40 DPI (FRELIER et al. 1977).

Esses cistos, segundo OGASSAWARA et al. (1978), são alongados, divididos em compartimentos e de membranas delgadas, sugerindo ser a espécie *S. cruzi*, para a qual o cão tem sido considerado como o hospedeiro definitivo.

OGASSAWARA & BENASSI (1980) relataram que a existência de três espécies distintas de *Sarcocystis*, tem sido de-

monstrada em condições naturais bem como experimentais na musculatura bovina, bem como os estudos em microscopia eletrônica realizados por GESTRICH et al. (1975) demonstraram que, na musculatura de bovinos infectados com esporocistos coletados de fezes de cães, gatos e homem, há desenvolvimento de três tipos de cistos morfológicamente diferentes, levando estes autores a concluir, dessa observação, que *S. fusiformis*, tal como descrito na literatura, corresponde à fase do ciclo evolutivo de pelo menos três espécies distintas, e que são infectantes para o cão, o gato e o homem.

GESTRICH et al. (1975) e GOMES & LIMA (1982) verificaram nítida diferença na espessura da parede ao descreverem as formas dos cistos encontrados em bovinos: *S. hominis* (5,4 a 6,9 μm , $\bar{X} = 5,9$); *S. hirsuta* (3,8 a 5,4 μm , $\bar{X} = 4,7$) e *S. cruzi* (0,5 μm). Estas mesmas conclusões foram assinaladas por TADROS & LAARMAN (1976) na Holanda e BOCH et al. (1978) na Alemanha, como sendo três diferentes tipos de cistos.

b. Hospedeiro definitivo

Bradizoítas ou cistozoítas de cistos maduros, sem passar por merogonia, rapidamente diferenciam-se em gametas, dentro de 1 DPI, havendo fertilização e formação de zigoto, o qual se transforma em oocisto que esporula ainda no intestino, liberando os esporocistos (DUBEY & FAYER, 1983).

SHIMURA et al. (1981) assinalaram estádios extrain-

testinais presentes nos linfonodos mesentéricos de cães infectados experimentalmente com *S. cruzi*. Observações semelhantes também foram feitas por BOTELHO & LOPES (1984), quando 4 de 5 cães, após serem infectados com músculo cardíaco bovino contendo cistos de *S. cruzi*, eliminaram esporocistos nas fezes 7 a 12 DPI, e quando sacrificados 60 DPI, esporocistos semelhantes àqueles das fezes foram encontrados em linfonodos mesentéricos.

2.5. Aspectos clínicos

2.5.1. Hospedeiro intermediário

a. Sinais clínicos

Duas espécies de *Sarcocystis* são altamente patogênicas para seus hospedeiros bovino e ovino, pois sob condições experimentais se observam sinais clínicos generalizados, incluindo miocardite (FAYER & LUNDE, 1977), anemia, anorexia, perda de peso, morte (FAYER & JOHNSON, 1973, 1974; FAYER, 1974a; JOHNSON et al., 1975; MUNDAY et al., 1975; FRELIER et al., 1977; GILES et al., 1980; FAYER & PRASSE, 1981; GOMES & LIMA, 1982 e BOTELHO, 1985), e aborto (FAYER et al., 1976b).

O estágio da doença e o número de sarcocistos observados nos tecidos não têm relação com a severidade da doença, ainda que experimentalmente sinais clínicos pareçam estar re-

lacionados ao número de esporocistos ingeridos (FAYER & JOHNSON, 1973; JOHNSON et al., 1975; LEEK & FAYER, 1978).

Referindo-se ao período clínico da doença, JOHNSON et al. (1975) relatam que aos 23 DPI os sinais clínicos representados por anorexia, desidratação, perda de peso, anemia e fraqueza progrediram, e aos 23 a 26 DPI, bezerros inoculados com esporocistos de *S. fusiformis* (*S. cruzi*) de cães morreram ou foram eutanasiados, assinalando que opistótono e extensão dos membros ocorreram em três animais, e que outros animais infectados, mortos antes de 23 DPI, e os controles, não tiveram qualquer alteração clinicopatológica. MAHRT & FAYER (1975) fizeram observações semelhantes, e citam que o aparecimento dos sinais ocorreu de 21 a 28 DPI, e que as mortes ocorreram, uma no 29° e outra no 34° DPI. Além dos já mencionados, FAYER et al. (1976b) observaram sinais clínicos caracterizados por nervosismo e espasmos clônicos intermitentes com tremores de 7, a 10 DPI, os quais eram intensificados quando as vacas eram estressadas por pesagem e colheita de sangue, e hipersalivação, primeiramente notada 4 a 8 SPI, e se prolongando por 1 a 19 semanas; os pêlos em todos os animais foram quebradiços e perderam o brilho, da 8ª à 16ª SPI. Três vacas perderam todos os pêlos nos últimos 2,5 a 3,5 cm da cauda.

GOMES & LIMA (1982), inoculando bezerros com 200.000 ou 500.000 esporocistos de *S. cruzi* e examinando-os a partir dos 15 DPI, não observaram reações imediatas, embora isolamentos posteriores tenham determinado que os animais se torna-

ram infectados.

De acordo com DUBEY & FAYER (1983), a severidade da doença clínica está dependente do número de esporocistos ingeridos; dentro de 4 a 6 SPI, bovinos experimentalmente inoculados com 100.000 ou mais esporocistos tiveram febre de 2 a 30 dias, anemia (sangue aquoso, coagulação irregular), anorexia, diarréias ou fezes amolecidas, fraqueza muscular, hiper-salivação, tremores musculares, perda de pêlos (particularmente em torno dos olhos, pescoço e ponta da cauda) e nervosismo; alguns bovinos morreram como resultado de tais infecções. Além disso, FAYER et al. (1983), ao infectar vacas Holstein múltiparas com 60.000 esporocistos de *S. cruzi*, observaram, além de sinais da doença, diminuição na produção de leite.

b. Desenvolvimento ponderal

FAYER et al. (1976a) inocularam *S. fusiformis* (*S. cruzi*) de cães em bovinos adultos e observaram não só que o consumo de alimentos começou a diminuir a partir de 4 SPI, e aumentaram gradualmente a níveis originais em 3 a 5 semanas; uma das vacas, contudo, comeu progressivamente menos até 60 DPI, quanto então estava moribunda, sendo sacrificada; observaram, ainda, que todas as vacas perderam peso entre a 7^a à 14^a SPI, com perda média de 112 kg, variando de 77 a 154 kg.

Em ovinos infectados experimentalmente com 100.000 esporocistos de *S. ovicanis* (*S. tenella*), LEEK & FAYER (1980)

observaram que os animais ganharam menos peso do que os controles, embora as diferenças não fossem significativas, devendo-se levar em consideração que a morte de dois dos quatro ovinos do grupo infectado influenciou marcadamente no peso médio do grupo.

c. Temperatura, pulso e movimentos respiratórios

FAYER et al. (1976b) relatam que a temperatura normal do bovino, que varia de 38,0 a 39,1°C, foi excedida em todas as vacas inoculadas com *S. fusiformis* (*S. cruzi*) de cães, dando pico médio de 40,1°C entre a 4ª e a 6ª SPI, e novamente, entre a 14ª e a 16ª SPI, agora com pico médio de 39,9°C na maior parte do tempo.

Com o mesmo objetivo, temperatura corpórea de bezerros inoculados com 200.000 esporocistos de *S. cruzi* foi verificada diariamente por FAYER & LYNCH (1979), observaram então, devido a ocorrência de febre que parasitos viáveis foram utilizados.

Num surto de sarcocistose em novilhas leiteiras, FRELIER et al. (1977) observaram que alguns animais tiveram febre, enquanto outros estavam com temperatura, pulso e movimentos respiratórios dentro dos limites normais na ocasião do exame clínico.

Em ovinos inoculados com 200.000 esporocistos de *S. ovicanis* (*S. tenella*), LEEK & FAYER (1980) observaram que os a-

nimais tiveram temperatura média mais alta aos 14 DPI (41°C) e aos 25 DPI (41,5°C).

GOMES & LIMA (1982) não observaram alterações nos índices normais de frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos do rúmen em bezerros infectados com 200.000 ou 500.000 esporocitos de *S. cruzi*.

2.5.2. Hospedeiro definitivo

Sarcocystis geralmente não é patogênico para carnívoros, conforme afirmam DUBEY & FAYER (1983); acrescentam esses autores que cães, coiotes e outros carnívoros criados em laboratório e aos quais carne bovina pesadamente infectada foi administrada, eliminaram grande número de esporocistos, porém, não ficaram doentes, ainda que houvesse vômito e inapetência por um ou dois dias. Não foi estabelecido se esses sinais clínicos estavam relacionados à infecção por *Sarcocystis* ou à dieta.

2.6. Aspectos epidemiológicos

2.6.1. Prevalência das formas do *Sarcocystis*

a. Hospedeiro intermediário

Protozoários do gênero *Sarcocystis* têm sido encontra-

dos em músculos estriados (esquelético e cardíaco) de alta porcentagem de bovinos através do mundo (CORNER et al., 1963; KALLAB, 1966; GARRO et al., 1971; LEVINE, 1973; KRUIJF et al., 1974; MUNDAY et al., 1975; MEADS, 1976; FRELIER et al., 1977; SCHMITZ & WOLF, 1977; BOCH et al., 1978; FASSI-FEHRI et al., 1978; GILES et al., 1980; COLLERY & WEAVERS, 1981; CARRIGAN, 1986). No Brasil, as observações feitas até o presente aparentemente não são diferentes, pois GOMES & LIMA (1982) verificaram a frequência de 95,8% de *Sarcocystis* sp. em fragmentos musculares de 168 bovinos provenientes de várias regiões do Estado de Minas Gerais.

b. Hospedeiro definitivo

Trabalhos conduzidos no Brasil fazem referência apenas à frequência de *S. cruzi* em pesquisas de esporocistos em fezes de cães alimentados com coração bovino (OGASSAWARA et al. 1977, 1978).

OGASSAWARA et al. (1980), ao examinarem fezes de 100 gatos de distintas raças, idades, de ambos os sexos e de diferentes áreas da cidade de São Paulo, encontraram 9% de animais positivos para *Sarcocystis* sp., e PEREIRA JÚNIOR & BITENCOURT (1981), realizando 10.475 exames de fezes no Rio de Janeiro, encontraram 332 (3,74%) positivos para *S. hominis*.

2.6.2. Fatores inerentes à dispersão do *Sarcocystis*

a. Hospedeiro intermediário

1. Sarcocistose aguda

O bovino é hospedeiro intermediário de três espécies de sarcosporídeos, *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*, sendo os caninos, felinos e primatas, respectivamente, os hospedeiros definitivos (LEVINE, 1977). As espécies referidas para felinos e primatas são pouco patogênicas e praticamente não determinam sinais clínicos; entretanto, *S. cruzi* causa doença aguda severa e mesmo morte em bezerros, e aborto em vacas (GESTRICH et al., 1975; JOHNSON et al., 1975; FAYER et al., 1976b; MEADS, 1976; FRELIER et al., 1979; BOTELHO, 1985). Muitos sinais foram semelhantes àqueles descritos por CORNER et al. (1963), que não encontraram evidência de transmissão intra-uterina de *Sarcocystis*, porém, organismos lembrando o parasito foram observados em placentas e cérebros de bezerros abortados (MUNDAY & BLACK, 1976).

MARKUS et al. (1974), ao comparar a descrição de parasitos não identificados por CORNER et al. (1963) no surto da chamada doença, de Dalmeny no gado canadense, com merontes de *Sarcocystis* produzidos experimentalmente em fim de bezerro, e com esporozoários não identificados de um bezerro naturalmen-

te infectado, na Inglaterra, concluíram que esses protozoários não identificados deviam ser considerados como do gênero *Sarcocystis*.

FAYER & LEEK (1979) conseguiram, com sucesso, por meio de transfusão sanguínea, transferir merozoítas de *S. cruzi*, *S. tenella* e *S. suihominis* de hospedeiros intermediários para outros indivíduos da mesma espécie. Em determinado experimento com *S. tenella*, tanto animais de experimento como controles mostraram cistos intramusculares; esses autores assinalaram que os controles adquiriram alguns cistos como resultado de contaminação com esporocistos que poderiam ter sido carreados nas mãos ou roupas dos tratadores dos animais; observaram também que sinais clínicos de sarcocistose não foram vistos nos transfundidos nem nos controles.

2. Sarcocistose crônica

Vários relatos têm sugerido uma associação entre nódulos pequenos, acinzentados, na carne, e *Sarcocystis*, sendo possível que as lesões ocorram quando os sarcocistos degenerem.

O papel de *Sarcocystis* como causador de miosite eosinofílica em bovino, ovino e outros animais não é claro, podendo a reação no músculo estar associada com a futura ou desenvolvimento de cistos.

Enquanto alterações patológicas musculares suspeitas

de serem causadas por *Sarcocystis*, têm sido freqüentemente mencionadas (BLAZER et al., 1976; MEHLHORN & HEYDORN, 1977), muitos autores têm observado pouca ou nenhuma reação inflamatória em torno de cistos intactos de várias espécies de *Sarcocystis* de mamíferos (BURGISSER, 1975; KARR & WONG, 1975; MEHLHORN et al., 1975; ROMMEL & GEISEL, 1975; ZAMAN & COLLEY, 1975; VILES & POWELL, 1976).

Lesões de ruptura de cistos na sarcocistose murina experimental consistiram em infiltração granulocítica seguida de infiltração mononuclear e finalmente fibrose (RUIZ & FRENKEL, 1976), e camundongos com infecções severas tiveram dificuldade para se locomover.

b. Hospedeiro definitivo

Em geral, *Sarcocystis* tem mais especificidade para seus hospedeiros intermediários do que para os definitivos, observando-se virtualmente uma estreita margem de hospedeiros intermediários e ampla margem de hospedeiros definitivos. Assim, bovinos domésticos (*Bos taurus* e *B. indicus*) e bisão (*Bison bison*) são os únicos hospedeiros intermediários descritos até o presente para *S. cruzi*, entretanto, cães (*Canis familiaris*) (HEYDORN & ROMMEL, 1972; FAYER & LEEK, 1973; FAYER et al., 1973; SUTEU & COMAN, 1973; FAYER, 1974a; ROMMEL et al., 1974; VERSHIMIN, 1974), raposas (*Vulpes vulpes*) e lobos (*Canis lupus*) (ROMMEL et al., 1974; FAYER et al., 1976a), coiotes (*Canis la-*

trans) (FAYER, 1974a; FAYER & JOHNSON, 1975) e mão-pelada (Procyon lotor) (FAYER et al., 1976a) são alguns dos hospedeiros definitivos já descritos.

Outro aspecto importante a ser considerado é que bovino tem três espécies de *Sarcocystis*. ocorrendo pelo menos nove espécies do parasito em cães.

Carne bovina infectada com *Sarcocystis*. estocada por dois a oito dias a 4°C ou por 18 dias a 2°C, infectou gatos (GESTRICH & HEYDORN, 1974; MARKUS et al., 1974). Contudo, *Sarcocystis* não infectava cães ou gatos se a carne fosse aquecida a uma temperatura interna de 65 a 70°C por 10 min, ou se fosse mantida a -20°C por mais de três dias (GESTRICH & HEYDORN, 1974; FAYER, 1975).

FAYER (1976) teve sucesso em infectar cães com carne moída bovina obtida em supermercado, e coração bovino refrigerado por três dias; por outro lado, carne congelada por sete dias perdeu a infectividade.

Esporocistos podem ser eliminados por carnívoro infectado, por um período de meses, e contaminação ambiental por esporocistos é a fonte de infecção do hospedeiro presa (DUBEY & FAYER, 1983).

FAYER (1980) observou que, nos dias de pico de eliminação, a média alcançava 145.000 a 408.400 esporocistos por animal e que o número médio de esporocistos eliminados por cães que receberam 454 a 908 g de carne variou de 861.000 a mais de 20 milhões, e sugeriu, com base em suas pesquisas, que o

longo período de patência e a facilidade com que os cães se locomovem de um lugar para outro, podem promover uma grande disseminação de esporocistos em determinada área. Contudo, se esses animais ficassem confinados em uma área restrita, aumentariam as possibilidades de uma concentração maciça de esporocistos nesse local. Por outro lado, apesar de admitir a alta contaminação do meio ambiente com esporocistos de *Sarcocystis*, esse autor admite também que mais estudos são necessários, a fim de se esclarecer o papel do cão e outros animais na cadeia epidemiológica de transmissão da sarcocistose, particularmente nos casos de criações extensivas de bovinos.

c. Hospedeiros-transporte

Artrópodes coprófagos e pássaros podem contribuir para a disseminação de esporocistos de fezes de mamíferos, e uma implicação evolutiva de um longo período de patência de *Sarcocystis* num pássaro migratório poderia ser aquela em que a mesma espécie de *Sarcocystis* poderia tornar-se estabelecida em roedores não relacionados e constituindo a presa do pássaro em diferentes regiões zoogeográficas.

Presentemente, é aparente que os esporocistos livres conhecidos há vários anos, do homem (como *Isospora hominis*), gatos, cães e vários carnívoros silvestres são aqueles de várias espécies de *Sarcocystis* (MARKUS, 1978).

Baseando-se em dados experimentais, MARKUS (1978) le-

vantou a hipótese de que esporocistos depositados, por regurgitação ou de outra maneira, sobre esterco bovino por um grupo de moscas coprofílicas poderiam, por seu turno, ser transferidos a bovinos por outro grupo de moscas, pois os esporocistos poderiam facilmente ser ingeridos pelos bovinos ao lamberem a pele e narinas. O mesmo autor refere ainda que, no laboratório, baratas atuaram como vetores experimentais de *Sarcocystis murino*.

A viabilidade de duas espécies de *Sarcocystis* bovino parece não ser afetada por passagem através do intestino de moscas, como julgado pela a habilidade dos esporocistos em desencistar. Esse fato, junto com a descoberta de que moscas transportam esporocistos de *Sarcocystis*, sugere que moscas coprofílicas podem desempenhar um papel na distribuição desses coccídios no meio ambiente; contudo a freqüência com que os coccídeos podem ser disseminados desse modo, e sua relação com a prevalência marcadamente alta na infecção com *Sarcocystis*, registrada em bovino e alguns outros hospedeiros intermediários em vários países, ainda têm de ser avaliadas por outros estudos a campo.

Considerando o assunto em outro organismo da família, BIGALKE (1960) mostra que *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) Henry, 1913 pode ser transmitida pela mosca sugadora *Glossina brevipalpis*, por muitos tabanídeos e *Stomoxys calcitrans*, o que ele considerou como um modo mecânico de transmissão. O mesmo autor (1967) também estabelece que cistos tissulares de

B. besnoiti podem reter sua viabilidade por até 9 anos, enfatizando que gado bovino cronicamente infectado pode ser um importante reservatório natural para transmissão por artrópodes a gado indene. Entretanto, especula-se um significativo papel de ixodídeos na transmissão de *B. besnoiti*, mostrando que gado no Kazaquistão pôde tornar-se infectado no inverno, quando dípteros estavam completamente ausentes na região. Esse autor sugeriu então que carrapatos ixodídeos poderiam desempenhar um papel na transmissão do parasito ao gado.

