

***Cryptosporidium muris*, *Eimeria nieschulzi*, *E. separata*
E *Pneumocystis carinii* EM RATAZANAS DE DOIS HABITATS
LOCALIZADOS NA MICRORREGIÃO FLUMINENSE DO GRANDE
RIO: MORFOLOGIA, DIAGNÓSTICO E PATOLOGIA**

TERESA CRISTINA BERGAMO DO BOMFIM

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

***Cryptosporidium muris*, *Eimeria nieschulzi*, *E. separata*
E Pneumocystis carinii EM RATAZANAS DE DOIS HABITATS
LOCALIZADOS NA MICRORREGIÃO FLUMINENSE DO GRANDE
RIO: MORFOLOGIA, DIAGNÓSTICO E PATOLOGIA**

TERESA CRISTINA BERGAMO DO BOMFIM

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR:
Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de *Phylosophiae*
Doctor em Medicina Veterinária -
Parasitologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

MARÇO, 1996

TÍTULO DA TESE

***Cryptosporidium muris*, *Eimeria nieschulzi*, *E. separata*
E *Pneumocystis carinii* EM RATAZANAS DE DOIS HABITATS
LOCALIZADOS NA MICRORREGIÃO FLUMINENSE DO GRANDE
RIO: MORFOLOGIA, DIAGNÓSTICO E PATOLOGIA**

AUTOR

TERESA CRISTINA BERGAMO DO BOMFIM

APROVADA EM: 28/03/1996

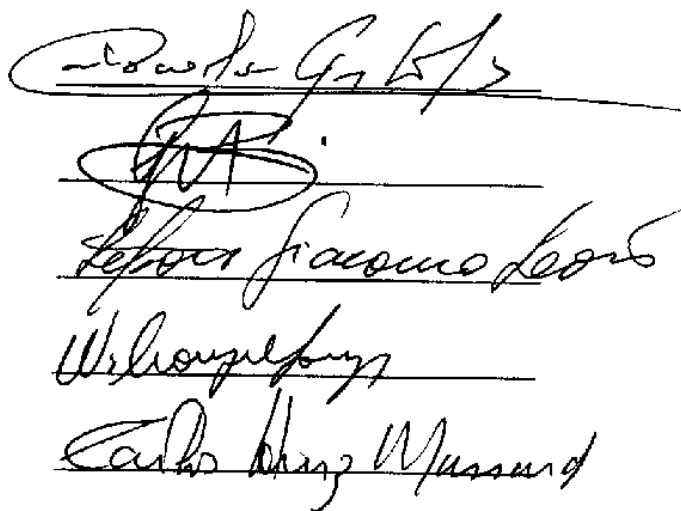
Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES

Dr. GILBERTO GARCIA BOTELHO

Dr. ZELSON GIÁCOMO LOSS

Dr. WILSON JACINTO SILVA DE SOUZA

Dr. CARLOS LUIZ MASSARD



The image shows five handwritten signatures, each written over a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to the examiners listed on the left: Carlos Wilson Gomes Lopes, Gilberto Garcia Botelho, Zelson Giacomo Loss, Wilson Jacinto Silva de Souza, and Carlos Luiz Massard. The signatures are in cursive and vary in style.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Professor CARLOS WILSON GOMES LOPES, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela orientação deste trabalho e pela amizade e apoio durante a realização de todo o Curso.

À aluna SIMONI MACHADO DE MEDEIROS, do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária (UFRRJ), pela colaboração na análise de dados estatísticos.

BIOGRAFIA

TERESA CRISTINA BERGAMO DO BOMFIM, filha de Deocleciano Barroso do Bomfim e Joaquina Bergamo do Bomfim, nasceu em Campo Grande, Rio de Janeiro.

Realizou o primeiro e segundo graus no Colégio Nossa Senhora do Rosário em Campo Grande, Rio de Janeiro.

No primeiro semestre de 1980, ingressou no Curso de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), graduando-se em dezembro de 1983.

No período de março de 1985 a fevereiro de 1986, foi bolsista do CNPq na categoria de Aperfeiçoamento, desenvolvendo pesquisa em Eimeriose Caprina.

Em março de 1986, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, a nível de Mestrado, na UFRRJ, concluindo sua tese em 1989.

Em agosto de 1989 iniciou sua experiência profissional como professora da disciplina de Genética Geral da Faculdade de Medicina Veterinária Prof. Antônio Secundido de São José e professora da disciplina de Aquicultura da Faculdade de Agronomia e Zootecnia Professor Manoel Carlos Gonçalves, ambas em Espírito Santo do Pinhal, São Paulo.

Em março de 1991, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, a nível de Doutorado, na UFRRJ.

No primeiro semestre de 1992 ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, graduando-se em setembro de 1995.

Em abril de 1994 foi aprovada como Professora Substituta de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), permanecendo até setembro de 1994, quando foi nomeada Professora Assistente.

SUMÁRIO

	Págs.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. <i>Cryptosporidium</i> Tyzzer, 1907	5
2.1.1. Considerações gerais	5
2.1.2. Histórico	9
2.1.3. Diagnóstico	11
2.1.3.1. Determinação do desenvolvimento dos estágios endóge- nos	11
2.1.3.2. Determinação dos oocistos	12
2.1.4. Epidemiologia e transmissão	13
2.2. <i>Eimeria</i> Schneider, 1875	15

2.2.1. Considerações gerais	15
2.2.2. Métodos utilizados na identificação dos coccídios	17
2.2.3. Filogenia envolvendo os coccídios	21
2.3. <i>Pneumocystis carinii</i> Delanöe & Delanöe, 1912	25
2.3.1. Considerações gerais	25
2.3.2. Histórico	27
2.3.3. Epidemiologia e transmissão	29
2.3.4. Biologia	30
2.3.4.1. Definição geral das fases do ciclo biológico	31
2.3.5. Posição taxonômica	34
2.3.6. Diagnóstico	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. Locais de captura	40
3.1.1. Habitat A	41
3.1.2. Habitat B	41
3.2. Animais capturados	42
3.3. Procedimentos laboratoriais	43
3.3.1. Necropsia	43

3.3.2. Exame parasitológico de fezes	45
3.3.3. Exame dos pulmões	46
3.3.4. Exame histopatológico	46
3.4. Mensuração e fotomicrografia	47
3.5. Análise estatística	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. <i>Cryptosporidium muris</i>	49
4.1.1. Avaliação dos animais capturados	49
4.1.2. Características dos oocistos, analisadas em campo brilhante utilizando-se a técnica de centrífugo-flutuação modificada, em solução saturada de açúcar	50
4.1.3. Características dos oocistos corados pelo Ziehl-Neelsen modificado	51
4.1.4. Características morfométricas dos oocistos provenientes de ratazanas dos habitats A e B	53
4.1.5. Prevalência de oocistos de <i>Cryptosporidium muris</i> em ratazanas dos habitats A e B	58
4.1.6. O papel de ratazanas como fonte de oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	62

4.1.7. Histopatologia	63
4.2. Espécies do gênero <i>Eimeria</i> observadas em ratazanas	64
4.2.1. Características morfométricas dos oocistos	64
4.2.1.1. <i>Eimeria nieschulzi</i>	64
4.2.1.2. <i>Eimeria separata</i>	69
4.2.2. Aspectos comparativos dos oocistos de <i>Eimeria nieschulzi</i> e <i>E. separata</i> dos habitats A e B	71
4.2.3. Prevalência das espécies do gênero <i>Eimeria</i> nos habitats A e B	77
4.3. <i>Pneumocystis carinii</i>	80
4.3.1. Características morfológicas das fases evolutivas teciduais	81
4.3.1.1. Impressões de pulmões coradas pelo Giemsa	81
4.3.1.2. Esfregaço de pulmão corado pela prata	83
4.3.2. Frequência de lesões pulmonares por <i>Pneumocystis carinii</i>	84
4.3.3. Patologia em casos naturais de pneumocistose em ratazanas	86
5. CONCLUSÕES	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

ÍNDICE DAS TABELAS

Págs.

TABELA 1. Número de animais capturados nas áreas A e B, avaliados considerando peso e sexo	44
TABELA 2. Características morfométricas e comparativas dos oocistos (μm) de <i>Cryptosporidium muris</i> provenientes de <i>Rattus norvegicus</i> nos habitats A e B, utilizando coloração pelo Ziehl-Neelsen Modificado e campo brilhante	54
TABELA 3. Avaliação do índice morfométrico de oocistos de <i>Cryptosporidium muris</i> provenientes de <i>Rattus norvegicus</i> , dos habitats A e B	55

TABELA 4. Características morfométricas dos oocistos e esporocistos de <i>Eimeria nieschulzi</i> , provenientes de <i>Rattus norvegicus</i> dos habitats A e B	67
TABELA 5. Avaliação do índice morfométrico de oocistos de <i>Eimeria nieschulzi</i> e <i>E. separata</i> provenientes de <i>Rattus norvegicus</i> dos habitats A e B	68
TABELA 6. Características morfométricas dos oocistos e esporocistos de <i>Eimeria separata</i> provenientes de <i>Rattus norvegicus</i> dos habitats A e B	70

ÍNDICE DAS FIGURAS

Págs.

FIGURA 1. *Cryptosporidium muris*: A) oocistos e B) levedura, centífugo-flutuação modificada, em solução saturada de açúcar em campo brilhante (→); C) oocistos e D) oocistos com esporozoítas visíveis, Ziehl-Neelsen/Modificado (→); E) presença de oocistos (→) nas glândulas gástricas de uma ratazana. H.E. (— = 10 µm) 52

FIGURA 2. Regressão linear dos diâmetros maior e menor dos oocistos de *Cryptosporidium muris* provenientes do habitat A: A - corados pelo Ziehl-Neelsen Modificado e B - campo brilhante/solução saturada de açúcar 56

- FIGURA 3.** Regressão linear dos diâmetros maior e menor dos oocistos de *Cryptosporidium muris* provenientes do habitat B: A - corados pelo Ziehl-Neelsen Modificado e B - campo brilhante/solução saturada de açúcar 57
- FIGURA 4.** Prevalência de protozoários do gênero *Cryptosporidium*, observados em fezes de *Rattus norvegicus*, capturados nos habitats A e B, de acordo com idade e sexo 60
- FIGURA 5.** Prevalência de protozoários do gênero *Cryptosporidium*, observados em fezes de *Rattus norvegicus*, capturados nos habitats A e B 61
- FIGURA 6.** Oocistos esporulados de *Eimeria nieschulzi* (A) e *E. separata* (B). Solução saturada de açúcar. (— = 10 µm) 65
- FIGURA 7.** Regressão linear dos diâmetros maior e menor de *Eimeria nieschulzi* provenientes do habitat A, observados em centrífugo flutuação modificada, em solução saturada de açúcar: A - oocistos e B - esporocistos 73

FIGURA 8. Regressão linear dos diâmetros maior e menor de <i>Eimeria nieschulzi</i> provenientes do habitat B, observados em centrífugo flutuação modificada, em solução saturada de açúcar: A - oocistos e B - esporocistos	74
---	----

FIGURA 9. Regressão linear dos diâmetros maior e menor de <i>Eimeria separata</i> provenientes do habitat A, observados em centrífugo flutuação modificada, em solução saturada de açúcar: A - oocistos e B - esporocistos	75
---	----

FIGURA 10. Regressão linear dos diâmetros maior e menor de <i>Eimeria separata</i> provenientes do habitat B, observados em centrífugo flutuação modificada, em solução saturada de açúcar: A - oocistos e B - esporocistos	76
--	----

FIGURA 11. Prevalência das espécies do gênero <i>Eimeria</i> , em ratazanas capturadas no habitat A	78
--	----

FIGURA 12. Prevalência das espécies do gênero <i>Eimeria</i> , em ratazanas capturadas no habitat B	79
--	----

FIGURA 13. Impressão de pulmão de ratazanas com <i>Pneumocystis carinii</i> . B e E) Pré-cistos com dois corpos intracísticos (►); A, B e E) pré-cistos com quatro corpos intracísticos (→); C, D e E) cistos com oito corpos intracísticos (→→), Giemsa (— = 50 µm); F) cistos, observando a parede cística (→→), Grocott (— = 10 µm)	82
--	----

FIGURA 14. Prevalência de ratazanas parasitadas por <i>Pneumocystis carinii</i> , capturados no habitat B, considerando idade e sexo	85
---	----

FIGURA 15. Pulmão de uma ratazana. Exsudato de coloração eosinofílica (a), colapsamento alveolar (b) e macrófagos (c). H.E. (— = 50 µm)	88
--	----

- FIGURA 16.** Pulmão de uma ratazana. Hipertrofia da parede alveolar (a), des-
camação celular (b), macrófagos (c) e hipertrofia celular (d).
H.E. (— = 50 μ m) 89
- FIGURA 17.** Pulmão de uma ratazana. Infiltração celular (a) e fibrose inter-
alveolar (b). H.E. (— = 50 μ m) 90
- FIGURA 18.** Pulmão de uma ratazana. Fibrose peribronquiolar (a), aspecto
papilar do bronquíolo com metaplasia de mucosa (b) e granuloma
parenquimatoso (c). H.E. (— = 50 μ m) 91
- FIGURA 19.** Aumento maior da Figura 18. Caracterização da área granuloma-
tosa, com presença de células gigantes (a) e linfócitos (b). H.E.
(— = 10 μ m) 92
- FIGURA 20.** Pulmão de uma ratazana. Hiperplasia celular da mucosa do bron-
quíolo (a), infiltrado celular no lúmen (b) e no parênquima (c).
H.E. (— = 50 μ m) 94

FIGURA 21. Pulmão de uma ratazana. Hipertrofia muscular da camada média de uma arteríola (a) e estenose do lúmen (b). H.E. (— = 50 μm) 95

RESUMO

Ratazanas em número de 173, foram capturadas aleatoriamente em dois habitats: um de característica urbana, no município de Nova Iguaçu e outro rural, no município de Seropédica, ambos localizados na microrregião homogênea Fluminense do Grande Rio, no estado do Rio de Janeiro. Estes animais foram agrupados considerando o seu habitat e, dentro dele, de acordo com a idade. Oocistos de *Cryptosporidium* foram observados em fezes dos animais nos dois habitats e, através da caracterização morfométrica e localização no trato gastrointestinal, foram considerados como *C. muris*. Observou-se uma frequência de 29 (16,77%) de animais parasitados nos dois habitats, sendo que a maior frequência foi atribuída aos animais com peso corporal superior a 201 g, considerados como adultos. *Eimeria nieschulzi* e *E. separata* foram encontradas nas fezes desses animais, independentemente dos habitats estudados, onde a maior frequência observou-se em animais com peso corporal entre 101 a 200 g, considerados como jovens. Quanto ao parasitismo misto por estas duas espécies, os resultados sugeriram a inexistência de interações

negativas ou mesmo competitivas entre ambas as espécies, tendo uma frequência de 47 (27,17%), superior ao parasitismo das espécies analisadas isoladamente. Quanto ao parasitismo por *Pneumocystis carinii*, este só foi observado no habitat urbano, onde de um total de 112 animais, 20 (17,86%) apresentaram lesões pulmonares e a maior frequência foi observada em animais com peso corporal de 101 a 200 g, considerados jovens, onde 10 (8,93%) estavam parasitados. As lesões macroscópicas foram bem definidas e pulmões tinham sua superfície caracterizada por áreas de coloração cinza pálido a castanho, com o seu volume aumentado. Histologicamente, as lesões foram caracterizadas como broncopneumonia intersticial crônica.

SUMMARY

Brown rats, in numbers of 173 were trapped at random in two habitats. The first habitat was characterized as rural, located at the Municipality of Seropédica, and the other as urban, localized at the Municipality of Nova Iguaçu, both in the homogeneous fluminense microrregion of Grande Rio, State of Rio de Janeiro, Brazil. These animals were grouped in accordance with their habitats, and within them in accordance with their age. Oocysts of *Cryptosporidium* were observed in feces of animals of both habitats and were characterized as *C. muris* by their morphometrical data and their location in the gastric glands of the host. The frequency of this parasite was observed in 29 (16.77%) of the animals independently of the habitats; being that, the major frequency was attributed to animals with body weight superior to 201 g, considered as adults. *Eimeria nieschulzi* and *E. separata* were pointed out in the feces of rats independently of the studied habitats. The major frequency was related to animals with body weight between 101 to 200 g, considered as young animals. Based on mixed infection caused by those species, the results

suggested the inexistence of negative or competitive interactions between both species, where the frequency was 47 (27.17%) superior when parasitism of both species of *Eimeria* was analyzed separately. The parasitism by *Pneumocystis carinii* was based on macroscopic lesions of the lungs. Of 112 animals studied, 20 (17.86%) were positive, and among the positive rats, the major frequency was observed in animals with body weight between 101 to 200 g, considered as young rats, and 10 (8.93%) of them were parasitized. The lesions of the lungs were only observed in rats of the urban habitat; so, this aspect characterized the disease caused by this parasite among rats as enzootic. The lesions of the lungs were well defined and were characterized macroscopically by enlargement of the organ with areas light gray to brown in color on their surface. Histologically, the lesions were characterized as chronic interstitial bronchopneumonia.

1. INTRODUÇÃO

De todas as famílias de roedores, a dos murídeos se destacou pela notável capacidade de proliferação e de adaptação. Nesta família encontra-se o “rato”, onde se destacam os gêneros *Rattus* e *Mus*. Nestes gêneros, observam-se espécies tais como o *R. norvegicus* (ratazanas), também conhecidos como ratos dos esgotos ou ratos pardos; *R. rattus* (rato da casa, rato das frutas, gabiru e rato de couro), conhecido também por nomes que correspondem à sua coloração variável, como rato preto, podendo apresentar-se pardo com ventre acinzentado ou branco, e o *M. musculus* (camundongos), também conhecido como mondongos e rato-catita. Membros dessas espécies, diferentemente dos roedores silvestres, vivem de preferência próximos à criação de animais domésticos e dos humanos, estes sendo responsáveis pelo fornecimento de condições básicas para a sua sobrevivência, ou seja, alimentos, abrigo e água.

Bem alimentados pelos resíduos de uma sociedade baseada no desperdício e protegidos em forros ou em enormes esgotos, os ratos se instalam em qualquer ambiente urbano e rural e jamais se hospedam em locais onde há escassez de alimentos.

Ao considerar todas as vantagens que os ratos apresentam, como a associação benéfica que os humanos lhes têm propiciado, consumindo os resíduos deixados por esses, eles obtêm com maior facilidade alimentos suficientes em áreas bem reduzidas, podendo desta maneira dedicar-se por mais tempo à sua prole, destacando neste aspecto a acentuada habilidade materna destes animais, facilitando para que haja um maior número de gerações, cada vez mais adaptadas às adversidades ambientais.

No gênero *Rattus*, observam-se animais muito astutos, a ponto de construir várias tocas para poder alcançá-las rapidamente em refúgio, em situações de saqueamento.

Estes roedores não produzem absolutamente nada, a não ser ratos e também não possuem uma rígida hierarquia social. Também chamados de roedores comensais ou sinantrópicos, os ratos “não têm interesse” em destruir a fonte de subsistência e com certeza se admirariam muito se pudessem compreender quantos temores sua presença provoca nos humanos, mas a situação contrária também existe.