Segundo FAYER & LEEK (1979), não são conhecidos artrópodes vetores participando na disseminação de *Sarcocystis* entre hospedeiros intermediários; além disso, pelo volume de sangue que artrópodes vetores podem transmitir mecanicamente, a possibilidade de que tais vetores estejam envolvidos na transmissão desses parasitos tem de ser estudada.

2.7. Imunologia e sorologia

2.7.1. Relações imunológicas do *Sarcocystis*

Imunidade cruzada entre *Sarcocystis* e outros coccídios tipo *Isospora* não foi demonstrada por MARKUS (1978), e quando gatos que estavam eliminando esporocistos de conhecida espécie de *Sarcocystis* foram super-infectados com *Toxoplasma*, resultou na produção de oocistos deste parasito (PIEKARSKI & WITTE, 1971; FRENKEL, 1973); ainda, gatos que eram imunes a

Toxoplasma e que previamente tinham sido infectados com *Hammondia*, foram susceptíveis a *Sarcocystis*, como foi o caso de um gato que previamente tinha sido infectado com o que aparentemente era uma espécie de *Besnoitia* (RUIZ & FRENKEL, 1976). Infecção prévia de carnívoros com *Isospora* spp. pareceu não conferir imunidade a *Sarcocystis* (ROMMEL et al., 1972; HEYDORN & ROMMEL, 1972); inversamente, infecção prévia de gatos com *Sarcocystis* de bovino não tornaram os animais imunes a subsequente infecção com *I. felis* (*C. felis*) (MARKUS, 1978).

Soros de pessoas passando *I. hominis* (*S. hominis*) foram testados pelo teste do corante para *Toxoplasma* (LAARMAN & Mas BAKAL, 1971) e pelo teste de imunofluorescência indireta (TIFI) (ARIEETAY & PIEKARSKI, 1976; MARKUS, 1978), porém, reação cruzada com *Toxoplasma* não foi observada. Vários outros autores, incluindo MARKUS (1978), MUNDAY et al. (1975), ARYEE-TEY & PIEKARSKI (1976), RUIZ & FRENKEL (1976), FRELIER et al. (1977) e LUNDE & FAYER (1977), também falharam nas tentativas de encontrar qualquer reatividade cruzada entre *Sarcocystis* e *Toxoplasma*, em vários testes sorológicos.

Alguns baixos títulos obtidos no TIFI, quando antígeno *Sarcocystis* foi testado com soro de camundongo positivo para *Besnoitia* (RUIZ & FRENKEL, 1976), podem representar ligeira antigenicidade comum. Também TADROS & LAARMAN (1976) obtiveram forte reação cruzada entre *Sarcocystis* e *Frenkelia*, no mesmo teste, porém, nenhuma reação cruzada com *Toxoplasma*. Tanto *Sarcocystis* como *Frenkelia* tiveram ligeira afinidade com *Besnoitia*.

Os mesmos autores demonstraram que diferentes espécies de *Sarcocystis* repartem antígenos.

DUBEY & FAYER (1983) comentam que as altas taxas de prevalência (75 a 100%) de infecção com *Sarcocystis* em animais de fazenda sugerem que o parasito é bem tolerado pelo hospedeiro intermediário; entretanto, doença clínica resultou quando grandes números (10.000 ou mais) de esporocistos foram ingeridos de uma vez. Idade do animal não parece ser um fator na resistência à doença, tendo sido observado processo agudo e severo em bezerros, natural e experimentalmente infectados. Vacas multíparas, algumas com cerca de 7 anos de idade, foram tão susceptíveis quanto bezerros. Imunidade passiva via transferência de anticorpos através do colostro parece não proteger da sarcocistose clínica nem fornecer imunidade protetora entre diferentes espécies de *Sarcocystis* no mesmo hospedeiro, isto é, infecção de bezerros com *S. hirsuta* não protege contra subsequente infecção com *S. cruzi*, e infecção de baixo grau (natural ou experimental) não protege contra o desenvolvimento de doença aguda após infecção com grande número de esporocistos.

2.7.2. Imunocinética da sarcocistose

Bovinos inoculados experimentalmente com *S. bovis* (*S. cruzi*) foram monitorados para o aparecimento de anticorpos específicos e de linfócitos na circula-

ção periférica. Na 4ª SPI observou-se imunoglobulina da classe IgG na membrana dos eritrócitos (FRELIER & LEWIS, 1984) bem como difusa no plasma, observando-se na 5ª e 6ª SPI IgM circulante. O aumento de IgM foi breve, retornando quase ao normal dois a três meses pós-infecção (MPI), em contraste com IgG 1, cujo nível permaneceu alto até cinco a seis MPI. Não se observou IgG 2 nem IgA.

Segundo FAYER & LUNDE (1977), os anticorpos contra *Sarcocystis* em bovinos, inoculados experimentalmente, pertenceram principalmente à classe IgM, que se mostrou de seis a nove vezes mais concentrada do que IgG até à 5ª SPI. Os níveis de IgG tornaram-se, por sua vez, cerca de 17 a 27 vezes maiores que os de IgM da 10ª à 13ª SPI.

Títulos de anticorpos à hemoaglutinação indireta (HAI) em vacas de 5 a 8 anos de idade que receberam esporocistos de cães aumentaram ligeiramente após infecção (FAYER et al., 1976b); esse mesmo teste foi avaliado num surto de sarcocistose clínica em bezerros leiteiros, mostrando-se útil (FRELIER et al., 1977).

Nos ovinos, IgG comportou-se de maneira similar à observada em bovinos, exceto quanto ao aumento, um pouco mais lento (6 a 8 SPI) e à ausência de IgM. Linfócitos específicos para *Sarcocystis* apareceram na circulação periférica de bovinos aos 15 DPI e em ovinos não foram observados até três a quatro SPI (GASBARRE et al., 1984).

Ovinos jovens e adultos infectados com esporocistos

de cães e gatos desenvolveram anticorpos para fixação de complemento entre 15 e 47 DPI (MUNDAY & RICKARD, 1974; MUNDAY et al., 1975); anticorpos circulantes mostrados pelo TIFI, primeiro apareceram entre 28 e 35 DPI, em bezerros que tinham recebido 250.000 esporocistos de cães (NEDJARI et al., 1976), sendo encontrados títulos de 1:40 a 1:60, dependendo do tempo decorrido depois da inoculação.

Em suínos infectados com *S. suicanis* e *S. sui hominis* e em camundongos com *S. muris*, a detecção de anticorpos circulantes através de ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), TIFI e HAI iniciou-se 14 DPI (HOFER et al., 1982; NEUMAYER, 1982; WEYRETER & O'DONOGHUE, 1982). Em suínos inoculados com 40.000, 80.000 e 120.000 esporocistos de *S. suicanis*, os anticorpos circulantes ocorreram entre 56 a 100, 50 a 100 e 56 a 81 DPI respectivamente, e seus títulos decresceram para 1:16 ou negativo, 1:8 a 1:32 e 1:16 a 1:32 aos 152 DPI, não se observando correlação entre o número de esporocistos inoculados e o título de anticorpos circulantes (NEUMAYER, 1982). Títulos ao TIFI de 1:512 a 1:4000 foram obtidos depois da inoculação de camundongos (soronegativos antes da infecção) com esporocistos de *S. muris* de gatos (RUIZ & FRENKEL, 1976).

2.7.3. Imunidade a reinfecções

a. Hospedeiro intermediário

O desenvolvimento, pelo hospedeiro intermediário, de

imunidade protetora contra reinfecções com estádios tissulares generalizados e musculares necessita melhor elucidação. Contudo, é seguro especular que, devido ao contato imediato entre os estádios merogônicos e os órgãos internos durante a fase pré-sarcocística e à prolongada persistência de sarcocistos viáveis no músculo, os estádios no hospedeiro intermediário são provavelmente mais imunogênicos do que os estádios gametogônicos, que são restritos ao trato intestinal do hospedeiro definitivo; ainda, o efeito de sarcocistos rompidos, em infecções de longa duração no hospedeiro intermediário, sobre o aumento da imunidade protetora contra nova infecção, é fascinante tópico para futura investigação (TADROS & LAARMAN, 1976).

Suínos com oito semanas de idade foram imunizados por inoculação de 103 esporocistos de *S. miescheriana* (infecção subclínica). Os animais, separados em grupos de animais imunizados e de não imunizados, sofreram desafio homólogo com 3.10^6 esporocistos aos 40, 80, 120 e 160 dias pós-vacinação (DPV). Os vacinados sobreviveram aos desafios dos 40 e 80 DPV e não mais daí em diante. Os não vacinados morreram de sarcocistose aguda.

Outro tipo de imunização em suínos por 40.000, 80.000 e 120.000 esporocistos de *S. suicanis* revelou que a reinfecção aos 56 DPV não influenciou na formação de anticorpos (NEUMAYER, 1982).

DUBEY (1983b) imunizou caprinos, por via oral, com 10.000 esporocistos viáveis de *S. capracanis*, e os submeteu a

desafio 84 DPV. Um animal vacinado que recebeu 100.000 esporocistos abortou 16 dias pós-desafio (DPD) e morreu de ruptura uterina; outro morreu de doença aguda 23 DPD e dois fetos reabsorvidos foram encontrados em seu útero; outro pariu dois fetos prematuros 22 DPD e mãe e filhos morreram no mesmo dia, e outro em boa saúde foi sacrificado e dois fetos saudáveis foram nele encontrados. Dos vacinados e não desafiados, um morreu 64 DPV por toxemia da gestação com dois fetos reabsorvidos e outro pariu em tempo normal, mas os fetos morreram ao nascer. Dos desafiados e não vacinados, um abortou 15 DPD e outros 5 morreram de doença aguda entre 21 a 25 DPD.

Em outro experimento, DUBEY (1983a) imunizou 50 cabras de dois a três meses de idade com esporocistos de *S. capracanis*. Os animais foram desafiados aos 95, 113, 274 e 305 DPV. Os que sobreviveram à vacinação (46%) também sobreviveram ao desafio letal. A avaliação do tamanho do inóculo para imunização, feita por DUBEY (1981), mostrou que imunizações com 1000 a 10.000 esporocistos estimulam imunidade protetora contra a dose letal de *Sarcocystis*, enquanto as de 100 não protegem.

b. Hospedeiro definitivo

Possível imunidade adquirida, de curta duração, em doninhas, a *Sarcocystis* de arganaz, foi observada; contudo, o parasito normalmente parece estimular pouca ou nenhuma imuni-

dade a hospedeiro carnívoro, que pode tornar-se infectado repetidamente (TADROS & LAARMAN, 1976). Os mesmos autores obtiveram sucesso em reinfestar cães repetidamente com *Sarcocystis* cardíaco bovino, sem aparente redução na quantidade dos esporocistos excretados. Observações similares sobre o mesmo parasito foram feitas por FAYER (1974b), enquanto reinfecções de gatos com *Sarcocystis* de ovino foram estudados por ROMMEL et al. (1972).

Portadores humanos de *Isospora hominis* (*S. hominis*) podem eliminar esporocistos por longos períodos (vários anos), o que sugere repetida reinfecção pela fonte de carne; por outro lado, repetidos exames fecais de duas pessoas que comiam carne bovina crua como dieta regular diária, falharam em revelar esporocistos de *S. hominis*, sugerindo-se a possibilidade de que uma dose diária regular de *Sarcocystis* possa ter muito mais sucesso em estabelecer imunidade protetora do que grandes doses separadas por grande intervalo de tempo (LAARMAN, 1964).

ROMMEL et al, (1972) ministraram sarcocistos macrocópicos de ovino a oito gatos, depois de ter cessado a eliminação de esporocistos na primeira infecção; nenhum dos animais foi imune, e todos eliminaram esporocistos após 12 a 16 dias, por 25 a 47 dias.

Sete cães foram reinfestados com *Sarcocystis* bovino, após cessar a eliminação de esporocistos (HEYDORN & ROMMEL, 1972); eles liberaram esporocistos por várias semanas, come-

çando 10 a 12 dias após a primeira alimentação de esôfago moído, no experimento de reinfecções.

Voluntários humanos com infecções patententes de *Barco-cystis* bovino foram superinfectados sem dificuldades (ARYEETAY & PIEKARSKI, 1976),

2.8. Diagnóstico imunológico

Segundo O'DONOGHUE & WEIRETER (1983), tem havido, desde que foi reconhecido que *Sarcocystis* pode causar doença severa e mesmo fatal em bovino, ovino e suíno, crescente procura de um teste diagnóstico específico para o diagnóstico clínico da infecção causada por esses parasitos, afirmando os autores que, mais do que procurar aumentar a segurança do método clássico em detectar estádios parasitários em biopsias ou material de necropsia (que obviamente não é praticável em todas as situações clínicas), deve-se tentar obter técnicas para demonstrar a existência de anticorpos específicos do hospedeiro, dirigidos contra o parasito, pois, ainda que algum sucesso tenha sido relatado quanto ao imunodiagnóstico de infecções císticas tissulares latentes (O'DONOGHUE, 1978, 1981; REITER et al., 1981), muitos testes imunossorológicos têm falhado em detectar anticorpos específicos suficientemente cedo, no curso da infecção, para permitir o diagnóstico da doença na fase aguda. Recentemente, algum sucesso foi obtido no sorodiagnóstico de infecções agudas em ovinos e camundongos ex-

perimentalmente infectados, pelo uso de um ensaio imunoabsorvente da imunoglobulina M ligada a enzima (ELISA) (O'DONOGHUE & WEYRETER, 1982); contudo, esse teste não foi ajustado para sorodiagnóstico de infecções agudas em todas as espécies de animais hospedeiros, visto que não permite a detecção precoce de anticorpos, no curso de infecções, em suínos (O'DONOGHUE & WEYRETER, 1983).

Avaliando a taxa de imunoglobulinas em ovinos e suínos jovens recém-nascidos, através do TIFI, e correlacionando-os com os achados dos exames macroscópicos e microscópicos da musculatura desses animais, feitos após digestão desta, ARRU et al. (1978) observaram alto título no TIFI; entretanto, a correlação com a presença do parasito no músculo foi irregular e inconfiável.

WEYRETER & O'DONOGHUE (1982) acompanharam, através do TIFI e do ELISA, a imunocinética de 16 suínos e 220 camundonfos infectados com 1000 esporocistos de *S. miescheriana* (*S. suicanis*) e *S. muris* respectivamente, utilizando antígeno solúvel e intacto, preparados de cistozoítas coletados por extração mecânica de cistos macroscópicos de *S. muris* e *S. gigantea* (*S. ovifelis*) e também de cistozoítas coletados por digestão triptica de cistos microscópicos de *S. miescheriana*. Anticorpos específicos para todos os antígenos foram detectados nos animais infectados e os títulos eram altos tanto nas reações homólogas quanto nas heterólogas. Os testes empregando antígenos preparados por extração mecânica foram mais reagentes do

que aqueles preparados pela digestão triptica. Os resultados dos exames foram positivos a partir do 177 DPI para ELISA e do 28° ao 35° DPI para o TIFI.

Reações imunes pelos testes de ELISA e HAI foram observadas em camundongos após simples e repetida infecção com esporocistos de *S. muris* e *S. dispersa* (HOFER et al., 1981).

Suínos infectados com esporocistos de *S. suicanis* e *S. sui hominis* apresentaram título aos 14, 21 e 28 DPI pelos testes de HAI, ELISA e TIFI, respectivamente (NEUMAYER, 1982).

Em caprinos e bovinos que receberam inoculações homólogas e heterólogas com *Sarcocystis*, apenas uma, de quatro vacas reinfetadas, teve aumento de título para os testes HAI, ELISA e TIFI, além de transitório aumento de título nos quatro caprinos reinfetados. O diagnóstico de títulos nos caprinos que continham cistos (comprovados por exame de musculatura) era estabelecido a 1:40 pelo TIFI e HAI e 1:80 pelo ELISA.

De 674 caprinos abatidos, 556 mostraram cistos de *Sarcocystis*, e destes, 85% foram positivos a 1:40 pelo TIFI e 73% pelo HAI; 30 dos 556 infectados foram negativos para ambos os testes e dos 118 negativos parasitologicamente, 71 foram positivos por ambos os testes, 23 pelo TIFI e 17 pelo HAI (REITER et al., 1981),

Segundo WEILAND et al. (1982), as melhores combinações de testes imunológicos para diagnóstico da sarcocistose em bovino é HAI e TIFI e em suíno, HAI e ELISA, enquanto em

caprino o teste que mostrou melhor resultado foi o TIFI; para esses testes, os melhores antígenos são os cistozoítas.

Para o diagnóstico em bovinos infectados experimentalmente, LUNDE & FAYER (1977), usando HAI e difusão em ágar, constataram anticorpos de 30 a 45 DPI e o título chegou a 1:39.000 aos 90 DPI e aos 30 DPI sendo o título bastante significativo aos 65 a 90 DPI, respectivamente.

Em búfalos, SHUKLA & VICTOR (1976), utilizando o teste de fixação de complemento (TFC) encontraram 100% positivos contra 62% de positividade pelo exame histológico.

BORDJOCHKI et al. (1978) avaliaram a eficiência dos testes TFC e TIFI usando anticorpos anti-*Sarcocystis* obtidos através de inoculações intravenosas em coelhos, utilizando várias espécies de *Sarcocystis* e concluíram que TFC é muito sensível ao anticorpo em infecções homólogas, mas detecta apenas um terço em infecções heterólogas. O TIFI também foi bastante sensível a anticorpos do gênero *Sarcocystis*, mas não suficientemente específico para distinguir entre espécies.

Um ensaio imunoenzimático (DAS-ELISA) foi estabelecido e testado por O'DONOGHUE & WEYRETER (1983); anticorpos específicos a vários antígenos *Sarcocystis* spp. foram isolados de soro imune de coelho e usados no ensaio para reconhecer antígenos circulantes de *Sarcocystis* em animais experimentalmente infectados. Para isso, dois modelos parasito-hospedeiro, diferindo marcadamente no grau de patogenicidade para o hospedeiro intermediário, foram examinados: *S. miescheriana*,

altamente patogênico (ZIELASKO et al., 1981), e *S. muris*, relativamente apatogênico (BLEWASKA, 1981), observando os autores desse ensaio que DAS-ELISA provou ser altamente específico, e sensível pelo menos para facilitar não apenas o imunodiagnóstico da sarcocistose clínica, porém, também infecções que foram subclínicas em natureza, durante a fase aguda da infecção, e concluíram que os ensaios em suínos e camundongos foram sensíveis o bastante para detectar significantes níveis de antigenemia ocorrendo durante infecções subclínicas. No caso de infecções letais, é provável que o diagnóstico pudesse ser realizado rapidamente, pelo menos para permitir um suficiente regime de tratamento quimioterápico, devido ao intervalo de tempo relativamente curto envolvido entre a apresentação de sintomas da doença e morte do hospedeiro; contudo, muito mais informações epidemiológicas são necessárias para estabelecer o real significado de infecções por *Sarcocystis*, já que a doença clínica, não letal, causada por certas espécies de parasito, tem sido implicada em perdas na produção e na reprodução (FAYER, 1980). Há necessidade de uma técnica específica que permita o diagnóstico diferencial da infecção aguda por *Sarcocystis*. Ensaio imunoenzimáticos para detecção de antígenos circulantes podem satisfazer essa necessidade; contudo, extensos estudos são necessários para se determinar se os ensaios podem ser usados para detectar antígenos circulantes em outras espécies animais, hospedeiras, infectadas com outras espécies de *Sarcocystis* (O'DONOGHUE & WEYRETER, 1983).

DUBEY & FAYER (1983) dizem que testes sorológicos, incluindo HAI e ELISA, têm sido úteis no laboratório; eles parecem ser específicos, porém, sua sensibilidade no diagnóstico da infecção aguda precisa ser aumentada. Antígenos para a realização desses testes são preparados por lise de bradizoítas liberados de cistos. Atualmente não existem disponíveis no comércio. Afirmam, ainda, que diagnóstico definitivo de sarcocistose aguda, de ocorrência natural, é difícil porque, na ocasião em que os animais se tornam doentes ou morrem, os merontes já desapareceram.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de trabalho

As instalações utilizadas para o desenvolvimento da parte de campo e laboratório, deste trabalho de tese, foram a Estação Experimental de Itaguaí (bovino de leite), Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro-PESAGRO-Rio, vinculada à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do mesmo Estado, Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, da área de Parasitologia, Departamento de Biologia Animal, Área de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biologia Vegetal da UFRRJ, e Laboratório do Setor de Diagnóstico da Raiva, do Instituto de Veterinária, também da UFRRJ.

3.2. Origem dos animais

3.2.1. Bovinos

Foram utilizadas vacas mestiças holandez x zebu, com

idade entre 3 e 4 anos, gestando no último trimestre, das quais 12 provieram do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite - EMBRAPA, e quatro da Estação Experimental de Itaguaí bovino de leite), da PESAGRO-Rio.

Todos os animais estavam livres de brucelose, leptospirose, vibriose e tricomonose.

3.2.2. Camundongos e coelhos

Camundongos (Suíço albino Webstern) e coelhos (Califórnia) foram doados pelo Setor de Diagnóstico da Raiva (Secretaria do Instituto de Veterinária).

3.3. Obtenção do material infectante

3.3.1. Bradizoítas

Para obtenção de bradizoítas do gênero *Sarcocystis*, corações de bovinos foram examinados por simples escarificação e os parasitados foram usados para infectar cães ou para a obtenção dos bradizoítas através da técnica de digestão triptica descrita por O'DONOGHUE & WEYRETER (1983).

3.3.2. Esporocistos

Esporocistos foram separados das fezes de cães infec-

tados com coração bovino parasitado por sarcocistos de *Sarcocystis*. As fezes positivas eram passadas em peneiras com diâmetros decrescentes de trama, para limpeza e obtenção de uma suspensão de esporocistos; a seguir, a suspensão era distribuída em cálices de Hoffman para obtenção de sedimento rico em esporocistos; após trocas sucessivas do líquido sobrenadante, suspensões finais eram conservadas com adição de bicromato de potássio a 2,5% e deixadas em geladeira (a 5°C aproximadamente) até à hora de uso,

3.4. Infecção experimental

5.4.1. Bovinos

Três grupos de quatro animais cada um foram infectados por via oral com esporocistos de *Sarcocystis cruzi*, obtidos pelo processo indicado. Os animais do grupo 1 receberam 10.000 esporocistos cada um, os do grupo 2, 50.000, e os do grupo 3, 100.000 cada um. O grupo 4, também de quatro animais, permaneceu não infectado, como controle.

A administração dos esporocistos foi feita através de garrafadas, após a retirada do bicromato de potássio do meio de suspensão, através de sucessivas lavagens com água potável. Quando não especificados os grupos, os animais infectados foram considerados em conjunto, independentemente da dose, e designados somente como E, enquanto os não infectados

forão designados como C.

3.4.2. Cães

Cães jovens, sem raça definida, no total de 10 indivíduos, receberam músculo cardíaco bovino obtido em açougues do Distrito de Seropédica, município de Itaguaí, RJ. A cada animal foram oferecidos 500 g de musculatura sabidamente positiva para sarcocistos. Exames de fezes foram feitos diariamente, durante um período de 30 DPI, para pesquisa de esporocistos através do método de flutuação em açúcar, segundo HONER (1965).

3.5. Acompanhamento clínico e colheita de amostras para análise

3.5.1. Exame clínico

Diariamente, a partir do dia da inoculação e até 120 dias após, tomou-se a temperatura corporal e o pulso de todos os animais.

3.5.2. Amostras de sangue e soro para análise

Semanalmente, durante o mesmo período assinalado de 120 dias, foram colhidas amostras de sangue sem anticoagulan-

te, para obtenção de soro após retração total do coágulo.

Todas as amostras de sangue foram obtidas através de punção da jugular.

3.6. Condutas laboratoriais

Para inativação das moléculas de complemento existentes no soro sanguíneo, este foi mantido por 30 minutos a 56°C, em banho-Maria. Para a separação das IgG do soro inativado, pelo fracionamento da cadeia J, adicionou-se 2 mercaptoetanol na proporção 1:2 (v/v).

A separação das Igs séricas foi feita pela adição de sulfato de amônio, purificadas e em seguida inoculações sucessivas de Igs purificadas de bovino foram feitas em coelhos para a produção de Igs anti-Igs-bovina. Em seguida fez-se a conjugação das Igs de coelho com isotiocianato de fluoresceína e a determinação da faixa de diluição ótima para a utilização do conjugado segundo técnicas descritas por HUDSON & HAY (1980).

3.6.1. Teste de imunofluorescência indireta

Neste teste, efetuado segundo KWAPINSKI (1982), o antígeno depositado em lâmina compunha-se de bradizoítas de *Sarcocystis cruzi*, obtidos segundo a forma já indicada (digestão triptica); os bradizoítas fixavam-se à lâmina após secagem ao

ar. As lâminas foram numeradas e marcadas, com esmalte de unha¹ diluído em acetona a 1:5 (v/v), conforme desenho no Apêndice II. As diluições dos soros sanguíneos em teste, nas razões de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, foram feitas em placas de hemoaglutinação, utilizando-se um casulo para cada diluição. Manteve-se completo controle da passagem dos soros pelo fluxograma do teste, conforme Apêndice II, acompanhando desde a entrada dos soros até à confecção das lâminas para leitura. Os soros sanguíneos foram preparados como já indicado para avaliação das quantidades de IgM e IgG presentes, e para avaliação apenas da quantidade da IgG. Para a avaliação somente da IgM estabeleceu-se a diferença entre os resultados do primeiro modelo de teste e os do segundo modelo (Fig. 21).

3.6.2. Teste in vitro de supressão da fagocitose

Com esse teste avaliou-se a influência, na atividade fagocitária dos macrófagos peritoneais de camundongos, das substâncias suspensas no soro sanguíneo das vacas doentes com sarcocistose.

Para tal foi preparada uma seqüência de técnicas:

a) Colheita de sangue de carneiro: foram, colhidas amostras de sangue total, utilizando-se anticoagulante ALSEVER na proporção 1:2 (v/v), os animais doadores pertenciam à Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz (UFRRJ) e não participavam do experimento;

¹ Colorama 1010. Ind. Brasileira.

b) Lavagem das hemácias de carneiro: a separação das hemácias foi realizada por centrifugação a 1000 rpm/10 min; após desprezar o sobrenadante, ressuspendia-se o precipitado em solução salina (0,85%); repetiu-se a operação três vezes;

c) Concentração das hemácias de carneiro: diluíam-se as hemácias de carneiro com solução salina até obter-se concentração final de 0,5%;

d) Sensibilização dos camundongos contra hemácias de carneiro: injeção intraperitoneal de 0,25 ml de hemácias de carneiro a 0,5% foram feitas de seis a sete dias antes da coleta dos macrófagos peritoneais;

e) Extração de macrófagos peritoneais de camundongos: a técnica utilizada para obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos foi descrita por HUDSON & HAY (1980);

f) Concentração de macrófagos: a suspensão refrigerada da lavagem peritoneal de camundongos foi centrifugada a 1.500 rpm/10 min; o precipitado foi ressuspensão em meio Eagle² até obter-se concentração final de 2.10^4 células/ml;

g) Bateria de testes: baterias para teste da supressão da fagocitose usavam hemácias de carneiro lavadas (item 3.6.2., b) na concentração de $1,3.10^6$ hemácias/ml e macrófagos de camundongos preparados conforme item 3.6.2., e, e f.

² Meio de Cultura Eagle, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP.

1ª bateria: 1 ml de hemácias de carneiro;
1 ml de soro bovino com alto título de anticorpos pelo TIFI para sarcocistose;
1 ml de macrófagos de camundongos;

2ª bateria: 1 ml de hemácias de carneiro;
1 ml de soro bovino com baixo título de anticorpos pelo TIFI para sarcocistose;
1 ml de macrófagos de camundongos;

3ª bateria: 1 ml de hemácias de carneiro;
1 ml de meio Eagle;
1 ml de macrófagos de camundongos;

h) reação de fagocitose: as baterias foram incubadas a 37°C/30 min, seguindo-se leitura do número de hemácias nos tubos pelo aparelho COULTER-COUNTER®;

i) dosagem de hemoglobina: a dosagem da hemoglobina foi feita antes e depois da incubação das baterias; foi feita no hemoglobinômetro da COULTER-COUNTER®.

3.6.3. Teste in vivo de supressão da fagocitose

O procedimento para tal teste desenvolveu-se da mesma maneira que no teste in vitro (item 3.6.2.), diferindo apenas em que os soros bovinos, no teste in vivo, foram inocula-

dos intra-peritonealmente nos camundongos (0,2 ml) de 4 a 5 dias antes da extração dos macrófagos e não foram aplicados nos tubos das baterias, recebendo estas, apenas, hemácias de carneiro e macrófagos de camundongos.

3.6.4. Teste da "Placa de Jorne" (quantificação da produção de anticorpos por células imunoativas *in vitro*).

A maneira utilizada para se conhecer a produção de anticorpos por células imunoativas de baço de camundongos, frente ao soro sanguíneo bovino, foi a citada por HUDSON & HAY (1980).

3.6.5. Observação da formação de "capping" pela forma de bradizoíta do *Sarcocystis cruzi*

Para confirmação da formação de "capping" pelos bradizoítas de *S. cruzi*, estria foram confrontados com anticorpos para *S. cruzi* presentes em soro bovino positivo pelo TIFI. Os bradizoítas vivos foram obtidos por digestão triptica de museuatura cardíaca (trem 3.3.1.); após serem separadas da solução digestiva por centrifugação e lavados em tampão fosfato pH 7,2 (PBS), os bradizoítas foram colocados em contato com o soro bovino positivo, e passaram, então, a ser utilizados periodicamente como antígenos para o TIFI (item 3.6.1.).

Os períodos de confronto entre parasito e anticorpo foram de 15 min, 30min, 1h, 1h15min e 1h30min.

3.7. Representação gráfica dos dados

A representação gráfica das médias aritméticas das observações de temperatura e pulso foram feitas pelo sistema de coordenadas com escala decimal.

Para representar as médias das diluições dos soros sanguíneos, positivas para presença de anticorpos, utilizou-se a média geométrica das recíprocas dos títulos das diluições, uma vez que, quando se trata de uma progressão geométrica (i.e. uma seqüência numérica em que cada número difere do precedente por um fator multiplicador), o termo médio coincide com a média geométrica; a propriedade mais importante da média geométrica é que o produto da razão dos desvios dela é igual à unidade. Essa propriedade torna a média geométrica particularmente favorável para médias de razões e para médias de proporções de variação. Calculando a média de razões, o uso da média aritmética, algumas vezes, conduza resultados inconsistentes; tais incosistências podem ser evitadas usando-se a média geométrica (KARMEL & POLASEK, 1974).

5.8. Análise estatística

A avaliação estatística dos dados foi feita através

da análise de variância, utilizando o teste F de Fischer-Snedecor ao nível de significância de 5%. Os dados foram as médias geométricas das recíprocas dos títulos (item 3.7.) das diluições positivas para presença de anticorpos nos soros sanguíneos dos animais doentes, observados semanalmente. Os tratamentos das análises estatísticas foram obtidos pela combinação de dois fatores num esquema fatorial, a saber: três tamanhos de inóculos de esporocistos (10.000, 50.000 e 100.000) para variação de IgG e IgM, e o período de observação (12 semanas); os animais que apresentaram sintomatologia clínica (doentes) e os sadios para variação de IgG e o período de observação; e animais controle (não infectados) e infectados para variação de IgG e o período de observação.

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos clínicos

Dos dados clínicos observados diariamente, pode-se notar que as temperaturas corporais dos animais E estiveram sempre maiores do que as dos animais C, e que a concentração dos picos febris se deu entre 20 e 35 DPI. Diferindo dos grupos 1 e 2, o grupo 3 de animais teve outro pico febril aos 63 DPI. As maiores marcas de febre foram de 39,4°C para o grupo 1, 40,0°C para o grupo 2 e 40,7°C para o grupo 3, enquanto para o grupo 4 a temperatura não excedeu aos 39°C.

Quanto ao pulso, também se notou que a frequência estava sempre maior nas vacas E do que nas C à exceção do que ocorreu aos 56 DPI nos grupos 1 e 3. O período em que houve a concentração dos picos de frequência do pulso esteve próximo dos observados em relação à febre, sendo também bastante discrepantes da curva de flutuação dos animais C e demonstrando as alterações de metabolismo pelas quais a doença faz o organismo do hospedeiro passar em função da fase do ciclo biológico do parasito e da quantidade de inóculo utilizada na in-

fecção (Figs. 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

Notaram-se abortos do 29° ao 65° DPI, conforme mostram as Figuras 9, 13, 14, 17 e 18. Nos animais dos grupos 1 e 2 observou-se apenas um aborto em cada grupo, aos 45 e aos 62 DPI respectivamente (Figs. 10 e 11). No grupo 3 ocorreram dois abortos, um aos 29 e outro aos 65 DPI (Fig. 12). Natimortos ocorreram após 104 DPI, apenas no grupo 1.

4.2. Aspectos imunológicos

4.2.1. Flutuação das imunoglobulinas

A flutuação do nível das imunoglobulinas (Igs) nos animais não infectados foi pequena para a classe IgG. As da classe IgM apresentaram variação bem acentuada, de até 6 diluições, ocorrendo o pico de imunoglobulinemia aos 53 dias de experimento. A análise estatística dessa flutuação de níveis de imunoglobulinas circulantes demonstrou, ao nível de 5% de probabilidade, que houve variação significativa entre os dias de observação (Fig. 8).

O estudo da flutuação de imunoglobulinas nos animais infectados experimentalmente mostrou variações tanto para IgG quanto para IgM, ficando o pico de IgG aos 35 DPI e a concentração de picos de IgM entre 53 e 68 DPI (Fig. 9).

A variação dos níveis de Igs nos animais do grupo 1 teve o maior pico de IgM no início do experimento e teve

níveis altos aos 16, 39, 63 e 81 DPI. Para IgG ocorreram duas elevações dos níveis séricos, a 1ª em torno do 359 DPI e a segunda aos 74 DPI (Fig. 10).

Nos animais dos grupos 2 e 3, IgM esteve elevada no mesmo período entre 53 e 68 DPI, enquanto IgG teve pico aos 35 DPI apenas para os do grupo 3. A análise da variância entre a correlação dos níveis séricos de imunoglobulinas das Figuras 10, 11 e 12 mostrou que não houve, ao nível de 5% de probabilidade, diferença significativa entre as flutuações das imunoglobulinas da classe IgG. Da mesma forma, o mesmo tipo de análise demonstrou também que não houve diferença significativa entre os níveis registrados para a classe IgM (Figs. 11 e 12).

A avaliação comparativa de IgM entre o grupo controle e os dos animais infectados mostrou que a variação da imunoglobulinemia foi semelhante para o período de experimento, a exceção do que ocorreu aos 63 DPI (Fig. 13). Para IgG, entretanto, houve dois picos no grupo dos infectados aos 22 e 35 DPI, não diferindo em nenhum outro momento (Fig. 14).

A avaliação de grupos por resultados mostrou que os picos de Igs ocorreram na mesma época; entretanto, os de IgG das vacas que abortaram ou pariram natimortos foram sempre maiores, enquanto os de IgM foram proporcionais a exceção das observações dos dias zero e 81 DPI. A análise estatística da flutuação de IgG entre estes dois últimos grupos mostrou não haver diferença significativa ao nível de 5%, nem entre as médias dos níveis de parasitemia, nem entre a variação

destas pelos períodos de observação (Figs. 15 e 16).

A comparação da variação do nível de IgM entre os animais controle e o grupo das que abortaram ou pariram natimortos não mostrou diferença acentuada (Fig. 17). Quanto a IgG, houve dois picos bem discrepantes, na imunoglobulinemia das vacas infectadas, que ocorreram no 35° e no 74° DPI (Fig. 18).

O mesmo tipo de comparação entre vacas controles e as infectadas que pariram crias aparentemente saudias mostrou os mesmos resultados, havendo apenas diferenças nos picos de IgG, nas infectadas, que ocorreram aos 22 e 35 DPI. Também se analisou a variância entre a correlação dos picos de imunoglobulinemia dos diferentes grupos E e C, para a variação de IgG e o período de observação; concluiu-se que não houve variação significativa a nível de 5% de probabilidade, nem entre os níveis de IgG, nem entre as médias destas entre as semanas (Figs. 19 e 20).

4.2.2. Teste *in vitro* e *in vivo* de supressão da fagocitose

A reação do teste *in vitro* foi realizada com proporção constante entre macrófagos de camundongos e hemácias de carneiro de 1:3, e a concentração de hemoglobina não variou. A leitura final permitiu avaliar uma diminuição de 3% e 4% da fagocitose, nos testes com soros de baixo e alto título, para pre-

sença de anticorpos contra *S. cruzi*, respectivamente, em relação ao teste controle (Tab, 1).

No teste com reação de fagocitose *in vivo*, a dosagem de hemoglobina também se manteve constante antes e depois do teste. Determinou-se, no final do teste, que houve 91% e 100% de supressão da fagocitose pelos soros negativo e positivo, respectivamente (Tab. 2).

Os períodos em que se detectou a presença de fator imunossupressor no soro sanguíneo de bovinos experimentalmente infectados com *S. cruzi* foram durante ou logo após picos de imunoglobulinemia, principalmente da classe IgG (Figs. 9, 10, 11, 12, 13 e 14).