As ratazanas possuem uma índole irrequieta, têm a característica de resistirem ao mais profundo estresse, conseguindo por exemplo, sobreviver e

reproduzir tanto em temperatura elevadíssima quanto em temperatura baixíssima, povoando com facilidade quaisquer ambientes. Além disso, são ótimas nadadoras e se sentem bem em ambientes bem úmidos. O esgoto não é um ambiente tão adverso, sendo até considerado um lugar tranquilo, onde não são perturbadas. Ali, possuem água, silêncio e numerosas vias de fuga. Elas, aparentemente não se abatem com a poluição, veneno, detergentes e produtos tóxicos. Talvez, por causa de uma progressiva adaptação, consigam beber de tudo, além do que se deslocam freqüentemente em longas migrações. Tudo isto, só poderá facilitar uma seleção genética que produzirá animais muito mais resistentes.

Quando os filhotes alcançam um certo grau de maturidade, são “despejados” das tocas, em comunidades onde o número de indivíduos está se tornando elevado, e eles se afastam em busca de uma nova moradia. Alguns abandonam completamente a comunidade e vagueiam à procura de uma nova comunidade de roedores, este hábito sendo responsável pela propagação de agentes infecciosos de uma comunidade de roedores para outra. Com este fato e também por serem animais que estão em estreita associação, não só com os humanos mas também com animais domésticos, estão em estreita relação com ambientes onde possam encontrar alimentos para a sua subsistência. Desta maneira, estes animais podem servir também como portadores de agentes infecciosos, tanto para os humanos quanto para os animais domésticos, seja através da transferência direta dos agentes causais ou como reservatórios.

Os roedores têm o seu destaque em saúde pública, por serem responsáveis pela transmissão de doenças causadas por bactérias, vírus, riquetsias e parasitas.

Os ratos servem como hospedeiros de uma grande variedade de agentes etiológicos de doenças parasitárias, tanto causadas por protozoários quanto por metazoários, sejam estas típicas do roedor ou passíveis de serem transmitidas para outros animais e o homem. Raramente resulta em morte do animal, mas pode causar infecção sub-clínica, na qual insidiosamente altera o comportamento do hospedeiro. Este efeito pode influenciar no aspecto reprodutivo, imunológico e hematológico destes animais (HSU, 1979).

O presente trabalho teve como propósito, determinar a presença de coccídias gastrintestinais e de *Pneumocystis carinii* em ratazanas provenientes de dois habitats, um de característica urbana e outro rural.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Cryptosporidium* TYZZER, 1907

2.1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde a descoberta do protozoário parasita do gênero *Cryptosporidium* em camundongos por TYZZER (1907), a infecção tem sido relatada em um grande número de hospedeiros vertebrados, em várias partes do mundo. Até então, a significância de sua patogenicidade não tinha sido inteiramente estimada, entretanto, na década de 70 a infecção foi implicada como responsável por diarreia em bovinos e humanos. Numerosos casos têm sido descritos clinicamente, tendo envolvimento primário deste protozoário causando criptosporidioses com diarreia em mamíferos, diarreia e/ou distúrbios respiratórios em aves e gastrites em répteis e possivelmente em peixes. A maior parte das infecções caracteriza-se como um processo brando a

moderado, ou como doença aguda em diferentes indivíduos saudáveis, especialmente em neonatos, porém, infecções assintomáticas têm sido encontradas frequentemente. Em outros casos, a infecção persiste e pode causar uma doença severa e crônica, particularmente em cobras e mamíferos imunocomprometidos. O parasita é agora reconhecido como um importante enteropatógeno em hospedeiros vertebrados que estejam na condição de imunocompetentes ou imunocomprometidos.

Durante alguns anos, o parasita foi considerado como hospedeiro-específico e 20 espécies do gênero foram assinaladas com base em sua ocorrência no hospedeiro. Estudos sobre transmissão cruzada demonstraram que a infecção foi facilmente transmitida entre diferentes espécies de hospedeiros, sugerindo-se uma única espécie para o gênero *Cryptosporidium* (TZIPORI *et al.*, 1980a). Com base nas evidências específicas das classes de vertebrados, LEVINE (1984) considerou como válidas quatro espécies: *C. muris* em mamíferos, *C. meleagridis* em aves, *C. crotali* em répteis e *C. nasorum* em peixes.

A importante característica que o tem distinguido da maior parte dos outros coccídios, tem sido a falta de especificidade para as espécies de mamíferos (TZIPORI *et al.*, 1980a e MOON & BEMRICK, 1981). Em experimentos de transmissão cruzada, usando isolados de animais de fazenda e humanos, TZIPORI *et al.* (1980b) verificaram que *Cryptosporidium*, poderia ser considerado como a única espécie do gênero, embora espécies de animais domésticos possam ser reservatórios do parasito para humanos.

Subseqüentemente, com estudos morfológicos, imunológicos e caracterizações bioquímicas, tem-se revelado diversificação na heterogenicidade de amostras de diferentes hospedeiros (UPTON & CURRENT, 1985; TILLEY *et al.*, 1990; NICHOLS *et al.*, 1991 e NINA *et al.*, 1992).

Entretanto, alguns trabalhos adicionais sobre as espécies do gênero *Cryptosporidium*, consideram também válidas as espécies, *C. parvum* e *C. muris* em mamíferos (UPTON & CURRENT, 1985 e CHRISP *et al.*, 1992) e *C. baileyi* em aves (CURRENT *et al.*, 1986).

Parasitos deste gênero têm sido observados em vários mamíferos, tanto silvestres quando domésticos, geralmente com localização intestinal (GOEBEL & BRAENDLER, 1982 e JOKIPPI *et al.* 1985). Em um único caso, este organismo foi encontrado no fígado, pulmão e coração de camundongos experimentalmente infectados com *C. parvum* isolados de bezerros (PAVLÁSEK, 1984).

Segundo KLESIUS *et al.* (1986), de 115 camundongos silvestres capturados em instalações de bovinos, 30% estavam infectados com *Cryptosporidium*; estes autores sugeriram que este ciclo pode ocorrer naturalmente: os bovinos infectando uns aos outros e os camundongos, com o mesmo ocorrendo entre os camundongos e entre camundongos e bovinos.

Ratos silvestres recém-nascidos, foram tão susceptíveis para infecção por *Cryptosporidium* quanto camundongos de laboratório recém-nascidos, segundo FAYER & UNGAR (1986).

Algumas infecções experimentais têm sido relatadas em roedores, utilizando como inóculo oocistos provenientes de outros mamíferos. Desta maneira, POHJLA & LINDBERG (1986) e ERNEST *et al.* (1986) obtiveram sucesso na infecção de roedores com oocistos obtidos de bovinos, o mesmo acontecendo quando RESSE *et al.* (1982) utilizaram oocistos procedentes de humanos.

SHEWOOD *et al.* (1982), demonstraram que isolados de *Cryptosporidium* ocasionaram infecção subclínica em oito raças de camundongos livres do patógenos.

Alguns trabalhos de prevalência em *R. norvegicus*, têm colocado, *Cryptosporidium* como uma ocorrência comum neste hospedeiro. ISEKI (1986), capturou 61 *R. norvegicus* e três *R. rattus* e observou que os oocistos tinham dois tamanhos, onde obteve os seguintes diâmetros: 5,3 x 4,8 µm (5,0-6,0 x 4,0-5,5) e 8,4 x 6,3 µm (7,5-9,8 x 5,5-7,0). Este autor, observou uma prevalência para *R. norvegicus* de 14,8% e não encontrou nenhum *R. rattus* parasitado.

YAMAURA *et al.* (1990), após capturarem 175 *R. rattus* e 48 *R. norvegicus*, verificaram uma prevalência de 17,7% e 2,1%, respectivamente. Os oocistos mensurados tiveram os seguintes diâmetros: 3,7 ± 0,22 x 4,8 ± 0,33 µm. Já MIYAJI *et al.* (1989), observaram uma prevalência de 48,5% em 171 *R. norvegicus* e de 21,3% em 47 *R. rattus* capturados.

2.1.2. HISTÓRICO

O desenvolvimento de estágios endógenos de um novo parasita foi descrito primeiramente em glândulas gástricas de camundongos de laboratório por TYZZER (1907 e 1910). O pequeno parasita aparecia fixado na superfície das células epiteliais. Estágios assexual e sexual foram descritos, sendo que estes culminavam com a formação de oocistos, contendo quatro esporozoítas. O parasita foi considerado ser representante de um novo gênero, semelhante a um coccídio, no qual foi nomeado de *Cryptosporidium* e a espécie denominada de *C. muris*. Similar parasito foi observado na parede intestinal de camundongos (TYZZER, 1912), sendo considerado como nova espécie por ter suas formas de desenvolvimento localizadas no intestino, sendo esta nominada de *C. parvum*.

SLAVIN (1955), descreveu a infecção por formas endógenas de *Cryptosporidium* nos intestinos de perus, associada à doença clínica aguda, esta caracterizada por severa diarreia e baixa mortalidade. Este autor, assinalou uma nova espécie ocorrendo em aves, denominando-a de *C. meleagridis*.

Adicional interesse veterinário, foi posteriormente despertado em infecções por *Cryptosporidium*, quando este foi detectado em bovinos com diarreia (PANCIERA *et al.*, 1971 e MEUTEN *et al.*, 1974). A partir destes, vários trabalhos foram divulgados, associando o parasitismo deste protozoário a doença aguda e crônica, em várias espécies de animais domésticos e silvestres,

particularmente em neonatos (FAYER & UNGAR, 1986). Mais tarde, vários trabalhos sobre a ocorrência de infecção com *Cryptosporidium* foram descritos em vários hospedeiros, porém, sua significância patogênica se desconhecia (FAYER & UNGAR, 1986).

Em 1976, foi publicado o primeiro caso em dois pacientes humanos com diarreia aquosa (MEISEL *et al.*, 1976). Posteriormente, outros achados foram descritos, mas o envolvimento de pacientes imunocomprometidos, com desordens imunológicas congênitas ou sofrendo terapia imunossupressora, foram mencionados por UNGAR *et al.* (1990).

O interesse médico foi evidenciado quando a Criptosporidiose se instalou em indivíduos imunocompetentes saudáveis, onde estes tiveram contato com bovinos infectados (CURRENT *et al.*, 1983) e quando infecções crônicas causadas por *Cryptosporidium*, foram associadas com a mortalidade em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), desenvolvendo a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), onde foi considerado como um patógeno oportunista (CURRENT & HAYNES, 1984).

Infecções têm sido associadas com doença clínica moderada em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes em várias partes do mundo (UNGAR *et al.*, 1990 e CURRENT & GARCIA, 1991) e infecções assintomáticas, têm sido relatadas com grande frequência em indivíduos saudáveis (O'DONOGHUE, 1995).

2.1.3. DIAGNÓSTICO

Existe uma variedade de testes laboratoriais que foram desenvolvidos para o diagnóstico das infecções determinadas por *Cryptosporidium*. A maioria envolve determinação direta dos oocistos do parasita, ou do seu desenvolvimento biológico em tecidos do hospedeiro. Métodos indiretos para o diagnóstico da infecção, baseados em parâmetros clínicos, têm sido considerados insatisfatórios. Os sinais da doença, quando presentes variam consideravelmente, de acordo com o estado nutricional e imunológico dos hospedeiros.

2.1.3.1. Determinação do desenvolvimento dos estágios endógenos

Os estágios endógenos do parasita tem grande afinidade pelos corantes Giemsa e Hematoxilina-Eosina, embora existam outros métodos de coloração, que não dão boa resolução do parasita nos tecidos.

Detalhes morfológicos do protozoário, têm sido estudados com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão e de varredura (LAGER & LANDAS, 1991).

2.1.3.2. Determinação dos oocistos

O diagnóstico mais comum, é realizado com auxílio da microscopia óptica, onde se pode observar os oocistos no material fecal do hospedeiro. Outros fluidos como suco gástrico, saliva, escarro ou aspirado pulmonar, podem ser examinados quando há a presença de infecções extraintestinais. Análises de amostras de águas também têm sido utilizadas para pesquisa de oocistos.

Existem várias técnicas de coloração para melhor visualização dos oocistos, tais como: coloração direta utilizando Giemsa (TZIPORI *et al.*, 1980b), Azul de Metileno (CROSS & MOORHEAD, 1984), Safranina (BAXBY *et al.*, 1984), Ziehl-Neelsen Modificado (HENRICKSEN & POHLENZ, 1981); corados pelo Fluorocromo, utilizando o Aurime-Rhodamine (MA & SOAVE, 1983), Aurime-Carbol Fuchsin (CASEMORE *et al.*, 1984), Acridine Orange (MA & SOAVE, 1983), Diamidino-Phenylindole (KAWAMOTO *et al.*, 1987); coloração negativa utilizando Carbol Fucsina (HEINE, 1982), Iodine (MA & SOAVE, 1983), Verde Brilhante (CHICHINO *et al.*, 1991), Merbromine (CHICHINO *et al.*, 1991).

Material à fresco ou fixado têm sido processado para análises laboratoriais, onde a fixação do material fecal em formalina a 10%, SAF (acetado de sódio + ácido acético + formol + água destilada) ou álcool polivinílico, não são compatíveis com os processos de coloração (O'DONOGHUE, 1995).

Imunofluorescência foi desenvolvida para detectar oocistos em amostras de águas contaminadas com fezes (STIBBS & ONGERTH, 1986) e reação de aglutinação em latex por POHJOLA *et al.* (1986a). A Imunofluorescência em material fecal e em amostras de águas têm sido utilizada por GARCIA *et al.* (1992) e o imunoensaio enzimático ou teste de ELISA por ROSENBLATT & SLOAN (1993); ambos os métodos são utilizados para detectar a presença de oocistos. Já anticorpos monoclonais têm sido utilizados para diagnosticar a presença dos estágios endógenos em tecidos (BONNIN *et al.*, 1990).

Técnicas de sedimentação (CURRENT & GARCIA, 1991 e O'DONOGHUE, 1992) e flutuação (WEBER *et al.*, 1992), têm sido desenvolvidas para facilitar a concentração de oocistos em material fecal.

2.1.4. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Infecções por *Cryptosporidium* já foram registradas em 170 diferentes espécies de hospedeiros em mais de 50 países localizados em zonas tropicais e temperadas do mundo.

Provavelmente todas as infecções foram adquiridas pela ingestão ou inalação de oocistos viáveis eliminados pelos hospedeiros infectados. Oocistos podem ser transmitidos diretamente de hospedeiro a hospedeiro, por contato direto ou indiretamente pelo ambiente, através da água e alimentos contaminados.

Transmissão de humanos para humanos, tem sido registrada entre membros de uma mesma família, parceiros sexuais (homossexuais e heterossexuais), pacientes de hospitais, funcionários de hospitais e crianças em creches (CASEMORE, 1990 e CURRENT & GARCIA, 1991).

Vários casos de transmissão têm sido de interesse em estudos epidemiológicos, a maioria envolvendo crianças e animais de estimação ou animais de fazendas, especialmente bovinos (MANN *et al.*, 1986 e POHJOLA *et al.*, 1986b). Transmissão caracterizando-se como uma zoonose têm sido confirmada por infecção acidental em laboratórios (ANDERSON *et al.*, 1982 e POHJOLA *et al.*, 1986c).

Casos de envolvimento de transmissão da infecção por aerosol em mamíferos, foram demonstrados por BLAGBURN & CURRENT (1983). Em aves, esta transmissão tem sido responsabilizada por disseminar a infecção respiratória nestes animais (HOERR *et al.*, 1978 e LINDSAY *et al.*, 1986).

A contaminação de águas foi sugerida como fonte de infecção entre viajantes, por JOKIPII *et al.* (1985) e severa diarreia subsequente foi associada com a contaminação de um poço (D'ANTONIO *et al.*, 1985), superfície de água (LeCHEVALLIER *et al.*, 1991), em piscina (SORVILLO *et al.*, 1992) e mesmo em superfícies de águas não tratadas, como rios, córregos e reservatórios (RICHARDSON *et al.*, 1991).

Contaminação de águas onde são despejados resíduos de lavagem de galpões de granjas leiteiras, estão propensos à contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* (HANSEN & ONGERTH, 1991).

Estudos epidemiológicos têm implicado contaminação de alimentos na transmissão da infecção, especialmente o leite não pasteurizado (CASEMORE, 1990). Alimentos estocados, não preservados ou impropriamente preservados, particularmente aqueles preparados com água não tratada ou cultivados em solos com fertilização humana ou animal, têm sido assinalados como fontes potenciais de infecção (O'DONOGHUE, 1995).

2.2. *Eimeria* SCHNEIDER, 1875

2.2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os coccídios têm sido considerados como os mais importantes parasitas de vertebrados. Pelo menos nove gêneros foram assinalados em roedores, sendo que a literatura para o gênero *Eimeria* é bem escassa.

A primeira descrição de uma espécie do gênero *Eimeria* parasitando *R. norvegicus*, foi assinalada em 1912 por OHIRA, denominando o coccídio de *E. miyarii*. Mais tarde, DIEBEN (1924) descreveu uma nova espécie como *E.*

nieschulzi. Em 1931, BECKER & HALL descreveram uma outra espécie, chamando-a de *E. separata*, parasitando o ceco de *Epemys norvegicus* (= *R. norvegicus*).

LEVINE em 1985, considerou somente as três espécies acima descritas, como parasitas de *R. norvegicus*.

A *E. miyarii* tem sido encontrada no intestino delgado de ratos silvestres, mas a sua incidência e patogenia em ratos de laboratório é desconhecida (HSU, 1979).

Com relação à *E. nieschulzi*, afeta ratos jovens causando diarreia, debilidade, emaciação e morte dos animais (PÉRARD, 1926). Mais tarde, BECKER (1934) estabeleceu que a severidade dos sintomas dependia da quantidade de oocistos ingeridos. Assim, ratos ingerindo 2.000 oocistos diariamente, por cinco dias, desenvolveram doença clínica e severa. Entretanto, ingestão de 30.000 a 100.000 oocistos produziu severa diarreia e morte dos animais no sétimo dia após a inoculação. BECKER & SMITH (1942) ao estudarem o efeito de vários constituintes da ração sobre a produção de oocistos de *E. nieschulzi*, estabeleceram que entre outros acontecimentos, a tiamina e a riboflavina diminuíram o número de oocistos e que às vezes enquanto o ácido pantotênico aumentava esta produção; já com o ácido nicotínico, não observaram nenhum efeito sobre a eliminação dos oocistos.

De acordo com BECKER (1934), a *E. separata* foi considerada apatogênica. Porém, quando grandes quantidades de oocistos foram administradas aos

roedores, sintomatologia clínica foi observada e morte de animais foi assinalada no sexto dia após infecção, observando-se hiperemia na parede do ceco e do colon.

No Brasil, já foram registrados trabalhos de prevalências com a espécie *E. miyarii* (PINTO, 1928), *E. nieschulzi* (FRÓES, 1976) e *E. separata* juntamente com a *E. nieschulzi* (DIAS *et al.*, 1981).

Aspectos de imunidade adquirida têm sido estudados com *E. separata* e *E. nieschulzi* (BECKER *et al.*, 1932; BECKER & HALL, 1933 e MARQUARDT *et al.*, 1987).

2.2.2. MÉTODOS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DOS COCCÍDIOS

O número de esporocistos e a distribuição dos esporozoítos dentro do oocisto são considerados bons caracteres para se diferenciar certos gêneros de coccídios (LEVINE, 1973a). Além disto, certas características dos oocistos são consideradas bons instrumentos taxonômicos para descrever diferentes espécies de coccídios, tais como: as dimensões, forma e cor do oocisto, as características da superfície da parede do oocisto e a presença de capuz polar da micrópila, as características do esporocisto e a presença ou ausência de grânulos ou corpos residuais no oocisto ou esporocisto.