4.2.3. Avaliação da produção de anticorpos pelas células imunoativas de baço de camundongos com soro de animais inoculados com *S. cruzi*

A leitura final do teste que avaliou a produção de anticorpos pelas células imunoativas de baço de camundongos mostrou a média (N = 3) de 85 halos de hemólise para a placa controle; média de 52 halos de hemólise para a placa de soro com alto título de anticorpo e 46 halos para a placa de soro com baixo título de anticorpos. Os resultados permitem avaliar um total de 39% de supressão da produção de anticorpos no teste com soro sanguíneo positivo para o TIFI.

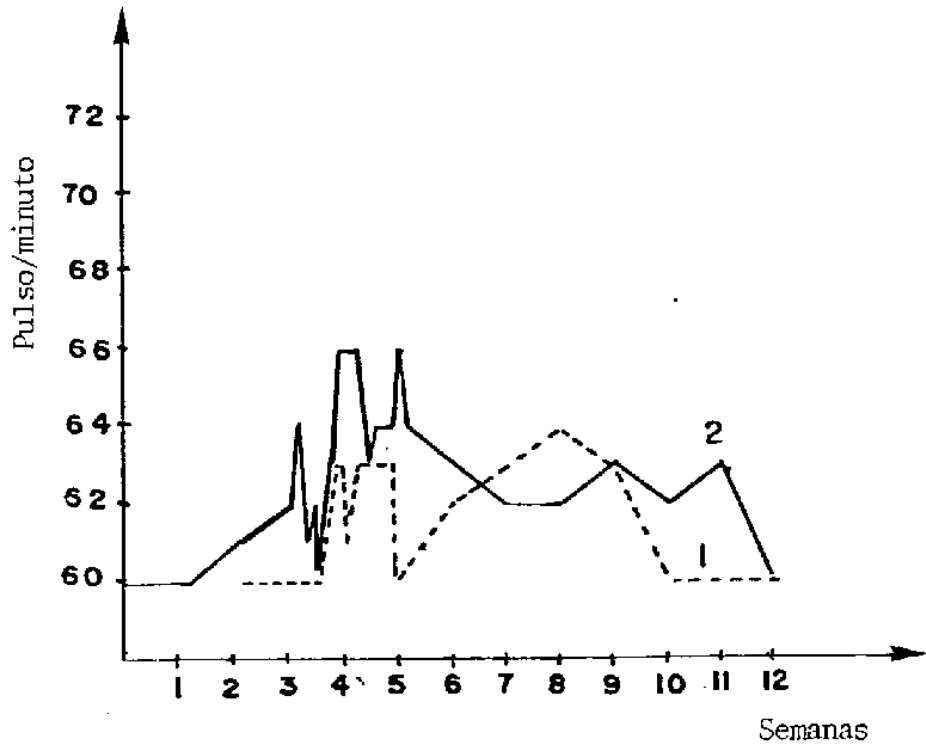


FIGURA 2. Valores médios de pulso de vacas mestiças sadias (I) e com sarcocistose experimental, infectadas com 10.000 esporocistos de *Sarcocystis cruzi* (2), a partir do 5º mês de gestação.

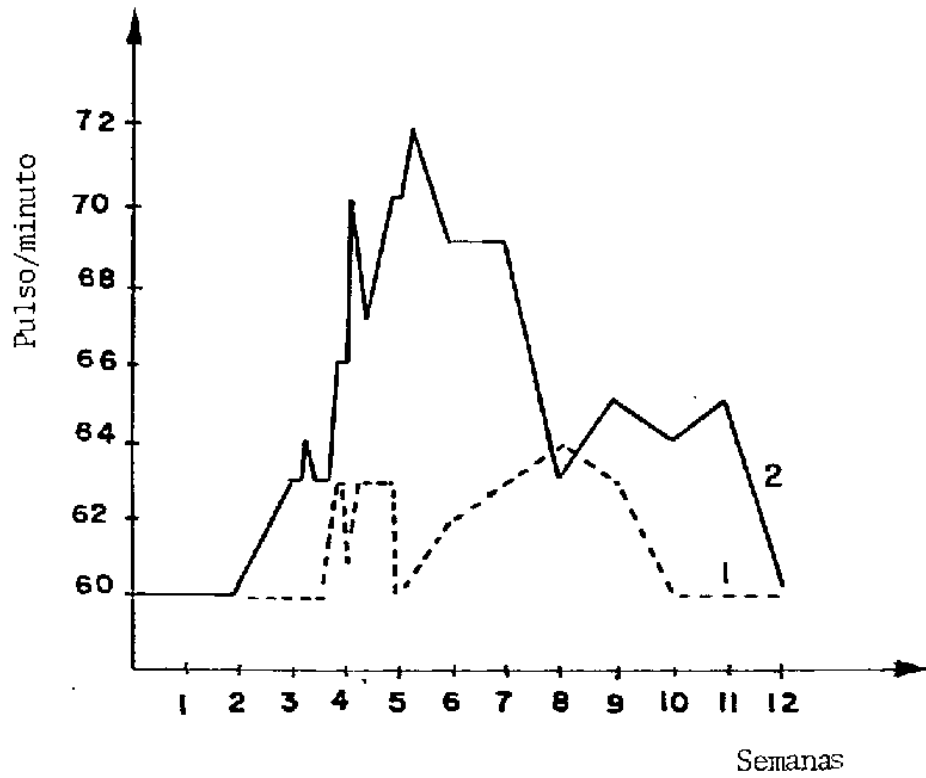


FIGURA 3. Valores médios de pulso de vacas mestiças sadias (1) e com sarcocistose experimental, infectadas com 50.000 esporocistos de *Sarcocystis cruzi* (2), a partir do 5º mês de gestação.

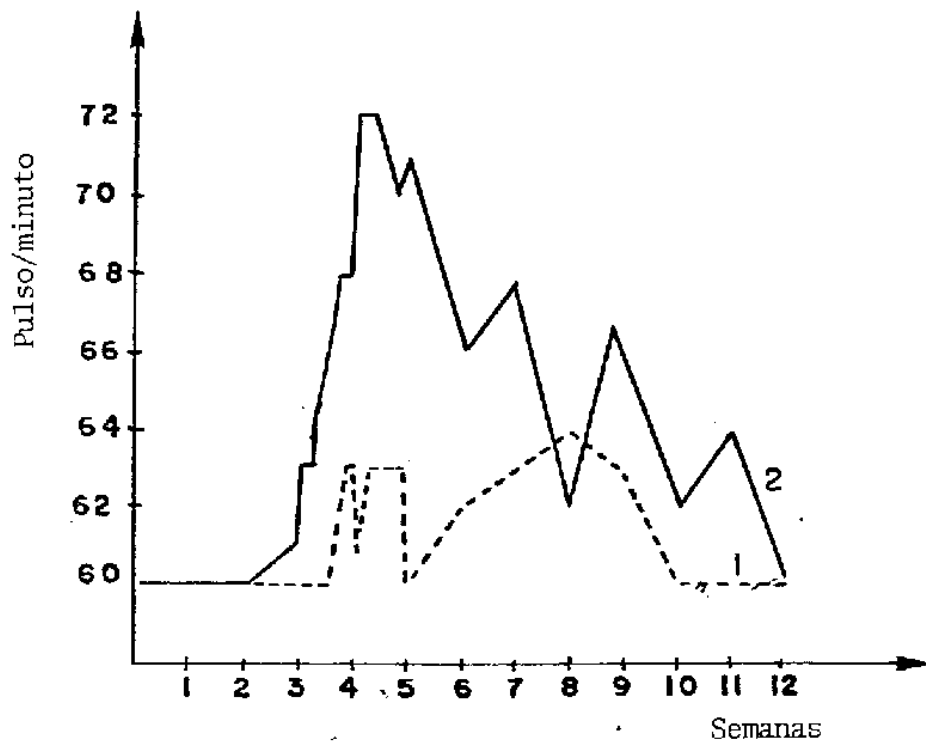


FIGURA 4. Valores médios de pulso de vacas mestiças sadias (1) e com sarcocistose experimental, infectadas com 100.000 esporocistos de *Sarcocystis cruzi* (2), a partir do 5º mês de gestação.

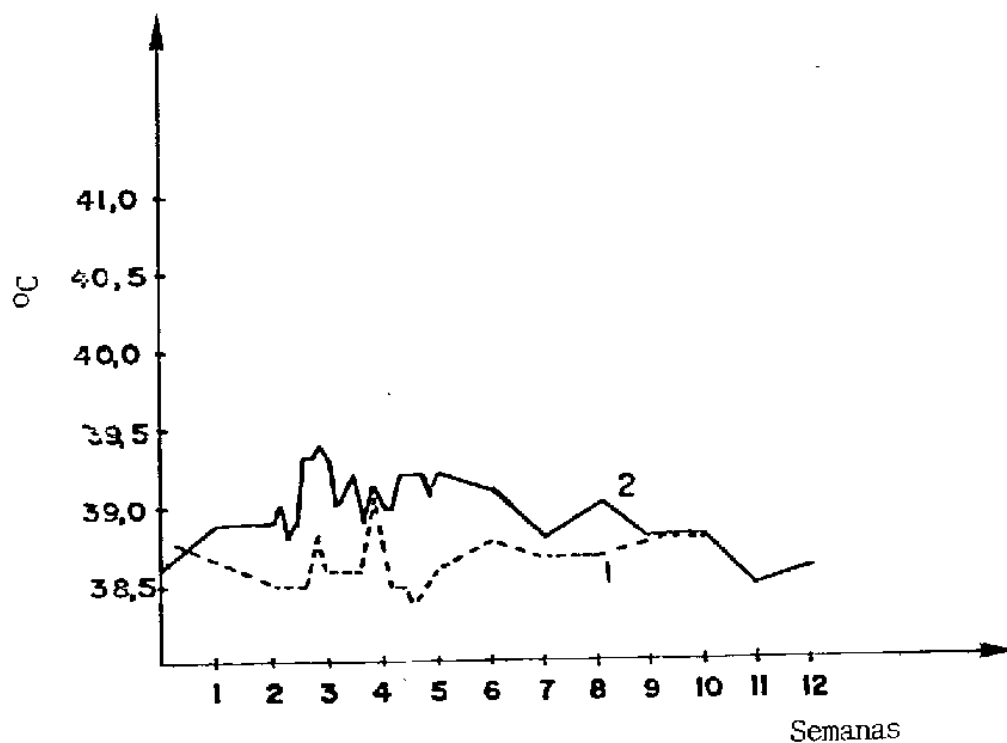


FIGURA 5. Valores médios de temperatura de vacas mestiças sadias (1) e com sarcocistose experimental, infectadas com 10.000 esporocistos de *sarcocystis cruzi* (2), a partir do 5º mês de gestação.

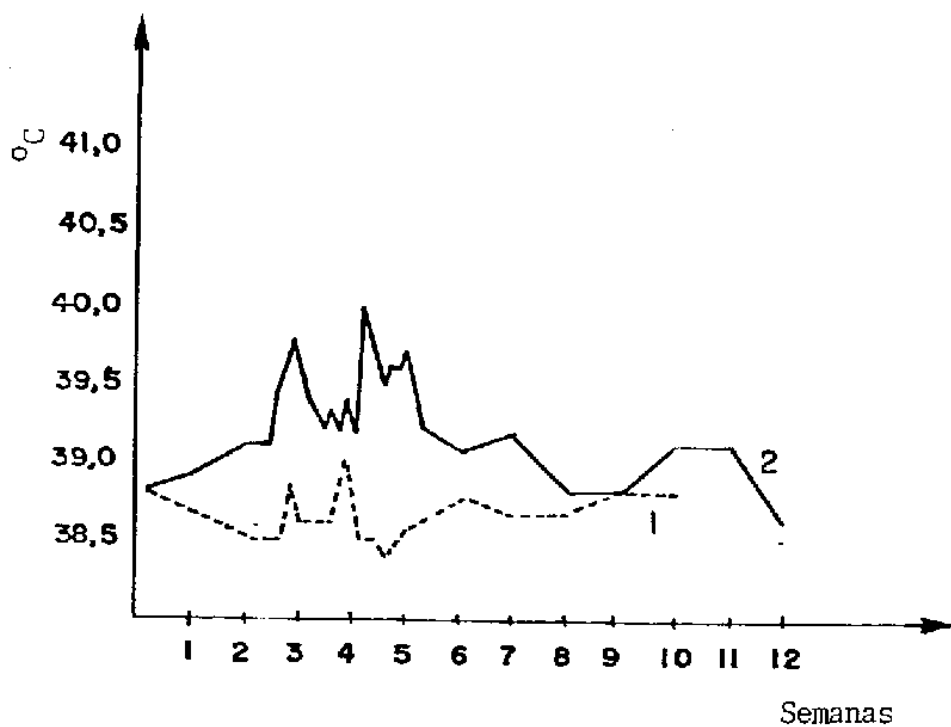


FIGURA 6. Valores médios de temperatura de vacas mestiças sadias (1) e com sarcocistose experimental, infectadas com 50.000 esporocitos de *Sarcocystis cruzi* (2), a partir do 5° mês de gestação.

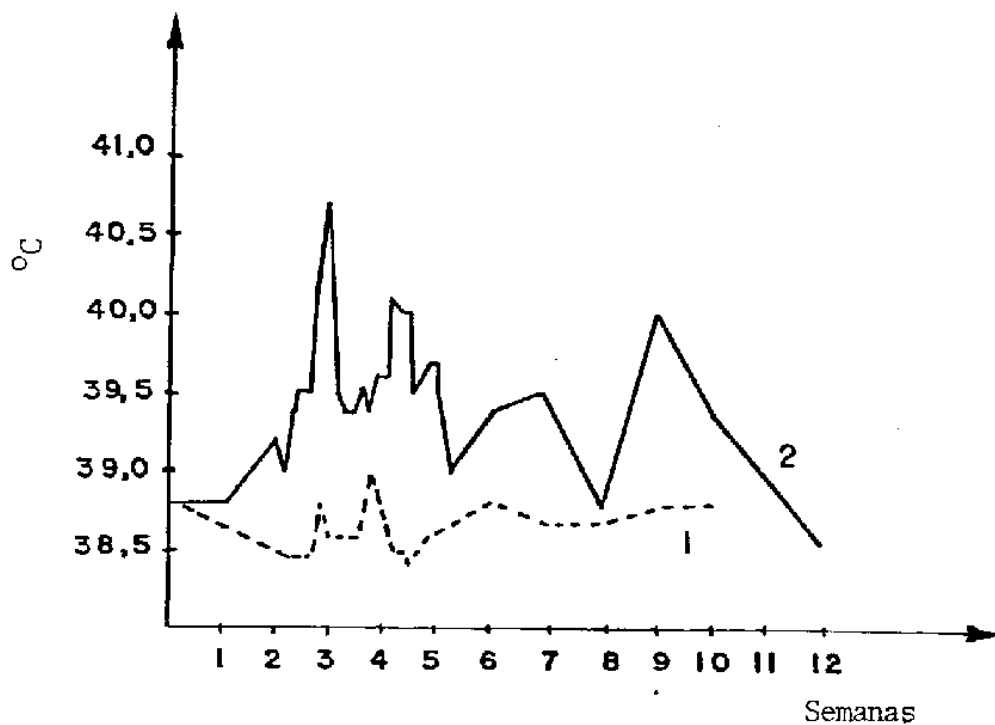


FIGURA 7. Valores médios de temperatura de vacas mestiças sadias (1) e com sarcocistose experimental, infectadas com 100.000 esporocistos de *Sarcocystis cruzi* (2), a partir do 5° mês de gestação.

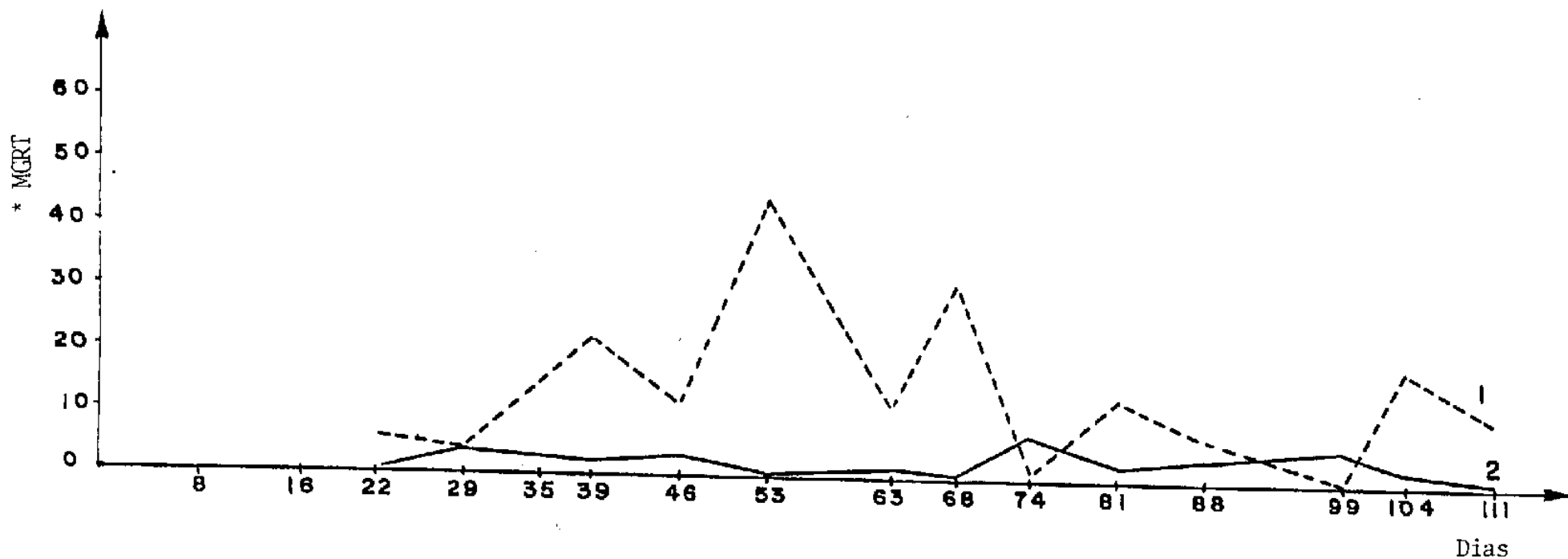


FIGURA 8. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM (1) e IgG (2) anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias, a partir do 5º mês de gestação.

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

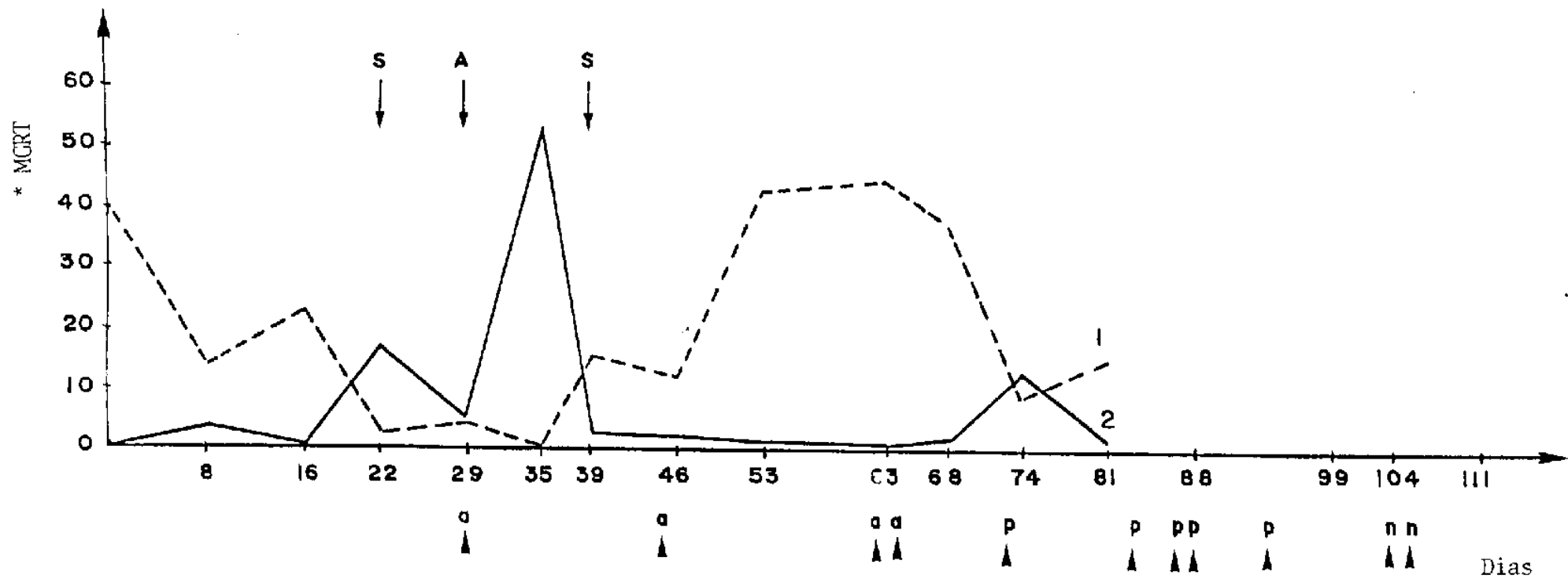


FIGURA 9. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM (1) e IgG (2) anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose infectadas experimentalmente a partir do 5º mês de gestação (S = supressão da fagocitose; A = ausência de supressão da fagocitose; a = aborto; p = parto; n = natimorto).

*Média geométrica da recíproca dos títulos.

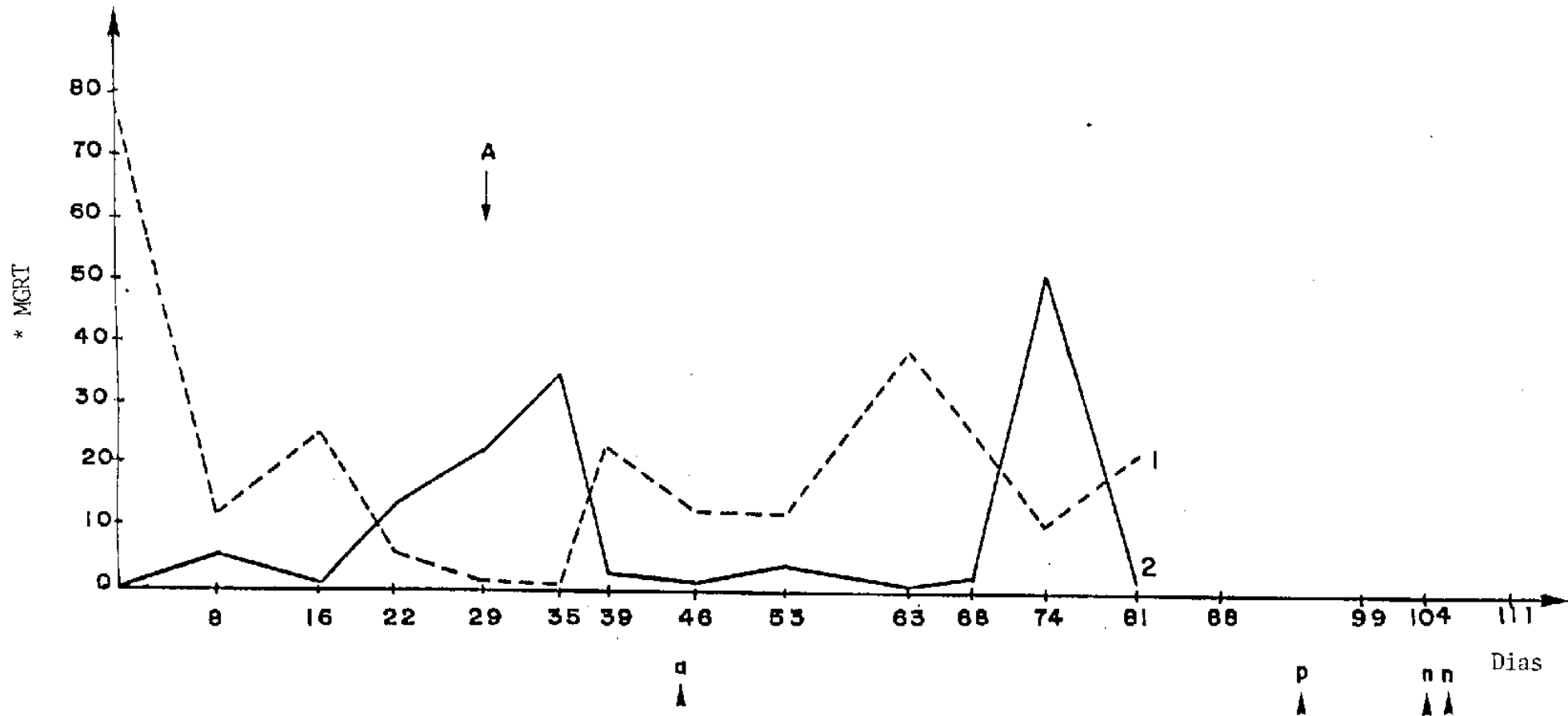


FIGURA 10. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM (1) e IgG (2) anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental, infectadas com 10.000 esporocistos, a partir do 5º mês de gestação (A = ausência de supressão da fagocitose; a = aborto; p = parto; n = natimorto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

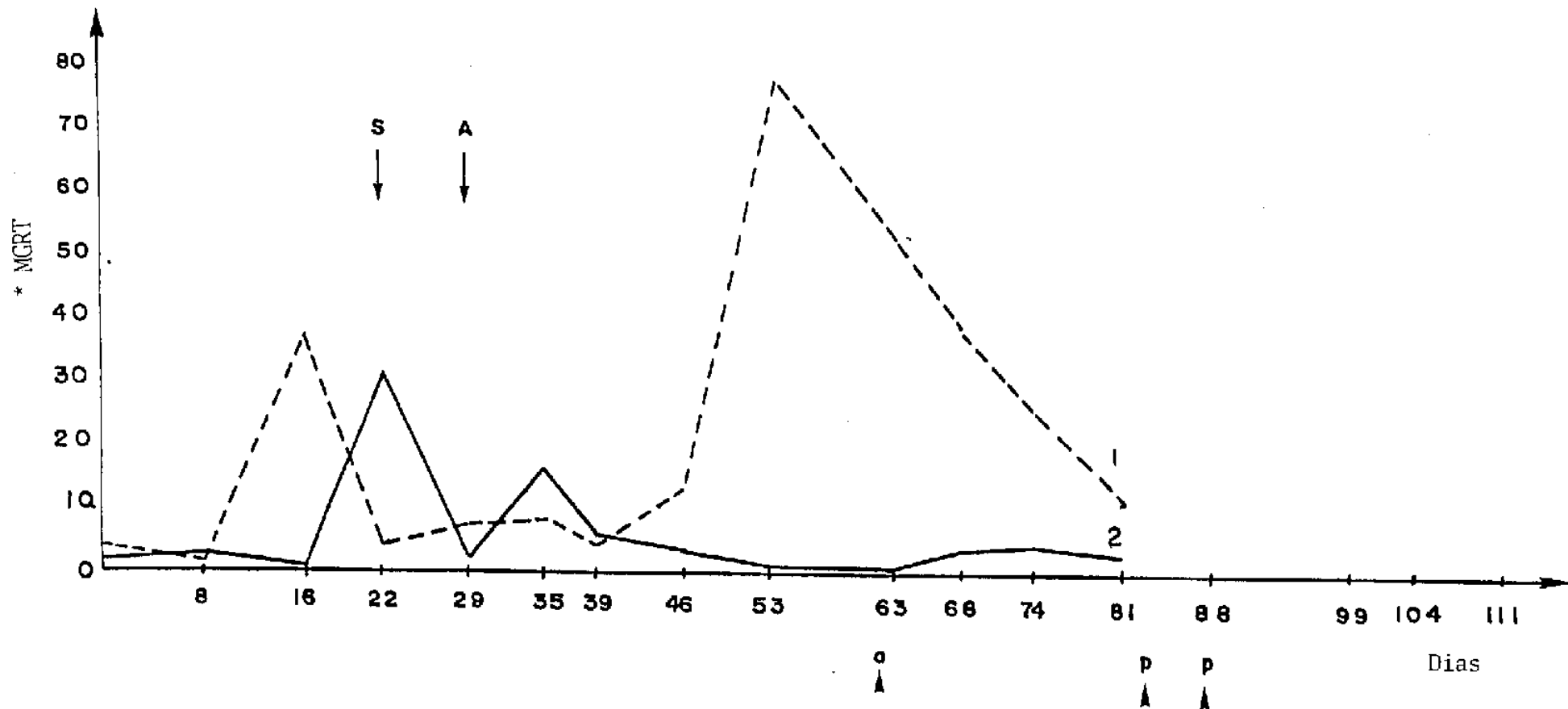


FIGURA 11. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM (1) e IgG (2) anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental, infectadas com 50.000 esporocistos, a partir do 5º mês de gestação (A = ausência de supressão da fagocitose; S = supressão da fagocitose; a = aborto; p = parto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

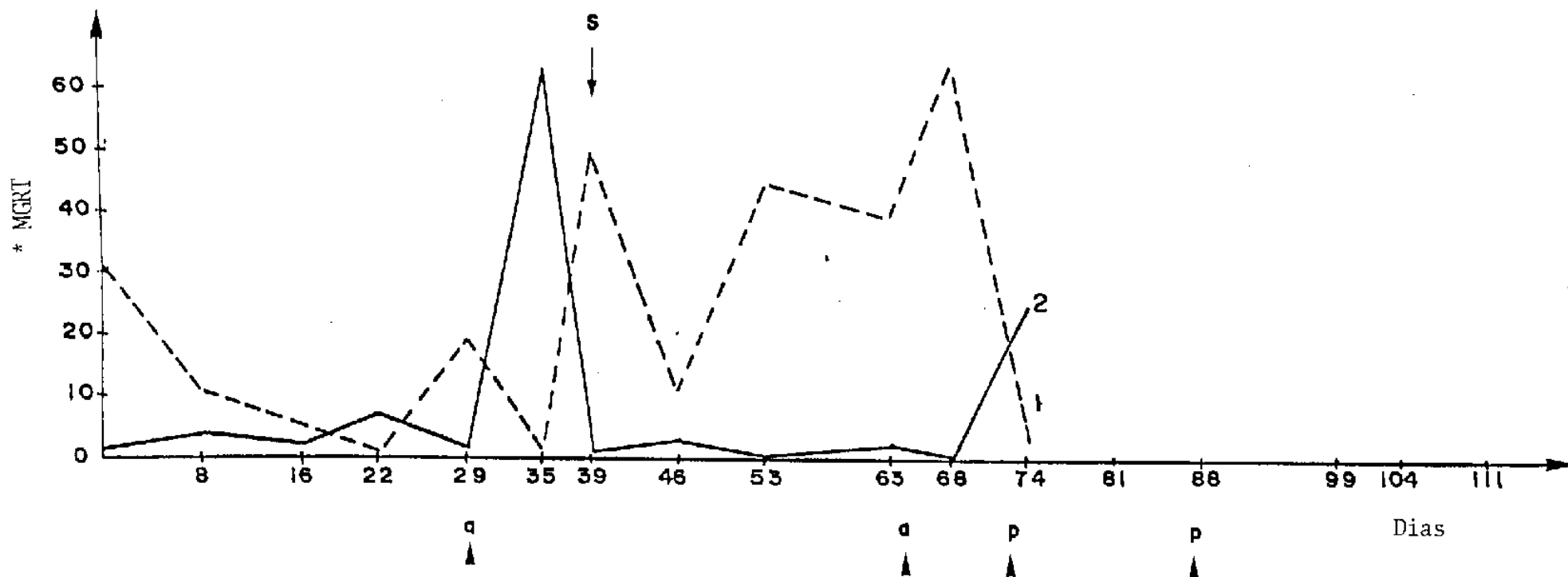


FIGURA 12. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM (1) e IgG (2) anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental, infectadas com 100.000 esporocistos, a partir do 5º mês de gestação. (S = supressão da fagocitose; a = aborto; p = parto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

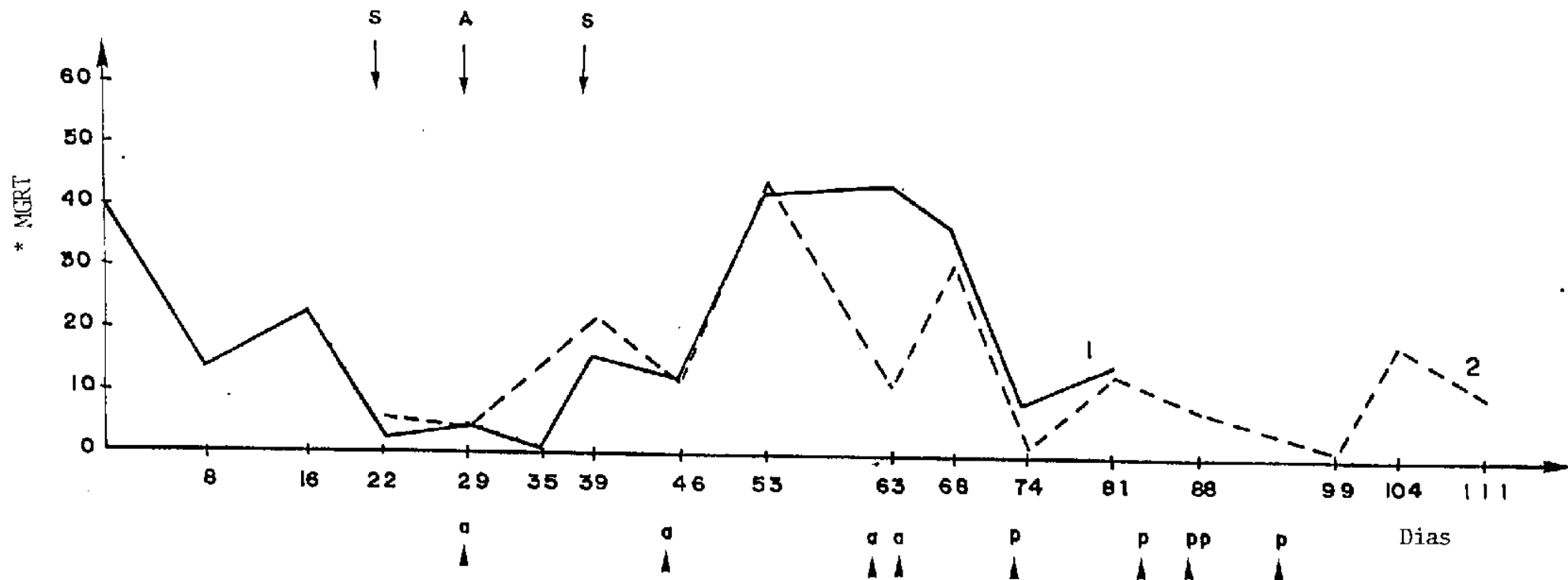


FIGURA 13. Níveis de imunoglobulina M anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental (1) e sadias (2), a partir do 5º mês de gestação (S = supressão da fagocitose; A = ausência de supressão da fagocitose; a = aborto; p = parto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

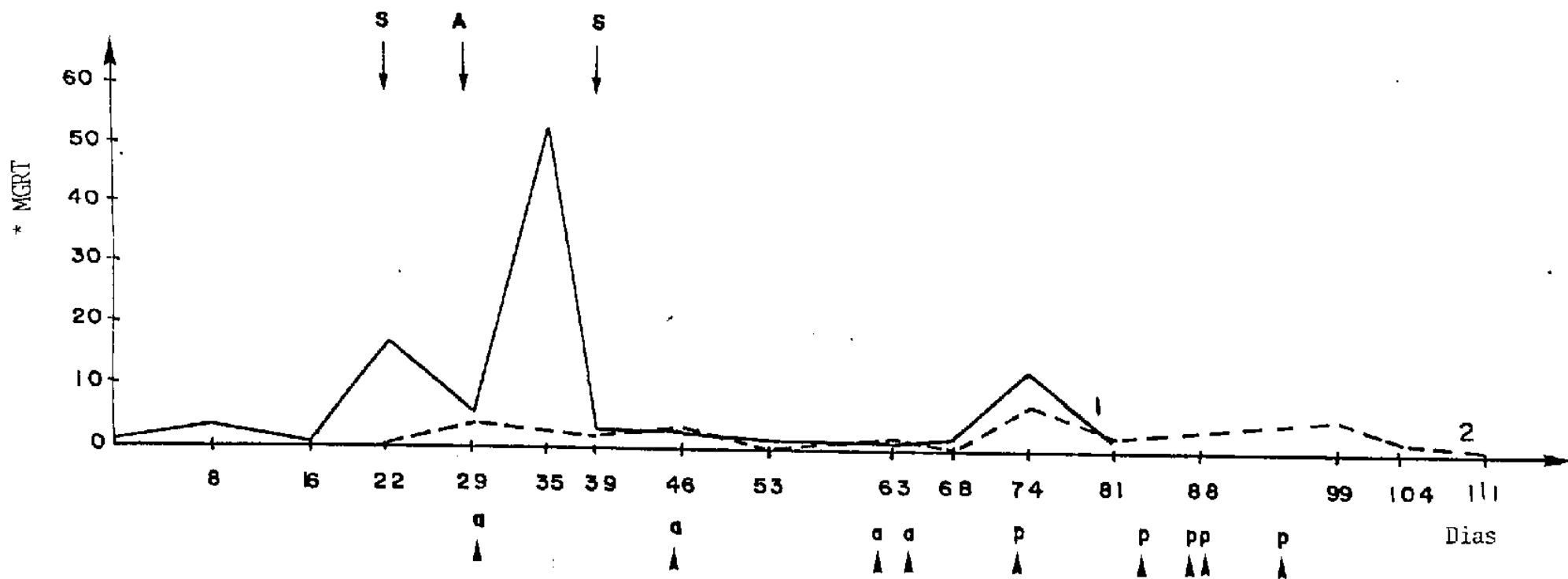


FIGURA 14. Níveis de imunoglobulina G anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental (1) e sadias (2), a partir do 5º mês de gestação (S = supressão da fagocitose; A = ausência de supressão da fagocitose; a = aborto; p = parto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