Com relação às características dos oocistos, estas são de grande importância para diferenciar certos gêneros de coccídios. LEVINE (1982) enfatizou que existe diferenças entre os oocistos de cada gênero de coccídio e que no gênero *Eimeria*, caracteres dos oocistos podem ser usados para diferenciar as espécies. Entretanto, o tamanho do oocisto não é necessariamente constante, sendo comum o encontro de pleomorfismo. JONES (1932) observou que oocisto coletado de um indivíduo tem sido semelhante aos oocistos inoculados e eliminados em outros indivíduos, mostrando apreciável variação no seu tamanho. A forma tende a ser constante, mas variações de dimensões e índice morfométrico, freqüentemente têm sido citados como adicionais características específicas. NORTON & JOYNER (1981) mostraram que comprimento delineado contra a largura, inclina-se em uma linha, desta forma obtendo-se reflexos do tamanho do oocisto, bem mais exatos; então, as dimensões das médias servem para comparações entre espécies. A presença ou ausência de capuz polar ou distribuição de micrópila, podem ser características específicas, mas em alguns casos estas estruturas podem ser difíceis de serem visualizadas ou perdidas, devido ao processamento do material (LONG & JOYNER, 1984).

Os estágios endógenos de algumas espécies de *Eimeria* podem ser precisamente identificados, como foi observado por NORTON & JOYNER (1981) em galinhas, onde a primeira geração de esquizontes de *E. mitis* era bem mais volumosa

do que *E. acervulina*. TYZZER (1929), considerou que a posição desses estágios no epitélio pode ser uma característica de algumas espécies parasitas de galinhas.

POUT (1965), considerou que a variação no tamanho dos oocistos, ocorre como resultado de pesadas infecções.

Apesar de certos grupos de coccídios ocorrerem no mesmo hospedeiro, podem ser facilmente diferenciados pelos caracteres dos oocistos. Porém, são muito mais difíceis de se diferenciarem quando são comparados oocistos semelhantes de hospedeiros diferentes. Limitações adicionais sobre o uso de caracteres do oocisto para a identificação definitiva da espécie provém de vários efeitos ambientais sobre as dimensões do oocisto. Muitos trabalhos, apesar disto, têm usado as dimensões dos oocistos para diagnosticar ou descrever novas espécies (REDUKER *et al.*, 1985a; DUSZYNSKI & MOORE, 1986; MATUSCHKA, 1985; LAINSON & SHAW, 1989; McALLISTER & UPTON, 1990; UPTON *et al.*, 1990; PAUL *et al.*, 1991; McALLISTER & UPTON, 1992; UPTON *et al.*, 1992; McALLISTER *et al.*, 1993 e GAYADHAR, 1994).

Alguns autores têm observado um aumento no tamanho do oocisto durante a patência da infecção (BEIER & SIDORENKO, 1993 e MUSAEV & ISMAILOV, 1988), supondo que estas mudanças na morfologia e dimensões devam ser consideradas como uma pré-adaptação para seu completo desenvolvimento numa grande quantidade de hospedeiros.

A despeito destas limitações para o uso destes caracteres gerais do oocistos como ferramentas taxonômicas, LONG & REID (1982) assinalaram que certos caracteres são tão distintos que são particularmente viáveis como ferramentas taxonômicas.

Estudos de variação enzimática como uma ajuda na caracterização de algumas espécies do gênero, foram conduzidos por ROLLINSON (1975) em espécies parasitas de coelhos e ovinos e por SHIRLEY (1975) em espécies parasitas de galinhas.

Segundo SHIRLEY (1994), a identificação das diferentes espécies por eletroforese das enzimas foi uma evolução significativa no esclarecimento da taxonomia de espécies do gênero *Eimeria*, mas os avanços recentes no desenvolvimento de métodos de detecção baseados no DNA podem ter um impacto prático ainda maior. Embora a técnica da eletroforese de enzimas possa ser considerada como definitiva e relativamente sensível, ela possui várias desvantagens, incluindo a necessidade de números comparativamente grandes de oocistos e um alto grau de complexidade técnica. Em contraste, os métodos que analisam o DNA, definitivamente possuem vantagens, já que podem ser mais sensíveis, geralmente requerendo pequeno número de oocitos, são tecnicamente mais diretos, podem ser aplicados em grande número de amostras e servem para análise de rotina. Foram descritas várias abordagens para análise do DNA e as técnicas usadas nestes estudos, incluem: a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Análises de Polimorfismo de

Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLPS) e a Amplificação ao acaso de DNA polimórfico por PCR (RAPD-PCR). A amplificação PCR do DNA tem sido uma ferramenta muito eficaz e especialmente sensível quando os alvos de amplificação são seqüências de DNA altamente repetidas no genoma.

2.2.3. FILOGENIA ENVOLVENDO OS COCCÍDIOS

GARDNER & DUSZYNSKI (1990) ao estudarem várias espécies do gênero *Eimeria* em 364 tuco-tucos (*Ctenomys* spp.) representados por sete espécies coletadas em seis áreas de quatro habitats ecológicos distintos, localizados na Bolívia, verificaram em hospedeiros infectados com *E. opimi*, uma grande variabilidade no tamanho dos oocistos e esporocistos, mas com aspectos qualitativos uniformes (oocistos esféricos com corpo residual de grânulos grandes, parede externa fina, grandes esporozoítos com o corpo refrátil, corpo de Stieda, grânulo polar, resíduo de esporocisto de 2-3 grânulos). As medidas variaram de 20,9 x 19,2 µm a 24,3 x 21,8 µm, e de 10,3 x 7,0 µm a 11,6 x 7,7 µm para oocistos e esporocistos, respectivamente. Ainda, o índice morfométrico (IM) foi essencialmente o mesmo (IM = 1,1) para os oocistos, e nos esporozoítos variou de 1,3 a 1,5. Desta forma, os autores concluíram que estavam documentando uma situação natural em que os oocistos presumivelmente de uma única espécie de *Eimeria* eram encontrados em indivíduos estreitamente relacionados, mas geograficamente separados.

Em 1988, BARKER *et al.* estudaram associações hospedeiro-parasita específico do gênero *Eimeria* em cangurús-dos-rochedos (*Petrogale* spp.). Como estes cangurus formavam um grupo de 11 espécies bem definidas e estudadas quanto ao cariótipo, homologia isoenzimática, análise de DNA mitocondrial, hibridação, morfologia e distribuição geográfica, procuraram catalogar seus coccídios e verificar possíveis relações entre a distribuição das espécies parasitas e a filogenia de seus hospedeiros.

Neste estudo, os oocistos esporulados de cada espécie de *Eimeria* foram caracterizados e identificados morfologicamente. Os resultados sugeriram existir uma relação entre os grupos de espécies de Cangurus, e as espécies de *Eimeria* que os parasitavam. Quando uma espécie de *Eimeria* é encontrada em mais de um grupo de espécie de vertebrados, significa que os hospedeiros possuem amplitudes geográficas contíguas.

Em 1987, REDUKER *et al.* realizaram um estudo do relacionamento filogenético evolucionário entre parasitos do gênero *Eimeria* que infectavam roedores Cricetídeos.

O primeiro objetivo desta análise foi observar o relacionamento evolucionário entre o táxon dos eimerídeos, evidenciado pela estrutura do oocisto, dados históricos e caminhos de separação enzimática.

O segundo objetivo foi examinar a filogenia dos parasitos, de acordo com o conhecimento contemporâneo concernente à afinidade evolucionária entre o

táxon dos hospedeiros. Os parasitas foram obtidos de animais naturalmente infectados e capturados no ambiente. *E. nieschulzi* parasita de *R. norvegicus* e *E. papillata* parasita de *M. musculus*, parasitam roedores da família Muridae, os quais são filogeneticamente distintos da família Cricetidae, e ambas as espécies possuem oocistos com características semelhantes aos das eimérias dos Cricetídeos; então, por estas razões, foram incluídos nas análises genéticas com propósitos comparativos, e nas análises cladísticas como um táxon externo.

Na análise dos dados morfológicos e históricos (análise genética), 26 características estruturais de oocistos esporulados foram examinadas de cada espécie hospedeira.

Os resultados da análise genética revelaram duas linhas distintas de espécies de *Eimeria*: as do tipo A (*E. albigulae*, *E. arizonensis* e *E. peromysci*) foram caracterizadas por possuir oocistos sub-esféricos com membrana externa rugosa, esporocisto piriforme, resíduo no oocisto, corpo de Stieda proeminente e duas paredes distintas; e as do tipo B, compostas de dois subgrupos, um composto dos dois isolados de *E. langebarteli* e *E. delicata*, e o outro de *E. lachrymalis* e *E. ladronensis* com *E. nieschulzi*. O grupo B se caracterizou por possuir oocistos elipsóide, parede única lisa e definida, sem resíduo, esporocisto elipsóide de parede fina, e pequeníssimo corpo de Stieda.

A análise cladística demonstrou claramente duas linhagens distintas de espécies de *Eimeria* no cladograma e correspondeu perfeitamente às eimérias do tipo

A e do tipo B obtidas na análise genética. A *E. papillata* pareceu ter possuído um ancestral comum mais recente com os eimerídios do Tipo A, do que com do tipo B. Dentro dos eimerídios do tipo A, *E. arizonensis* e *E. peromysci* foram os táxons mais derivados. Seis sinapomorfias indicaram um ancestral comum para a linhagem de *E. arizonensis*, *E. peromysci* e *E. albigulae*.

Para as eimerias do tipo B, o grupo foi composto de duas linhagens: um contendo o táxon - irmão da *E. lacrimalis* e *E. ladronensis*, e outro contendo o “táxon - irmão” da *E. langebarteli* e *E. delicata*. Estas duas linhagens de espécies foram unidas por cinco sinapomorfias (12A, 15B, 22A, 24B, 29D). As linhagens do tipo B e tipo A foram unidas por duas sinapomorfias (17B, 8B).