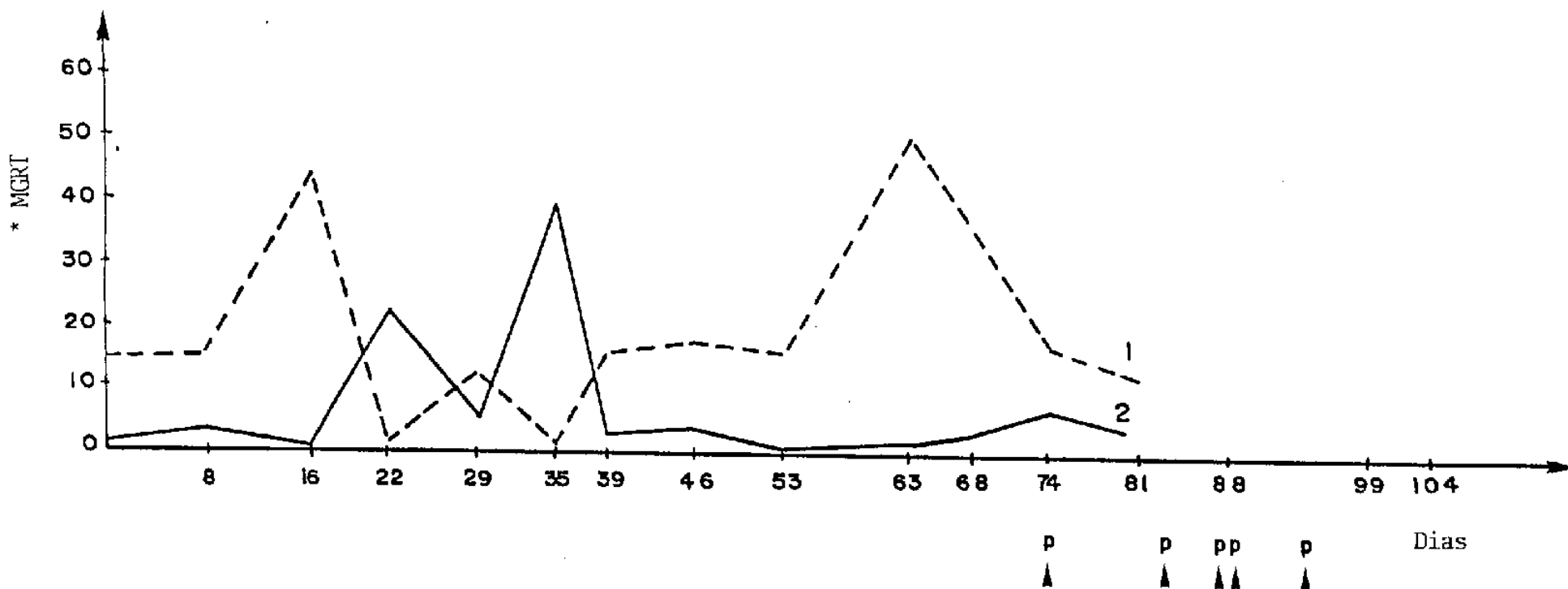


FIGURA 15. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM (1) e IgG (2) anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental, que pariram crias aparentemente saudáveis, a partir do 5º mês de gestação (p= parto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

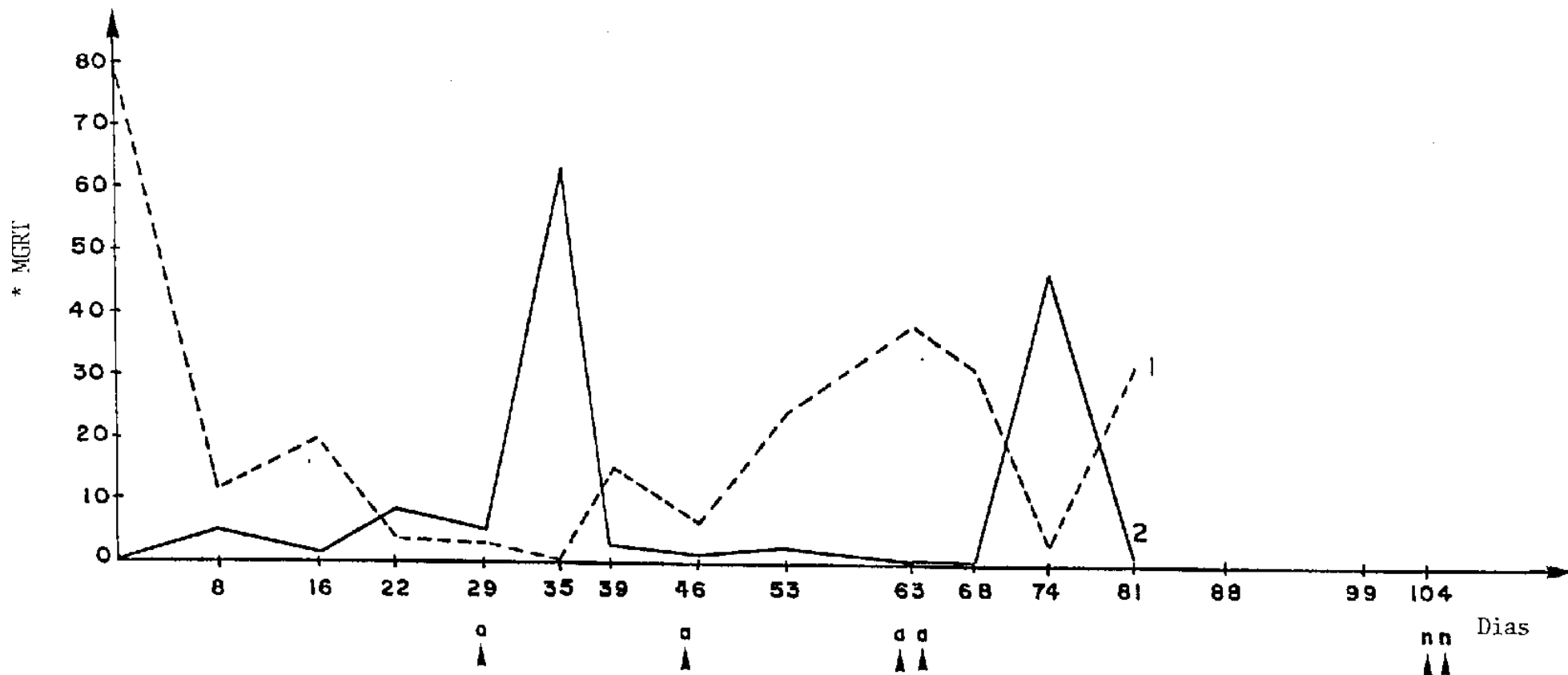


FIGURA 16. Níveis de imunoglobulinas séricas, das classes IgM (1) e IgG (2) anti *Sarcocystis cruzi* detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças com sarcocistose experimental, que abortaram ou pariram natimortos, a partir do 5.º mês de gestação (a = aborto; n = natimorto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

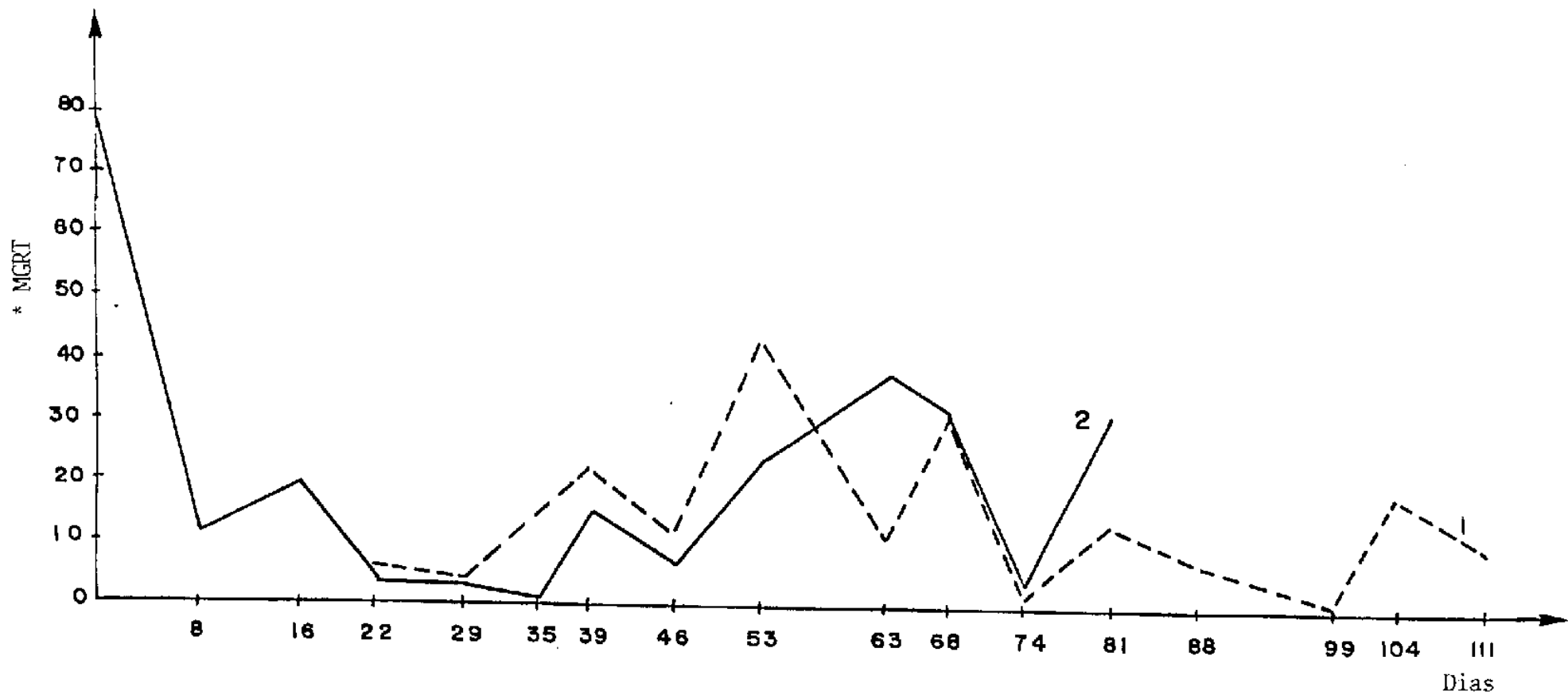


FIGURA 17. Níveis de imunoglobulina M anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias (1), e com sarcocistose experimental que abortaram ou pariram natimortos (2), a partir do 5º mês de gestação (a = aborto; n = natimorto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

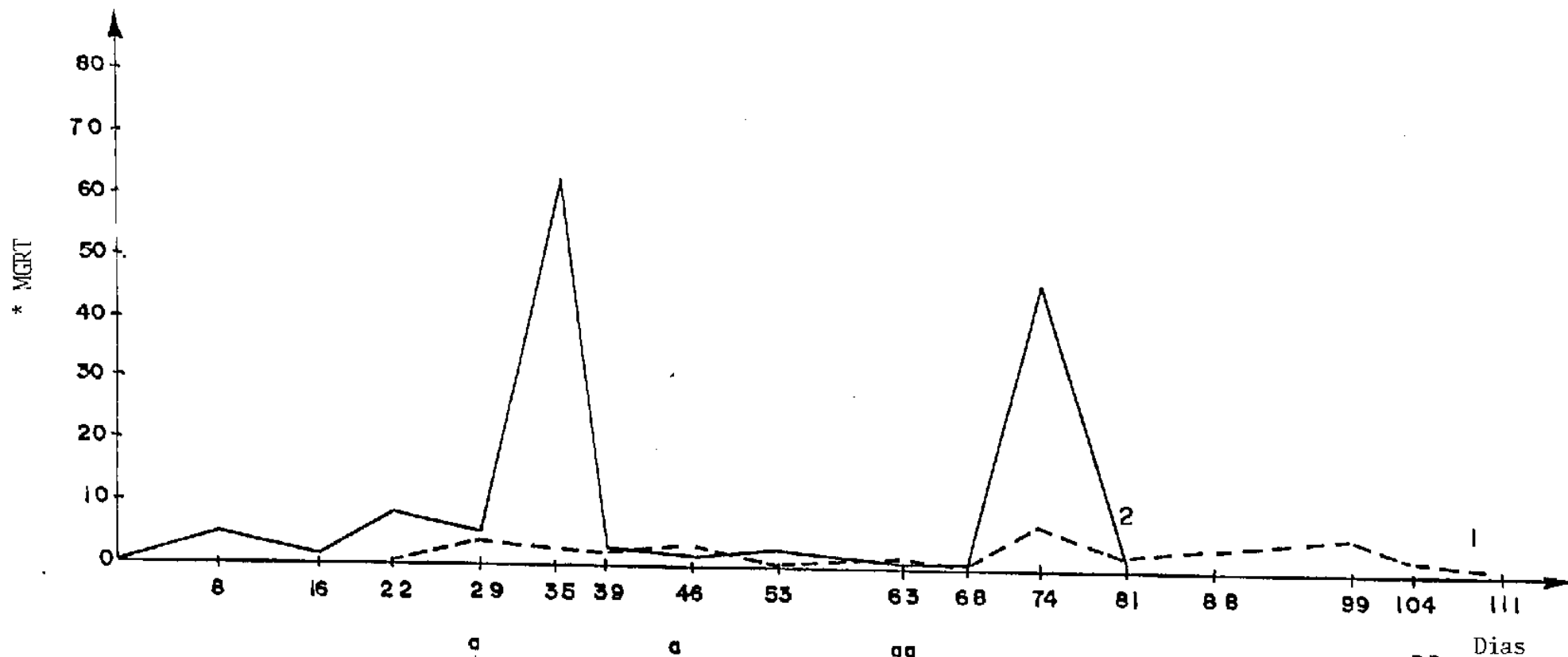


FIGURA 18. Níveis de imunoglobulina G anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias (1), e com sarcocistose que abortaram ou pariram natimortos (2), a partir do 5º mês de gestação (a = aborto; n = natimorto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

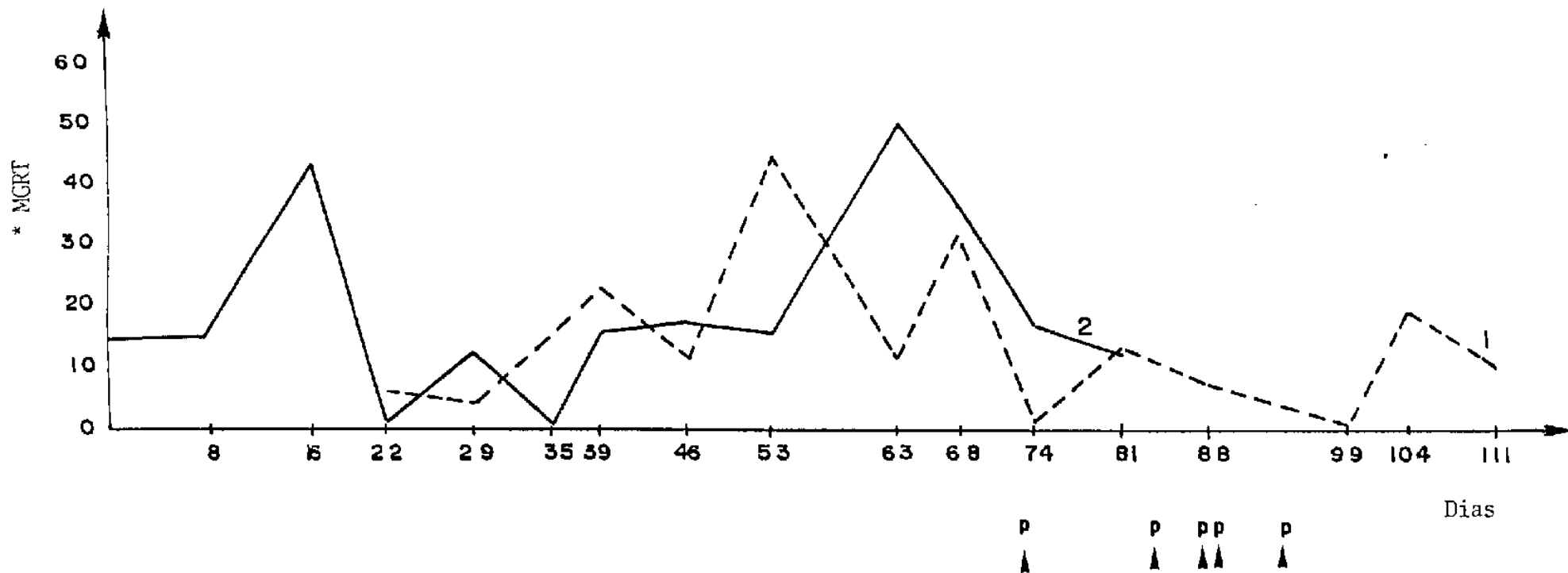


FIGURA 19. Níveis de imunoglobulina M anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias (i) e com sarcocistose experimental que pariram crias aparentemente sadias (2), a partir do 5º mês de gestação (p = parto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

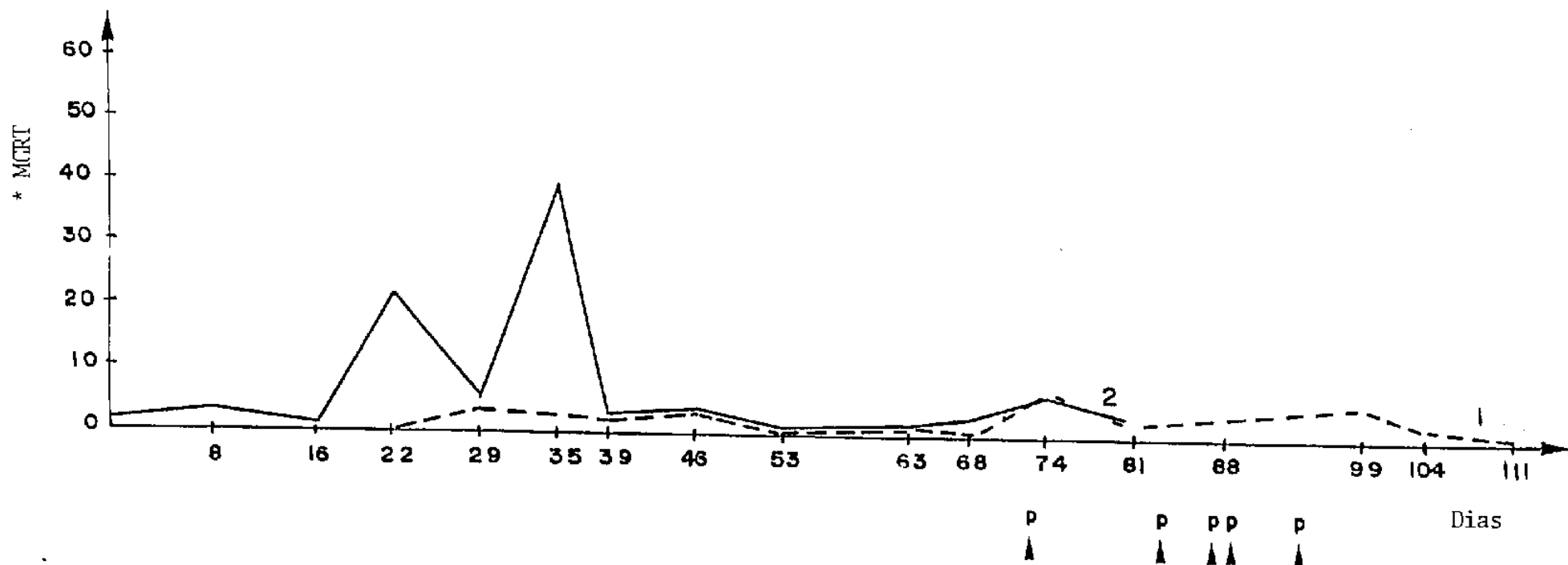


FIGURA 20. Níveis de imunoglobulina G anti *Sarcocystis cruzi*, detectados através da imunofluorescência indireta em vacas mestiças sadias (1) e com sarcocistose experimental que pariram crias aparentemente sadias (2), a partir do 5° mês de gestação (p = parto).