A análise eletroforética dos hospedeiros foi utilizada para construir o cladograma mais parcimonioso; os dados se assemelham às análises morfológicas e cariotípicas prévias, indicando que *Peromyscus leucopus*, *P. maniculatus* e *P. truei* dividiram um ancestral comum após as divergências de *P. eremicus*. Contudo, os dados eletroforéticos foram inconclusivos em elucidar as afinidades filogenéticas entre *P. leucopus*, *P. maniculatus* e *P. truei* em virtude do grande número de alelos autopomórficos e homoplasias aparentes nestes três táxons, colocando-os como uma linhagem de tricotomia não resolvida.

Comparando os cladogramas de parasitos e hospedeiros, a evidência de descendência mútua parasito-hospedeiro não ficou clara a partir do cladograma constituído com os dados morfológicos e históricos dos oocistos, até que as

linhagens tipos A e B fossem examinadas independentemente. Ficou evidenciada uma certa congruência filogenética parasito-hospedeiro em que espécies de *Eimeria* dentro dos grupos do tipo A e tipo B refletiram uma filogenia a nível genético dos hospedeiros, pois os parasitos mais “derivados” foram encontrados infectando também os hospedeiros mais “derivados”.

2.3. *Pneumocystis carinii* DELANÖE & DELANÖE, 1912

2.3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O organismo é considerado como um importante patógeno oportunista, causador de pneumonia fatal, onde os hospedeiros podem estar imunodeficientes ou imunossuprimidos (MATSUMOTO & YOSHIDA, 1986). São unicelulares e podem causar infecção em animais domésticos, silvestres e também em humanos. Segundo BARTON & CAMPBELL (1969), este organismo tem se estabelecido em pulmões de animais e humanos com estado imunológico normal. Alguns autores têm encontrado facilmente a doença em pulmões de ratos tratados com corticosteróides (WALZER *et al.*, 1979; GRIFFIN & LUCAS, 1982 e HUGHES, 1982a).

Pneumocystis carinii é um organismo parasita extracelular, freqüentemente se estabelecendo nos alvéolos pulmonares, ocasionalmente em locais

extrapulmonares, tais como: linfonodos, timo, baço, fígado e medula óssea (BARNETT *et al.*, 1969).

Tem sido assinalada em várias espécies de mamíferos: cobaias (CHAGAS, 1909), ratos (CARINII, 1910 e DELANÖE & DELANÖE, 1912), cães, gatos e sagüi (CHAGAS, 1911), coelhos (ARAGÃO, 1913), caprinos (GUERREIRO & MACHADO, 1913 e MEER & BRUG, 1942), ovinos (GUERREIRO & MACHADO, 1913 e JÉCNY, 1973), camundongos (PORTER, 1915), gambás e lebres (MEER & BRUG, 1942), humanos (MEER & BRUG, 1942 e VANÉK & JIROVEC, 1952), suínos (NIKOLSKIJ & SÉETININ, 1967 e JÉCNY, 1973), bovinos (JÉCNY, 1973), cavalos (SHIVELY *et al.*, 1973), pombos (POELMA, 1975), chimpanzés (McCLURE *et al.*, 1974 e POELMA, 1975), cangurus, esquilos, raposas, ursos, sagüis e macacos (POELMA, 1975), preguiça (LAISON & SHAW, 1975 e POELMA, 1975), e tendo maior prevalência em roedores (*R. norvegicus*) (DELANÖE & DELANÖE, 1912; MEER & BRUG, 1942; ARAGÃO, 1913; JIROVEC, 1954; CABRAL DE SOTERO, 1956; KUCÉRA, 1966; LAGE & LAGE, 1973; YOSHIDA & IKAI, 1979 e SETTNES & LODAL, 1980).

SETTNES & LODAL (1980) na Dinamarca, assinalaram uma alta prevalência de *P. carinii* em *R. norvegicus* quando compararam a outros roedores capturados em várias regiões deste mesmo país. Tem sido sugerido que a pneumonia causada pelo *P. carinii* (PPC) pode ser uma doença zoonótica e que animais domésticos e de estimação podem agir como reservatórios (RUSKIN, 1976).

2.3.2. HISTÓRICO

O organismo foi observado pela primeira vez por CHAGAS (1909) em pulmões de roedores infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*. CARINII (1910), descreve formas similares em pulmões de ratos infectados experimentalmente com *T. lewisi*. Esses autores, consideraram que essas formas, denominadas de formas císticas, correspondiam a formas evolutivas desses protozoários, considerando as mesmas como um novo estágio em seu ciclo biológico.

Em 1912, DELANÖE & DELANÖE, ao observarem novamente a presença do organismo em pulmões de ratos infectados experimentalmente com *T. lewisi*, descreveram uma nova espécie, denominando o organismo de *P. carinii* e assinalando o seu tropismo pulmonar.

O primeiro caso de *P. carinii* em humanos, foi descrito em 1942 na Holanda, por MEER & BRUG. Na década de 40, uma forma particular de pneumonia foi registrada em crianças prematuras e em crianças mal nutridas, durante a segunda guerra mundial, onde pela primeira vez associou-se a patogenicidade do organismo (VANÉK, 1951).

As primeiras imagens de ultraestrutura surgiram em 1954, por DIECKMANN *et al.* A partir daí, vários trabalhos sobre sua ultraestrutura, combinando

a casos clínicos com estudos morfológicos, citoquímicos, imunológicos e bioquímicos, foram relatados.

WELLER em 1955, ao realizar tratamento experimental em ratos com corticosteróides, observou que esses animais induziam a uma PPC e mencionou ser um agente oportunista em indivíduos imunossuprimidos.

IVADY & PALDY (1958) obtiveram sucesso no tratamento da PPC utilizando pentamidine, agentes anti-tripanosomal e anti-leishmanial, sendo o primeiro caso reportado da eficácia terapêutica de casos confirmados da doença. Outro agente efetivo foi descrito em 1975 por HUGES *et al.* utilizando o trimetropin e a sulfamethoxazole. Esses autores, utilizando essas drogas, obtiveram em 1977 uma redução da freqüência da PPC em crianças portadoras de leucemia linfocítica, submetidas à terapia imunossupressora.

Nos anos 60-70, *P. carinii* foi agente comum de pneumonia em pacientes imunodeprimidos. Os grupos de risco foram crianças com imunodeficiência congênita e pacientes de várias idades que receberam tratamento prolongado com corticosteróides ou outros agentes imunossupressores, como em indivíduos em tratamento contra o câncer ou aqueles que se submeteram a transplantes de órgãos.

A partir de 1980, *P. carinii* tem representado um dos mais freqüentes organismos encontrados em pacientes imunodeprimidos; de 60 a 80% de indivíduos portadores do vírus HIV, evoluem para um quadro de infecção, com uma PPC que

causa 25% de óbitos (HUGHES, 1987). Até o presente momento, vários trabalhos têm sido conduzidos com esses indivíduos.

2.3.3. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

A epidemiologia característica de *P. carinii* é escassamente estudada.

O organismo ocorre naturalmente em uma grande variedade de mamíferos, sejam estes silvestres ou domésticos (HUGHES, 1987). Casos agudos ou crônicos em animais domésticos têm sido observados, mas animais aparentemente saudáveis podem também alojar o organismo (LIPSCHIK & MASUR, 1991).

O provável modo de transmissão da infecção, resulta da inalação de formas císticas do organismo, tanto em humanos (HUGHES, 1982b e HUGHES *et al.*, 1983), quanto em animais (HENDLEY & WELLER, 1971). Entretanto, estudos soroepidemiológicos em crianças saudáveis demonstram altas taxas de anticorpos para *P. carinii* (PIFER *et al.*, 1978), por mais de dois anos, sugerindo que a infecção primária é assintomática e clinicamente a pneumonia é uma reação primária em latência.

Indivíduos com sistema imune intacto, não demonstraram manifestações da infecção e infecções em latência em humanos resultam em sintomas clínicos quando estes estiverem imunocomprometidos (LIPSCHIK & MASUR, 1991). Porém,

a maior dificuldade encontrada é para a investigação da presença da infecção assintomática em animais, visando a um controle do organismo (FRENKEL *et al.*, 1966), já que transmissão intrauterina, transplacentária e através do leite materno, também têm sido relatadas por BURKE & GOOD (1973).

A possível transmissão da infecção de animais para humanos tem sido considerada, mas alguns autores admitem que a infecção em humanos, apenas ocorra pela passagem entre os mesmos (HUGHES, 1975; SINGER *et al.*, 1975 e CHUSID & HEYRMAN, 1978). Segundo FRANKEL *et al.* (1966), os animais são as principais fontes de transmissão da infecção por este agente etiológico para os humanos.

2.3.4. BIOLOGIA

Para explicar o ciclo biológico deste organismo nos alvéolos pulmonares, alguns trabalhos têm se utilizado de investigações pela microscopia eletrônica (ITATANI & MARSHALL, 1988 e YOSHIKAWA & YOSHIDA, 1987).

O ciclo biológico completo ocorre nos pulmões de vários mamíferos e é direto. Quatro formas têm sido descritas no tecido pulmonar: a) pré-cistos, b) cistos, c) corpos intracísticos e d) trofozoítas. MATSUMOTO & YOSHIDA (1984), utilizando a microscopia eletrônica, mostraram divisões nucleares no pré-cisto, as quais foram consideradas divisões meióticas e mitóticas, descrevendo

também com detalhes a formação de corpos intracísticos e os estágios de pré-cistos, dando origem aos trofozoítas.

2.3.4.1. Definição geral das fases do ciclo biológico

a. Pré-cisto

É definido como uma forma intermediária ao trofozoíta e à forma de cisto, tendo um diâmetro de 3 a 5 μm (VAVRA & KUCERA, 1970 e TAKEUCHI, 1980).

Ultraestruturalmente, o pré-cisto é caracterizado por ser de forma ovóide, ao passo que os trofozoítas são de forma irregular.

O número de núcleos aumenta de um para oito e estes decrescem em tamanho, de 2,0 para 0,5 μm , como resultado das divisões nucleares (MATSUMOTO & YOSHIDA, 1984).

O pré-cisto se divide em três fases: pré-cisto precoce, pré-cisto intermediário e pré-cisto tardio ou maduro. Estas fases caracterizam-se de acordo com as divisões nucleares decorrentes dos processos meióticos e mitóticos.

b. Cistos e corpos intracísticos

O cisto caracteriza-se por apresentar uma forma subesférica, tendo entre 4 e 6 μm de diâmetro e circundado por uma espessa e rígida parede. O seu citoplasma contém uma massa nuclear que separa os corpos intracísticos. Cada cisto contém oito corpos intracísticos, cada um tendo de 1 a 2 μm de diâmetro e estão contidos no cisto maduro. O cisto após a ruptura é de forma irregular e muitas vezes aparece com o formato de meia lua, por causa do colapso da parede do mesmo.

SETTNES & LODAL (1980) demonstraram, com a impressão de tecido pulmonar de ratos, em lâminas, cistos corados com Azul de Toluidina (CHALVARDJIAN & GRAWE, 1963). As formas císticas apresentaram boa afinidade por este corante. Cistos maduros tinham de 4 a 8 μm de diâmetro quando corados pelo Giemsa, revelando estruturas internas, ou seja, corpos intracísticos claramente visíveis, porém, não coravam a membrana de sua parede externa. Os corpos intracísticos foram bem visíveis, em número de dois, quatro ou oito.

SETTNES & HENRIKSEN (1989), utilizando impressão do tecido pulmonar de suínos, observaram formas císticas, coradas pelo Azul de Toluidina, mas não observaram internamente os corpos intracísticos.

c. Trofozoítas

Apresentam-se com o formato amebóide, com 2 a 10 μm de diâmetro, possuem um único núcleo, bem visível ao microscópio óptico, e um citoplasma contendo organelas que são bem visíveis à microscopia eletrônica.

Os trofozoítas fundem-se para dar origem a formas diplóides, as quais se desenvolvem dando origem ao pré-cisto; há formas intermediárias aos trofozoítas e cistos, nas quais o número de núcleos cresce de um para oito. O estágio maduro de pré-cisto contém oito corpos intracísticos, cada um com um núcleo, mitocôndrias e algum citoplasma adjacente circundado por uma limitada membrana. Com a ruptura do cisto, os corpos intracísticos com número cromossômico $2n$, serão liberados e desenvolverão trofozoítas que prosseguirão o ciclo de vida (MATSUMOTO & YOSHIDA, 1984).

2.3.5. POSIÇÃO TAXONÔMICA

A classificação de *P. carinii*, até o presente momento é considerada incerta. Alguns trabalhos o consideram como fungo e outros como protozoário, devido ao não crescimento do organismo em cultivo *in vitro* (LATORRE *et al.*, 1977; PIFER & HUGHES, 1977 e BARTLETT *et al.*, 1979) e à não existência de uma

tecnologia que permita obter detalhes metabólicos e bioquímicos deste organismo, para colocá-lo em uma posição taxonômica definida.

Estudos taxonômicos têm utilizado análises histológicas e ultraestruturais em tecidos infectados e alguns trabalhos têm classificado-o como um protozoário, baseando-se na aparência amebóide do trofozoíta, a presença de filopodia, similaridades estruturais de mitocôndrias e as características de sua parede cística (CHAGAS, 1909; DELANÖE & DELANÖE, 1912; JIROVEC & VANEK, 1956 e BARTON & CAMPBELL, 1969). Outras características que o classificam como protozoário, seriam a incapacidade de crescimento em meios utilizados comumente para fungos, a ausência do ergosterol da membrana cística, explicando a sua resistência à Anfotericina B, um antifúngico de largo espectro, e a sensibilidade a agentes antiprotozoários incluindo o trimetropin-sulfamethoxazole, sulfamidas, isotionato de pentamedine e α -difluorometilornitine (PIFER & HUGHES, 1977; HUGHES *et al.*, 1978 e YOSHIKAWA *et al.*, 1987).

As afinidades tintoriais da parede cística (MATSUMOTO *et al.*, 1989), assim como também um pequeno desenvolvimento de mitocôndrias, uma organização muito pobre no desenvolvimento de retículo endoplasmático (RE) e a escassez de outras organelas (HUGHES, 1989), caracterizam este organismo como fungo.

Estudos de ultraestrutura têm mostrado que as mitocôndrias de *P. carinii* apresentam cristas lamelares (TAKEUCHI, 1980 e RUFFOLO *et al.*, 1989), aspecto comum à maior parte dos fungos, sendo que nos protozoários observam-se

cristas tubulares (RUFFOLO *et al.*, 1989). Existem controvérsias com relação a esses dados; através de estudos citoquímicos, as criptas mitocondriais revelam-se tubulares, com a base ligeiramente achatada (PALLUAULT *et al.*, 1991 e 1992). Entretanto, a presença de criptas lamelares são observadas em vários protozoários, como cryptomonadinas, euglenas e zooflagelados (DE PUYTORAC *et al.*, 1987). Alguns fungos patogênicos apresentam criptas mitocondriais freqüentemente lamelares, enquanto em outros grupos de fungos elas são tubulares (GARRISON, 1983).

Comparação da seqüência ribossomal do RNA, é um forte instrumento para solucionar a origem filogenética (WOESE, 1987). Analisando clonagem da subunidade 16S do rRNA, revelou-se estreita semelhança entre os fungos *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa* e diferenças com o protozoário *T. brucei* (EDMAN *et al.*, 1988 e STRINGER *et al.*, 1989). Análises da fração 5S da seqüência ribossomal do rRNA, sugerem que *P. carinii* está em associação muito próxima aos grupos: Rhizopoda, Myxomycota e Zigomycota, chamado provisoriamente de “Protista Fungi” (WATANABE *et al.*, 1989).

Características de genética molecular têm sido utilizadas para elucidar a sua classificação. As enzimas timidilato sintetase (TS) e dihidrofolato redutase (DHFR), existentes comumente na mesma proteína bifuncional, têm sido seqüenciadas e ambas se assemelham mais ao *S. cerevisiae*. Entretanto, em *P. carinii*, estas enzimas são duas dependentes polipeptídicas separadas e monofuncionais, da qual o código por dois genes se encontram em cromossomos diferentes (EDMAN *et*

al., 1988). Isto contrasta com as características de vários protozoários, onde estas duas atividades enzimáticas são encontradas em uma mesma proteína bifuncional (BEVERLY *et al.*, 1986).

A síntese protéica das células eucarióticas necessita de dois fatores (FE-1 e FE-2). A síntese protéica entre numerosos gêneros de fungos necessita de três fatores (FE-1, FE-2 e FE-3). O FE-3 não foi detectado em *P. carinii* (JACKSON *et al.*, 1991), portanto, podendo não ser considerado como um fungo.

A correta classificação do organismo tem importância prática, uma vez que uma micose pulmonar difere de uma protozoose, nos aspectos epidemiológicos, clínicos, fisiológicos e histopatológicos (DEI-CAS *et al.*, 1992). Desta maneira, fica o argumento de MARGULIS *et al.* (1989), que mantiveram este organismo nos *Incertae sedis* dentro do filum Rhizopoda.

2.3.6. DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico definitivo da PPC, exige-se uma identificação microscópica do organismo, onde geralmente é demonstrado em escarro, ou em secreções nasofaringeana, traqueal e brônquica (ESTERLY & WARNER, 1965 e TOTH *et al.*, 1966).

Elevadas taxas de casos positivos de *P. carinii*, em humanos, têm sido observadas por biópsia de pulmões abertos, biópsia percutânea ou aspiração pulmonar

com agulha, biópsia transbronquial de pulmões ou biópsia endobronquial (HUGHES, 1975).

Técnicas de coloração de amostras de tecidos, fluidos e secreções demonstram que o organismo tem grandes afinidades por três tipos de corantes: baseado na prata (GROCOTT, 1955); Azul de Toluidina (CHALVARDJIAN & GRAWE, 1963); Giemsa ou Azul de Metileno (KIM & HUGHES, 1973) e modificações dos mesmos, que são comumente utilizadas. Corados pela prata, observa-se a parede cística de coloração marrom claro para escuro e as estruturas intracísticas e trofozoítas não apresentam afinidades por este corante. Com a utilização do Azul de Toluidina, observam-se cistos com a parede de cor púrpura e as estruturas intracísticas e trofozoítas, semelhantemente ao corante anterior, não são tingidas. Em material corado pelo Giemsa ou o Azul de Metileno, a parede cística não apresenta afinidade por estes corantes, mas as estruturas intracísticas e trofozoítas apresentam-se coradas de azul ou púrpura, produzindo característica perfeita de seu aspecto, que permite identificação do *P. carinii*, sem erros. Entretanto, preparações coradas pelo Giemsa podem revelar afinidades por outras estruturas no campo, dificultando a identificação do organismo.

Não são realizados testes sorológicos para a avaliação do diagnóstico, por não se conseguir realizar culturas *in vitro* de *P. carinii* (LIPSCHIK & MASUR, 1991).

Avaliação por imunofluorescência direta tem baixa sensibilidade para o seu diagnóstico (KOVACS *et al.*, 1986 e MASUR *et al.*, 1988).

Testes de fixação de complemento têm sido vantajosos para o diagnóstico epidemiológico da PPC em crianças. Na Europa, 75% a 97% das crianças com *P. carinii*, produziram anticorpos mensuráveis pelo teste (BARTA, 1969).