* Média geométrica da recíproca dos títulos.

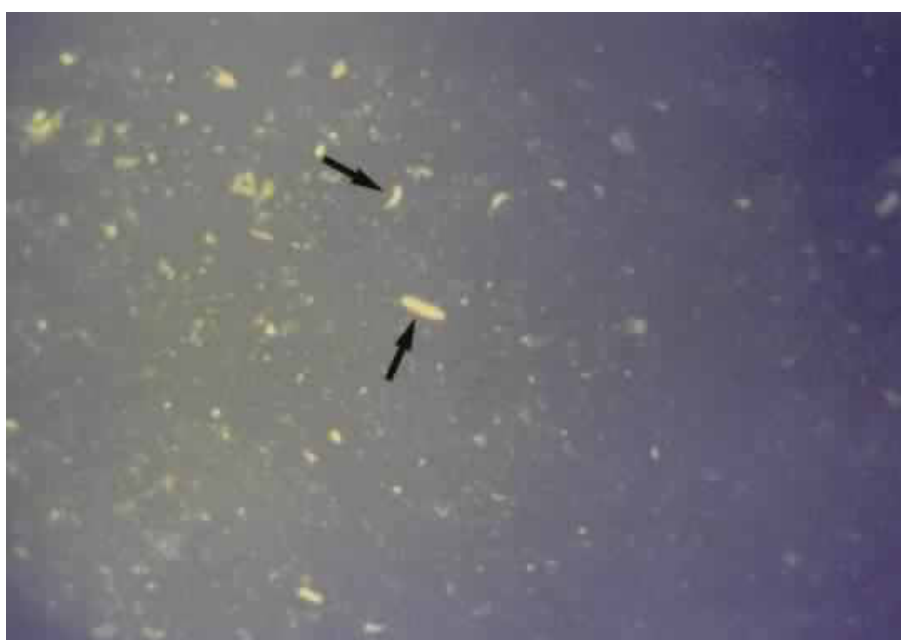


FIGURA 21. Fotomicrografia da reação positiva do teste de imunofluorescência indireta 400 X.

TABELA 1. Porcentagem de fagocitose *in vitro* de eritrócitos de carneiro por macrófagos de camundongos previamente sensibilizados, frente ao soro de bovinos experimentalmente infectados com *S. cruzi*

Presença de anticorpos contra <i>S. cruzi</i> em soro sanguíneo de bovino examinado pelo TIFI	Porcentagem de fagocitose em 30 min de teste
Alto título	63%
Baixo título	64%
Controle	67%

TABELA 2. Porcentagem de fagocitose *in vivo* de eritrócitos de carneiro por macrófagos de camundongos previamente sensibilizados, frente ao soro de bovinos experimentalmente infectados com *S. cruzi*

Presença de anticorpos contra <i>S. cruzi</i> em soro sanguíneo de bovino examinado pelo TIFI	Porcentagem de fagocitose em 30 min de teste
Alto título	0%
Baixo título	9%
Controle	100%

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos gerais

A sarcocistose bovina tem sido considerada freqüente e de alta patogenicidade, podendo causar aborto, reduzir a produção, perda de peso, retardar o crescimento e causar a morte e aborto em animais domésticos (LEVINE, 1973; FAYER, 1983; BOTELHO, 1985).

O fato de raras vezes ter evolução aguda, somado à impropriedade do método de diagnóstico mais usado, que é a pesquisa do parasito no tecido muscular, motivou vários autores a procurar um meio diagnóstico confiável com maior aplicabilidade (O'DONOGHUE & WEYRETER, 1983).

Tentativas têm sido feitas para se demonstrar a presença de anticorpos específicos circulantes em animais doentes, buscando assim um teste imunológico tanto para confirmação de casos agudos como para detecção de infecções císticas latentes. Muitos desses testes têm falhado e têm havido discordância nos resultados de pesquisas, tanto em relação aos

períodos de melhor detecção da doença quanto, no que se refere aos testes de melhores resultados, aos títulos sororreagentes para estes (FAYER' 1980; WEILAND et al., 1982; DUBEY & FAYER, 1983).

As dificuldades em diagnosticar sorologicamente muitos protozoários resulta do fato de que esses microrganismos desenvolveram mecanismos para evitar as conseqüências das respostas imunes de seus hospedeiros. Muitos desses são imunossuppressores, como *Theileria parva* Theiler, 1904, que invade e destrói especificamente as células T. Outros, como tripanosomas, são também imunossuppressores, podendo promover o desenvolvimento de células supressoras, ou então estimular as células B até a exaustão. A imunossupressão induzida pelo parasito pode ser de grande utilidade para ele, como no caso de *Babesia bovis* Babes, 1888, que, ao imunossuprimir o gado, facilita a fixação de seu vetor, o *Boophilus microplus* Canestrini, 1887.

Além da imunossupressão, os protozoários desenvolveram duas outras técnicas de imunoevasão. Uma envolve a transformação em hipo ou não antigênico, e a outra envolve a capacidade para uma rápida e repetida alteração de antígenos de superfície. A hipoantigenicidade ocorre nas formas císticas do *T. gondii*, o qual parece não estimular a resposta imune do hospedeiro (TIZARD, 1985).

Pelo visto, faz-se clara a necessidade de se conhecer a patogenicidade e conseqüentemente a cinética imunológi-

ca nas protozooses para se propor um meio de imunodiagnóstico.

5.2. Aspectos clínicos

Observou-se que os casos de aborto ocorriam geralmente após um pico de IgG e que mesmo os animais não infectados experimentalmente apresentaram flutuação do nível de IgM, denotando a ocorrência de infecção secundária a nível de campo. Houve picos febris e de aumento de pulsação que demonstraram o aumento do metabolismo devido à reação orgânica do hospedeiro contra a agressão do parasito, mas que logo cessaram acompanhando sempre o aumento e declínio dos níveis de imunoglobulinas.

5.3. Flutuação das imunoglobulinas

Pela avaliação sorológica, através da imunofluorescência indireta, utilizando o melhor antígeno para o teste (WEILAND et al., 1982; WEYRETER, & O'DONOGHUE, 1982), observou-se, neste trabalho, que em vacas mestiças e prenhes a variação de imunoglobulinemia apresentou picos irregulares durante a evolução da doença. Não houve diferença significativa nem entre a variação dos níveis séricos de imunoglobulinas nas vacas que receberam diferentes inóculos, nem entre as que apresentaram sintomatologia clínica, como aborto e natimortos, e as que tiveram a gestação sem problemas.

Não se conseguiu estipular um título de imunoglobulinemia imunorreagente que caracterizasse higidez ou doença, ou ainda, doença crônica ou aguda.

5.4. Avaliação da supressão imunológica

Pesquisando-se os mecanismos de escape do parasito, observou-se no sangue a presença de fator solúvel imunossupressor, detectado através de testes de supressão da fagocitose, na qual se obtiveram resultados de até 4% de supressão em apenas 30 min de confronto imediato entre células imunoativas e o fator presente no soro. Quando se pesquisou a ação desse fator por períodos de 5 dias, pôde-se avaliar até 100% na supressão da fagocitose. Também se notou diminuição de até 46% na produção de anticorpos por células de baço de camundongos.

A pesquisa do fator de supressão foi efetuada, nas pocas próximas à da ocorrência dos casos de aborto, procurando-se justamente constatar uma imunossupressão que, possivelmente, os teria causado. Os mesmos testes foram realizados com soro coletado em datas distantes dos períodos de parto para se evitar o mascaramento do teste pela imunossupressão inerente ao estado gravídico das fêmeas testadas.

Outro mecanismo de escape observado foi a formação de "capping" pela forma bradizoíta do parasito, podendo assim esse organismo sobreviver à ação inóspita desencadeada pelo sistema imune do animal infectado.

Tais estudos mostraram a grande especialização do parasito em se manter espoliando sem ser eliminado, o que concorda com sua elevada especificidade para o hospedeiro intermediário (DUBEY & FAYER, 1983), ressaltando assim o desgaste orgânico do hospedeiro e a grande oscilação e inconstância nos níveis séricos de imunoglobulinas, devido às várias tentativas de eliminar o parasito imunossupressor.

6. CONCLUSÕES

1 - O TIFI é seguro para detecção de anticorpos circulantes para *Sarcocystis cruzi* em bovinos;

2 - Não se estabeleceram níveis de imunoglobulinemia, pelo TIFI, para determinação nem de higidez ou doença, nem da fase aguda ou crônica da sarcocistose experimental em bovinos prenhes;

3 - Os melhores períodos para detecção de anticorpos pelo TIFI foram durante os picos de IgG e IgM;

4 - A forma de bradizoíta do *S. cruzi* faz "capping";

5 - Há fator de supressão no soro sanguíneo de bovinos prenhes, infectados experimentalmente com *S. cruzi*, capaz de inibir a produção de anticorpos pelas células imunoativas do baço de camundongo e a fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARYEETAY, M.E. & PIEKARSKI, G. Serologische *Sarcocystis* Studien am Menschen und Ratten. *Z. Parasitenkd.*, 50: 109-124, 1976.
- ARRU, E.; CASSEDDU, A.M. & TARANTIM, S. Immunofluorescence in the diagnosis of *Sarcocystis* infection of sheep and swine. *Clínica Vet.* 101: 195-200, 1978.
- BIGALKE, R.D. Preliminary observations on the mechanical transmission of cyst organisms of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected buli to rabbits by *Glossina brevipalpis*. *J. S. Afr. Vet. Med. Ass.*, 31: 37-44, 1960.
- BIGALKE, R.D. The artificial transmission of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected bull to susceptible cattle and rabbits. *Onderst. J. Vet. Res.*, 34: 303-316, 1967.
- BLAZER, K.; KORTLY, A. & IPPEN, R. Sarkosporidiosa Myocardu sparkate zvere. *Vet. Med.*, 49: 75-80, 1976.
- BLEWASKA, S. Versuche zur Steigerung der Befallsexintensitat und intensitat der *Sarcocystis muris*-Infektion. Inaug. Diss., Hannover Tierarztl. Hochschule. 56p, 1981.

- BOCH, J.; LAUPHEIMER, K.E. & ERBER, M. Drei Sarkosporidienarten bei Schlachtrindern in Süddeutschland. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.*, 91: 426-431, 1978.
- BORDJOCHKI, A.; CONITCH, V.; SAVIN, Z.; KHANFAR, H.M. & KATITCH, S. Complement fixation and indirect immunofluorescence tests in the detection of specific antibodies to various species of *Sarcocystis*. *Bull. l'Acad. Vet. France.*, 51: 189-195, 1978.
- BOTELHO, G.G. & LOPES, C.W.G. Esporocitos de *Sarcocystis cruzi* (HASSELMAN, 1926) (Apicomplexa, Sarcocystidae) nos linfonodos mesentéricos de cães. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J.*, 7: 87-89, 1984.
- BOTELHO, G.G. Doença de Dalmeny: Aspectos Parasitológicos, Epidemiológicos e Patológicos na infecção experimental por *Sarcocystis cruzi* (HASSELMAN, 1926) em bezerros. Tese Doutorado, *Univ. Fed. Rur. do Rio de J.*, 182 p., 1985.
- BURGISSER, H. Compte-rendu sur les maladies des animaux sauvages. *Schweizer Archiv. Tierheilkund*, 117: 397-400, 1975.
- CARRIGAN, M.J. An outbreak of sarcocystosis in dairy cattle. *Australian Vet. J.*, 63: 22 - 24, 1986.

- CERNÁ, Z. Further studies on the life cycle of sarcosporidians in the intermediate host, *Progress in Protozoology*. Abstract. VI Int. Cong. Protozool., Warszawa, Pôlonia, p. 49, 1981.
- CERNÁ, Z. Multiplication of merozoites of *Sarcocystis dispersa* Cerná, Kolárová et Sulc, 1978 and *Sarcocystis cerne* Levine, 1977 in the blood stream of the intermediate host. *Folia Parasitol.*, 30: 5-8, 1983.
- COLLERY, P. & WEAVERS, E. An outbreak of sarcocystosis in calves in Ireland. *Irish Vet. J.*, 35: 159-162, 1981.
- CORNER, A.H.; MITCHELL, D. & MEADS, E.B. Dalmeny disease. An infection of cattle presumed to be caused by an unidentified protozoan. *Can. Vet. J.*, 4: 252-264, 1963.
- DUBEY, J.P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. *J. Am. Med. Assoc.*, 169: 1061-1078, 1976.
- DUBEY, J.P. Coyote as final host for *Sarcocystis* species of goat, sheep, cattle, elk, bison and moose in Montana. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 1227-1229, 1980.
- DUBEY, J.P. Development of immunity to *sarcocystis* in dairy goats. *Am. J. Vet. Res.*, 42: 800-809, 1981.
- DUBEY, J.P. Quantitative parasitemia in calves fed *Sarcocystis*

- cruzi* sporocysts from coyotes, *Am. J. Vet. Res.*, 43: 1085-1086, 1982a.
- DUBEY, J.P. Development of ox-coyote cycle of *Sarcocystis cruzi*. *J. Protozool.*, 29: 591-601, 1982b.
- DUBEY, J.P. Immunity to *Sarcocystis*: modification of intestinal coccidiosis, and disappearance of *Sarcocystis* in dairy goats. *Vet. Parasitol.*, 13: 23-24, 1983a.
- DUBEY, J.P. Impaired protective immunity to sarcocystosis in pregnant dairy goats. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 132-134, 1983b.
- DUBEY, J.P. & FAYER, R. Sarcocystosis. *Br. vet. J.*, 139: 371-377, 1983.
- FASSI-FEHRI, N.; CABARET, J.; AMAQDOUF, A. & DARDAR, F. La sarcosporidiose des ruminantes au Maroc: étude épidémiologique par deux techniques histologiques. *Ann. Resh. Vet.*, Paris, 9: 409-417, 1978.
- FAYER, R. *Canis latrans* and *C. familiaris*: Hosts of *Sarcocystis fusiformis*. *Proc. Third Internatl. Congr. Parasitol.*, 61: 114-115, 1974a.
- FAYER, R. Development of *Sarcocystis fusiformis* in the small intestine of the dog. *J. Parasitol.*, 60: 660-665, 1974b.
- FAYER, R. Effects of refrigeration, cooking and freezing on *Sarcocystis* in beef from retail food stores. *Proc. Helminthol.*

- Soc. Wash., 42: 138-140, 1975,
- FAYER, R. Economic losses to *Sarcocystis*. *Natl. Wool Grow*, 66: 22-24, 1976.
- FAYER, R. The first sexual generation in the life cycle of *Sarcocystis bovicanis*, *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 44: 206-209, 1977.
- FAYER, R. Multiplication of *Sarcocystis bovicanis* in the bovine blood-stream. *J. Parasitol.*, 65: 980-982, 1979.
- FAYER, R. Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. *Vet. Parasitol.* 6: 75-103, 1980.
- FAYER, R. & JOHNSON, A.J. Development of *Sarcocystis fusiformis* in calves infected with sporocysts from dogs. *J. Parasitol.*, 59: 1135-1137, 1973.
- FAYER, R. & JOHNSON, A.J. *Sarcocystis fusiformis*: Development of cysts in calves infected with sporocysts from dogs. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 41: 105-108, 1974.
- FAYER, R. & JOHNSON, A.J. Effect of amprolium on acute sarcocystosis in experimentally infected calves. *J. Parasitol.*, 61: 932-936, 1975.
- FAYR, R. & LEEK, R.G. Excystation of *Sarcocystis fusiformis* sporocysts from dogs. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 40: 294-296, 1973.

- FAYER, R. & LEEK, R.G. *Sarcocystis* transmitted by blood transfusion. *J. Parasitol.*, 65: 890-893, 1979.
- FAYER, R. & LUNDE, M.N. Changes in serum and plasma proteins and in IgG and IgM antibodies in calves experimentally infected with *Sarcocystis* from dogs. *J. Parasitol.*, 63: 438-442, 1977.
- FAYER, R. & LYNCH, G.P. Pathophysiological changes in urine and blood from calves experimentally infected with *Sarcocystis cruzi*. *J. Parasitol.*, 79: 325-336, 1979.
- FAYER, R. & PRASSE, R.W. Hematology of experimental acute *Sarcocystis bovicanis* infection in calves. I. Cellular and serologic changes *Vet. Pathol.*, 18: 351-357, 1981.
- FAYER, R.; JOHNSON, A.J. & HILDEBRANT, P.K. Oral infection of mammals with *Sarcocystis fusiformis* bradyzoites from cattle and sporocysts from dogs and coyotes, *J. Parasitol.*, 62: 10-14, 1976a.
- FAYER, R.; JOHNSON, A.J. & LUNDE, M. Abortion and other signs of disease in cows experimentally infected with *Sarcocystis fusiformis* from dogs. *J. Infec. Dis.*, 134: 624-628, 1976b.
- FAYER, R.; LYNCH, G.P. & LEEK, R.G. Effects of sarcocystosis on milk production of dairy cows. *J. Dairy*

Sci., 66: 904-908, 1983.

FAYER, R.; MAHRT, J.L. & JOHNSON, A.J. The life cycle and pathogenic effects of *Sarcocystis fusiformis* in experimentally infected calves. *J. Protozool.*, 20: 509, 1973.

FRELIER, P.F. & LEWIS, R.M. Hematologic and coagulation abnormalities in acute bovine sarcocystosis. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 40-48, 1984.

FRELIER, P.; MAYHEW, I.G. & POLLOK, R. Bovine sarcocystosis: Pathologic features of naturally occurring infection with *Sarcocystis cruzi*, *Am. J. Vet. Res.*, 49: 651-657, 1979.

FRELIER, P.; MAYHEW, I.G.; FAYER, R. & LUNDE, M.N. Sarcocystosis: A clinical outbreak in dairy calves. *Science*. 195. 1341-1342, 1977.

FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology and immunology. In: *The Coccidia* (D.M. Hammond & P.L. Long, eds.), p. 343-410. University Park Press, Baltimore, 1977.

GARRO, M.C.P.; OSÓRIO, M.R.; GARCIA, V.G. & CASTRO, J.G. Contribution al estudio de la sarcosporiosis. Su frecuencia en el ganado vacuno de la provincia de Granada. *Rev. Iber. Parasitol.*, 31: 315-318, 1971.

GASBARRE, L.C.; SUTER, P. & FAYER, R. Humoral and celular

- immune responses in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 1492-1592, 1984.
- GESTRICH, R. & HEYDORN, A.-O. Untersuchungen zur Überlebensdauer von Sarkosporidienzysten in Fleisch von Schlachtieren. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.*, 87: 475-476, 1974.
- GESTRICH, R.; HEYDORN, A.-O. & BAYSU, N. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. VI Untersuchungen zur Antendifferenzierung bei *Sarcocystis fusiformis* und *Sarcocystis tenella*. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.*, 88: 191-197, 1975.
- GILES, R.S.; TRAMONTIN, R.; KADEL, W.L.; WHITAKER, K.; MIKSCH, D.; BRYANT, D.W. & FAYER, R. Sarcocystosis in cattle in Kentucky. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 176: 543-548, 1980.
- GOMES, A.G. & LIMA, J.D. *Sarcocystis* Lankester, 1882 em bovinos de Minas Gerais; ocorrência e métodos de diagnóstico. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, 34: 83-92, 1982.
- HEYDORN, A.-O. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. IX Entwicklungszyklus von *Sarcocystis Suihominis* n. spec. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.*, 90: 218-224, 1977a.
- HEYDORN, A.-O. Sarkosporidieninfiziertes Fleisch als mögliche

- Krankheitsursache für den Menschen. *Archiv. Lebensmittelhyg.*, 28: 27-31, 1977b.
- HEYDORN, A.-O. & GESTRICH, R. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. VII Entwicklungsstadien von *Sarcocystis ovis* in Schaf. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.*, 89: 1-5, 1976.
- HEYDORN, A.-O. & ROMMEL, M. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. II. Hund und Katze als Uebertrager der Sarkosporidien des Rindes. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.*, 85: 121-123, 1972.
- HEYDORN, A.-O.; GESTRICH, R.; MEHLHORN, R. & ROMMEL, M. Proposal for a new nomenclature of the Sarcosporidia. *Z. Parasitenkd.*, 48: 73-82, 1975.
- HOFER, J.; BOCH, J. & ERBER, M. Cellular and humoral reactions in mice following experimental infections with *Sarcocystis muris* and *Sarcocystis dispersa*. *Berl. Mueh. Tierarztl. Wochenschr.*, 95: 160-175, 1982.
- HONER, M.R. The interpretation of faecal egg-counts. I. Daily variation in *Fasciola hepatica* egg-counts in cattle. *Z. Parasitenkd.*, 26: 143-155, 1965.
- HUDSON, L. & HAY, F.C. *Practical Immunology*. 2^a ed., Blackwell Scientific Publications. London, 359 p., 1980.

- JOHNSON, H.J.; HILDEBRANDT, P.K. & FAYER, R. Experimentally induced *Sarcocystis* infection in calves: Pathology. *Am. J. Vet. Res.*, 36: 995-999, 1975.
- KALLAB, K. Über das Vorkommen von Sarkosporidien. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.*, 53: 34-39, 1966.
- KARMEL, P.H. & POLASEK, M. Estatística geral e aplicada para economistas. 2ª ed., São Paulo, Atlas, 601 p., 1974.
- KARR, J.L.Jr. & WONG, N.M. A survey of *Sarcocystis* in nonhuman primates. *Lab. Ann. Sci.*, 25: 641-645, 1975.
- KREIER, J.P. *Parasitic Protozoa*. 1ª ed., Academic Press, New York, Vol. 1, 441 p., 1977.
- KRUIJF, J.M.; VAN LOGTESTIJON, J.G.; FRANKEN, P. & HERDER, K.A.M. Sarcosporidiosis in cattle and swine. *tijdschr. Diergeneeskd.*, 99: 303-308, 1974.
- KWAPINSKI, G. *The Methodology of Investigative and Clinical Immunology*. 1ª ed. Robert E. Krieger Publishing, Malabar, 515 p., 1982.
- LAARMAN, J.J. Isosporiasis in man. *Trop. Geogr. Med.*, 16: 268-269, 1964.
- LAARMAN, J.J. & MAS BAKAL, P. The age-distribution of carriers of *Isospora hominis*, with some remarks on the occurrence of antibodies to *Toxoplasma* in these carriers.

- Comptes rendus du 1er. Multicolloque européen de Parasitologie.*, p. 276-278, 1971.
- LEEK, R.G. & FAYER, R. Infectivity of *Sarcocystis* in beef and beef products from a retail food store. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 45: 135-136, 1978.
- LEEK, R.G. & FAYER, R. Amprolium for prophylaxis of ovine *Sarcocystis*. *J. Parasitol.*, 66: 100-106, 1980.
- LEVINE, N.D. *Protozoan parasites of domestic animals and of man*. Burgess, Minneapolis, 406 p., 1973.
- LEVINE, N.D. Nomenclature of *Sarcocystis* in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat. *J. Parasitol.*, 63: 36-51, 1977.
- LEVINE, N.D. Taxonomy and life cycles of coccidia. In: Long, P.L, (ed) University Park Press, Baltimore, pag. 1-33. 502 p., 1982.
- LEVINE, N.D. & IVENS, V. *The coccidian parasites (Protozoa, Apicomplexa) of carnivores*. University of Illinois Press, Urbana. 204 p., 1981.
- LUNDE, M.N. & FAYER, R. Serologic tests for antibody to *Sarcocystis* in cattle. *J. Parasitol.*, 63: 222-225, 1977.
- MAHRT, J.L. & FAYER, R. Hematologic and serologic changes in calves experimentally infected with *Sarcocystis Tusiformis*

J. Parasitol., 61: 967-969, 1975.

MARKUS, M.B. *Sarcocystis* and sarcocystosis in domestic animals and man. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 22: 159-193, 1978.

MARKUS, M.B.; KILLICK-KENDRICK, R. & GARNHAM, P.C.C. The coccidial nature and life-cycle of *Sarcocystis*. *J. Trop. Med. Hyg.*, 77: 248-259, 1974.

MEADS, E.B. Dalmeny disease, another outbreak probably sarcocystosis. *Can. Vet. J.*, 17: 271, 1976.

MEHLHORN, H. & HEYDORN, A.-O. Lichtund elektronen mikroskopische Untersuchungen ah *Sarcocystis sui hominis*. *Z. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg., I. Abt. Orig. Reihe A*, 239: 124-139, 1977.

MEHLHORN, H.; HEYDORN, A.-O & GESTRICH, R. Light and electron microscope studies on cysts of *Sarcooystis fusiformis* in the muscles of calves infected experimentally with oocysts and sporocysts of the large form of *Isospora bigemina* from dogs. I. The development of cysts and cyst wall. *Z. Bacteriol. ParasitenK. Infektionskr. Hyg. Erste Abt. Orig. Reihe A Med. Mikrobiol. Parasitol.*, 232: 392-409, 1975.

MUNDAY, B.L. & BLACK, H. Suspected *Sarcocystis* infections of the bovine placenta and foetus, *Z. Parasitenko*, 51: 129-132, 1976.

- MUNDAY, B.L. & RICKARD, M.D. Is *Sarcocystis tenella* two species? *Austr. Vet. J.*, 50: 558-559, 1974.
- MUNDAY, B.L.; BARKER, I.K. & RICKARD, M.D. The development cycle of a species of *Sarcocystis* occurring in dogs and sheep with observations on pathogenicity in the intermediate host. *Z. Parasitenkd.*, 46: 111-123, 1975.
- NEDJARI, I.; JUNGSMANN, R. & HIEPE, T. Immunodiagnostischer Nachweis eines experimentellen *Sarcocystis bovicanis*-Infektion beim Rind mit der indirekten Fluoreszenz - Antikörperreaktion. *Monatshefte für Veterinärmedizin*, 31: 946-947, 1976.
- NEUMAYER, F. *Detection of sarcosporidiosis in swine by indirect haemagglutination, indirect immunofluorescence and ELISA*. Inaugural Dissertation, Ludwig-Maximilians Universität, München., 41 p., 1982.
- O'DONOGHUE, P.J. Factors influencing the epidemiology of the ovine sarcosporidiosis and the development of *Sarcocystis tenella* in specific-pathogen-free (SPF) sheep. PhD Thesis, Univ. Adelaide. 261 p., 1978.
- O'DONOGHUE, P.J. Specific antibodies in sheep as indicators of infection by *Sarcocystis* spp. 9th Int. Cong. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol. (WAAVP). Budapest, p. 55, 1981.
- O'DONOGHUE, P.J. & WEYRETER; H. Antigen characterization,

antibody classification and immune complex formation in Sarcocystis infections. *Z. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg., Abt. I. Orig. Reihe A*, 277: 104-105, 1982.

O'DONOGHUE, P.J. & WEYRETER, H. Detection of antigens in the sera of experimentally-infected pigs and mice by an immunoenzymatic assay. *Vet. Parasitol.*, 12:13-29, 1983.

OGASSAWARA, S. & BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* sp. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 47: 27-32, 1980.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S.; LARSSON, C.E. & HAGIWARA, M. K. *Sarcocystis* sp.; ocorrência de esporocistos em gatos na Cidade de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 47: 23-26, 1980

OGASSAWARA, S.; LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; HAGIWARA, M.K. & GOUVEIA, G. Ocorrência de esporocistos de *Sarcocystis* sp. em cães na Cidade de São Paulo. *Rev. Microbiol.*, 8: 21-23, 1977.

OGASSAWARA, S.; NILITIN, T.; LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; BARBUTO, O.J.M. & HAGIWARA, M.K. Infecção experimental de cães com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* sp. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 15: 51-58, 1978.

- PEREIRA JUNIOR & BITENCOURT. Utilização do método Kato-Katz para o diagnóstico de *Isospora* Resultados preliminares. Pág. 30. In: Congr. Bras. de Parasitol., 4., Belo Horizonte. Anais, 1981.
- PIEKARSKI, G, & WITTE, H.M. Experimentelle und histologische Studien zur *Toxoplasma* - Infektion der Hauskatze. Z. ParasitenKd., 36: 95-121, 1971.
- REITER, I.; WEILAND, G.; ROSCHER' B.; MEYER, J. & FRAHM, K. Versuche zur sorologischem Nachweis der Sarkosporidiose ah experimentell mit Sarkosporidien infizierten Rindem und Schafen. Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr., 94: 42S-430, 1981.
- ROMMEL, M. & GEISEL, O. Untersuchungen uber die Verarbeitung und den Lebenszyklus einer Sarkosporidienart des Pferdes (*Sarcocystis equicanis* n. spec.). Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr., 88: 468-471, 1975.
- ROMMEL, M.; HEYDORN, A.-O & GRUBER, F. Beitrage zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. I. Die Sporozoyte von *S. tenella* in deu Fazes der Katze. Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr., 85: 101-105, 1972.
- ROMMEL, M.; HEYDORN. A.-O; FISCHLE, B. & FESTRICH, R. Beitrage zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. V. Weitere Endwiste der Sarkosporidien von Rind, Schaf und Schwein

- und die Bedeutung des Zwischenwirtes für die Verbreitung dieser Parasitose. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.*, 85: 392-396, 1974.
- RUIZ, A. & FRENKEL, J.K. Recognition of cyclic transmission of *Sarcocystis muris* by cats. *J. Infect. Dis.*, 133: 409-418, 1976.
- SCHMITZ, J.A. & WOLF, W.W. Spontaneous fatal sarcocystosis in a calf. *Vet. Pathol.*, 14: 527-531, 1977.
- SHIMURA, K.; ITO, S. & TSUNODA, K. Sporocysts of *Sarcocystis cruzi* in mesenteric lymph nodes of dogs. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, 21: 186-187, 1981.
- SHUKLA, D.C. & VICTOR, D.A. The complement fixation test in the diagnosis of sarcosporidiosis in bovines. *Indian Vet. J.* 53: 852-854, 1976.
- STORRER, T.L. & USINGER, R.L. *Zoologia Geral*. 3^a ed. Editora Nacional, São Paulo, 713 p., 1977.
- SUTEU, E. & COMAN, S. Nouvelles observations sur le cycle biologique de *Sarcocystis fusiformis*. *Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp.*, 75: 363-367, 1973.
- TADROS, W. & LAARMAN, J.J. *Sarcocystis* and related coccidian parasites: a brief general review, together with a discussion on some biological aspects of their

- life-cycle and a new proposal for their classification. *Acta Leiden.*, 44: 1-107, 1976.
- TIZAR, I. *Imunologia Veterinária*. 2^a ed. Santuário. São Paulo, 329 p., 1985.
- VERSHININ, I.I. O tsikle razvitiya *Sarcocystis hirsuta*. *Veterinariya*. 2: 77-80, 1974.
- VILES, J.M. & POWELL, E.C. The ultrastructure of the cyst wall of a murine *Sarcocystis*. *Z. Parasitenkd.*, 49: 127-132, 1976.
- WEILAND, G.; REITER, I. & BOCH, J. [Serological diagnosis of sarcosporidiosis possibilities and limitations]. *Berliner und münchener Tierärztliche Wocheuschijt*. 95: 387-392, (Abstract.), 1982.
- WEYRETER, H. & O'DONOGHUE, P.J. Serological diagnosis of *Sarcocystis* infections. I. Antibody development in mice and pigs. *Z. Bakt. Mikrobiol. Hyg.*, 253: 407-416, 1982.
- ZAMAN, V. & COLLEY, F.C. Light and electron microscopic observations of the life-cycle of *Sarcocystis orientalis* sp. n. in the rat (*Rattus norvegicus*) and the Malaysian Reticulated Python (*Python reticulatus*). *Z. Parasitenkd.*, 47: 169-185, 1975.
- ZIELASKO, B.; PETRICH, J.; TRAUTWEIN, G. & ROMMEL, M. Untersuchungen

uber pathologisch-anatomische Veranderungen und die
Entwicklund der Immunitat bei der *Sarcocystis suicanis* -
Infektion. *Berl. Muench, Tierarztl. Wochenschr.*, 94: 223-
228, 1981.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1.

ASPECTOS BIOLÓGICOS DE ESPÉCIES DE *Sarcocystis* EM ANIMAIS DOMÉSTICOS (DUBEY & FAYER, 1983)

Hospedeiro Intermediário	Sarcocystis sp.	Hospedeiros finais	Doença clínica	Aborto	Características do cisto		Esporocisto ¹	Estágios de desenv. conhecidos ²
					tam.	parede		
Bovino (<i>B. taurus</i>)	<i>S. cruzi</i>	cão, coiote, lobo, raposa, mão pelada.	sim	sim	m	F	16 x 11	sim
Zebuino (<i>B. indicus</i>) e	<i>S. hirsuta</i>	gato.	não	D	m	G	12 x 8	sim
Bisão (<i>Bison bison</i>)	<i>S. hominis</i>	homem, Rhesus e babuíno.	D	D	m	G	15 x 9	não
Bubalino (<i>Bubalis bubalis</i>)	<i>S. levinei</i>	cão.	D	D	m	F	15 x 10	não
	<i>S. fusiformis</i>	gato.	D	D	M	G	13 x 8	não
Ovino (<i>Ovis aries</i>)	<i>S. tenella</i>	cão, coiote, raposa.	sim	sim	m	G	15 x 10	sim
	<i>S. gigantea</i>	gato.	D	D	M	F	12 x 8	não
	<i>S. medusifformis</i>	gato.	D	D	M	F	12 x 8	não
	<i>Sarcocystis</i> sp.	cão.	sim	D	m	F	15 x 10	não
Caprino (<i>Capra hircus</i>)	<i>S. capracanis</i>	cão, coiote, raposa.	sim	sim	m	G	15 x 10	sim
	<i>Sarcocystis</i> sp.	cão.	sim	D	m	F	15 x 10	sim
Suíno (<i>Sus scrofa</i>)	<i>S. miescheriana</i>	cão, raposa, lobo.	sim	sim	m	G	13 x 10	sim
	<i>S. sui hominis</i>	homem, chimpanzé, Rhesus.	sim	D	m	G	15 x 11	sim
Equino (<i>Equus caballus</i>)	<i>S. fayeri</i>	cão.	sim	D	M	G	12 x 8	sim
	<i>S. equicanis</i>	cão.	D	D	m	F	15 x 10	não

¹ Tamanho aproximado (micra);

² No hospedeiro intermediário; D. Desconhecido; m. microscópico; M. Macroscópico; F. fina; G. Grossa.

APÊNDICE 2.

FICHA CONTROLE DOS SOROS EM TESTE

RELAÇÃO DOS SOROS EM TESTE

FOLHA Nº ()
 DATA DO DIAGNÓSTICO (/86)

PLACA	CASULO	SORO	LÂMINA	RETÍCULO	DILUIÇÃO	DIAGNÓSTICO
_____	()	_____	_____	1	-----> VII	() () ()
				2	VI	() () ()
				3	V	() () ()
				4	IV	() () ()
				5	III	() () ()
_____	()	_____	_____	1	-----> II	() () ()
				2	I	() () ()
				3	VII	() () ()
				4	VI	() () ()
				5	V	() () ()
_____	()	_____	_____	1	-----> IV	() () ()
				2	III	() () ()
				3	II	() () ()
				4	I	() () ()
				5	VII	() () ()
_____	()	_____	_____	1	-----> VI	() () ()
				2	V	() () ()
				3	IV	() () ()
				4	III	() () ()
				5	II	() () ()
_____	()	_____	_____	1	-----> I	() () ()
				2	VII	() () ()
				3	VI	() () ()
				4	V	() () ()
				5	IV	() () ()
_____	()	_____	_____	1	-----> III	() () ()
				2	II	() () ()
				3	I	() () ()
				4	VII	() () ()
				5	VI	() () ()
_____	()	_____	_____	1	-----> V	() () ()
				2	IV	() () ()
				3	III	() () ()
				4	II	() () ()
				5	I	() () ()