Histologicamente, quando o material é corado pela Hematoxilina-Eosina os alvéolos apresentam intenso infiltrado celular e presença de exsudato eosinofílico intra-alveolar, ocorrendo obstrução dos mesmos, acompanhado de hipertrofia das células alveolares e descamação das mesmas, com infiltrado intersticial mononuclear (PRICE & HUGHES, 1974). SETTNES & LODAL (1980), com amostras de corte histológico de pulmões de *R. norvegicus*, observaram estas alterações quando o material foi submetido à coloração pelo Giemsa.

O material eosinofílico, supõe-se ser composto de restos de processos degenerativos, organismos coalescentes e macrófagos (HUGHES, 1987), sendo compatível com a PPC. Entretanto, a presença do organismo deverá ser confirmada pelas técnicas de colorações especiais. ASKIN & KATZENSTEIN (1981), notaram o clássico exsudato intra-alveolar, que inclusive pode estar ausente. Estes autores descreveram que, de nove biópsias pulmonares de pacientes com PPC, em apenas uma evidenciam-se danificação alveolar difusa quando coradas pela HE. Outros trabalhos

descrevem fibrose intersticial (PRICE & HUGHES, 1974), edema intersticial (BRENNER *et al.*, 1987) e formação granulomatosa (BLUMENFELD *et al.*, 1988).

Pneumocistose extrapulmonar tem sido descrita com a presença de material eosinofílico reticulado afetando os tecidos (CARTER *et al.*, 1988) e reação granulomatosa também tem sido notada (SCHINELLA *et al.*, 1987).

BILLE-HANSEN *et al.* (1990), observaram em amostras de pulmões de suínos, coradas com HE, que o epitélio apresentou-se descamado, com a presença de macrófagos; em alguns alvéolos, a presença de células epiteliais, macrófagos e linfócitos foi predominante. Em material pulmonar quando corado pelo método de Grocott, foram identificadas formas esféricas crescentes e cistos vazios situados em grupos na luz alveolar. Alguns cistos foram observados aderidos ao epitélio, podendo se estabelecer no citoplasma de macrófagos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram capturados aleatoriamente 173 ratos (*R. norvegicus*), em duas áreas distintas, com o auxílio de armadilhas aramizadas e iscas variadas.

3.1. LOCAIS DE CAPTURA

Para captura dos animais foram escolhidos dois habitats, localizados na microrregião fluminense do Grande Rio (FIBGE, 1985), no estado do Rio de Janeiro. O primeiro (A) localizado em áreas rurais do município de Seropédica e o segundo (B) localizado em área urbana no município de Nova Iguaçu.

3.1.1. HABITAT A

Esta área foi considerada como de ambiente aberto, com pastagem próxima à criação de animais domésticos, onde havia disponibilidade de alimentos, tanto de origem vegetal quanto de origem animal, ambos sob a forma de ração.

Neste local a população de roedores era considerada abundante e observava-se uma grande quantidade de tocas no solo. À noite a presença dos mesmos nas instalações dos animais domésticos era uma constante, à procura de alimentos.

Desse ambiente foram capturados 61 animais com diferentes faixas etárias.

3.1.2. HABITAT B

Neste segundo ambiente, considerado como uma área fechada, os roedores praticamente não precisavam se locomover para irem à procura de alimentos, pois o ambiente dispunha de uma reserva muito grande de nutrientes de origem vegetal, tais como: milho, farelo de casca de arroz, farelo de arroz desengordurado, farelo de trigo e proteinose, e também alimentos de origem animal, como farinha de carne, peixe, penas e vísceras.

Neste local era comum a presença de insetos, pombos e gatos, estes como uma forma de tentar controlar a população de roedores, que era abundante neste ambiente.

Ao redor deste ambiente encontrava-se um depósito de lixo, assim como também uma população de humanos em condições precárias de subsistência, onde algumas famílias criavam a solta alguns suínos, aves e constantemente observava-se a presença de cães e gatos.

Esse ambiente era fechado com alvenaria, mas observava-se nitidamente várias tocas fazendo uma conexão entre as populações vizinhas de humanos e animais domésticos, ou seja, provavelmente existiam colônias de roedores que habitavam este local constantemente e colônicas de roedores de fora, que penetravam facilmente neste ambiente à procura de alimentos.

Da mesma forma que o ambiente anterior, a presença destes roedores à noite era uma constante, mas em proporções bem maiores que o anterior.

Desse ambiente foram capturados 112 animais de diferentes faixas etárias.

3.2. ANIMAIS CAPTURADOS

Quando havia animais nas armadilhas, estes eram anestesiados dentro das mesmas, com éter-sulfúrico e após este procedimento eram transferidos para caixas

plásticas, com o máximo de dois animais por caixa, onde os mesmos tinham água e ração¹ *ad libitum*. Estes animais eram transportados para o laboratório da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, do Departamento de Parasitologia Animal, no Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde permaneciam nas caixas plásticas no máximo uma semana e após este tempo eram necropsiados.

3.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

3.3.1. NECROPSIA

Para sacrifício dos roedores, utilizou-se o éter-sulfúrico; após a morte, os animais foram separados de acordo com o sexo e a faixa etária; esta foi avaliada após a pesagem dos mesmos e classificados segundo CALHOUN (1962), onde animais com 100 gramas foram considerados como jovens, de 101 a 200 gramas como adolescentes e os que apresentavam peso corporal superior a 201 gramas foram avaliados como adultos (Tabela 1).

¹ PURINA - São Paulo.

TABELA 1. Número de animais capturados nas áreas A e B, avaliados considerando peso e sexo.

Idade dos animais	Área de captura				Total
	Área A		Área B		
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	
Até 100 g (jovens)	10	8	11	6	35
Entre 101 e 200 g (adolescentes)	6	8	32	21	67
Superior a 201 g (adutos)	19	10	25	17	71
Total (sexo)	35	26	68	44	-
Total (área)	61		112		173

Na necropsia, procedeu-se primeiramente ao exame macroscópico dos pulmões e do conteúdo gastrointestinal, este para a realização de raspado de mucosa e esfregaço em lâminas, e nos pulmões para a observação de lesões que conferissem alguma anormalidade deste órgão.

3.3.2. EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES

No período anterior à necropsia e durante a mesma, foram colhidas amostras fecais de todos os animais capturados; estas foram masseradas e coadas em gase e acondicionadas em recipientes contendo dicromato de potássio a 2,5%, na proporção de 1:3, em temperatura ambiente, que após uma semana com a utilização do método de Centrífugo Flutuação Modificada (FIGUEIREDO *et al.*, 1984), foram analisadas para verificação da presença de oocistos dos gêneros *Eimeria* e *Cryptosporidium*.

Na presença de oocistos do gênero *Cryptosporidium*, o material fecal foi submetido a várias centrifugações com água destilada para a retirada ao máximo do dicromato de potássio e confeccionavam-se esfregaços do sedimento, em lâminas, onde utilizou-se a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada (HENRICKSEN & POHLENZ, 1981), para melhor visualização destes oocistos.

3.3.3. EXAME DOS PULMÕES

Em animais cujo exame macroscópico os pulmões revelasse suspeita de alterações, realizavam-se impressões em lâminas, onde após secagem eram fixadas pelo metanol por três minutos e coradas pelo Giemsa na proporção de 1 ml de solução tampão (pH 7.2) e três gotas de corante, deixando agir por 30 minutos.

O material positivo para *P. carinii* também foi submetido à coloração pela metanamina de prata (GROCOTT, 1955).

3.3.4. EXAME HISTOPATOLÓGICO

Fragmentos de pulmões, estômago e intestinos, foram fixados em formol a 10%, embebidos em parafina, seccionados com 3 µm de espessura e corados pela Hematoxilina e Eosina (HE) para observação de fases evolutivas dos parasitos nos tecidos, seguindo-se as técnicas preconizadas por BEHMER *et al.* (1976).

3.4. MENSURAÇÃO E FOTOMICROGRAFIA

Para a mensuração dos oocistos e cistos foi utilizado um microscópio Leitz Mod. H.M. Luz², com ocular micrométrica K-15 PZO³.

As fotografias de oocistos e cistos foram realizadas com um microscópio INALH⁴, utilizando FOTOVIX⁵ vídeo EDITOR II⁶, com Color Vídeo Printer Mavigraph (Sony)⁷ e uma TV colorida (Sony)⁸.

Os cortes histológicos foram fotografados com o auxílio de um microscópio triocular Dialux 20EB⁹, acoplado com uma câmara fotográfica MPS51¹⁰, utilizando-se filme Kodacolor URG Kodak, 35 mm, 100 ISO. O tempo de exposição foi medido com fotômetro automático Wild MPS 55¹¹ e também o microscópio triocular, modelo JENAPOL com câmara fotográfica modelo mf-AKS 24x36 Automatic-2¹².

² Leitz Wetzlar, República Federal da Alemanha.

³ República da Polônia.

^{4, 5, 6} México.

^{7, 8} Sony, Japão.

^{9, 10, 11} Leitz Wetzlar, República Federal da Alemanha.

¹² Carl Zeiss/Jena, antiga República Democrática Alemã.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados morfométricos foram analisados estatisticamente com auxílio de um computador, utilizando-se os programas Minitab (SCHAEFER & ANDERSON, 1989) e o cálculo da Regressão Linear (FONSECA *et al.*, 1985) com o programa da Microsoft Excel 5,0 (LAPPONI, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Cryptosporidium muris*

4.1.1. AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS CAPTURADOS

De todos os animais capturados nos dois habitats, positivos para oocistos de *Cryptosporidium* após o exame de suas fezes, em nenhum se observou sinais clínicos como diarreia ou mesmo fezes fora da consistência normal dos roedores. Entretanto, é sabido que a diarreia é um dos sintomas na criptosporidiose em humanos e nos animais domésticos (CURRENT *et al.*, 1983; FAYER & UNGAR, 1986 e STEHR-GREEN *et al.*, 1987). Esta sintomatologia clínica também já foi observada por ISEKI (1986) em ratazanas com infecção natural. Por outro lado, YAMAURA *et al.* (1990), em nenhum dos animais, tanto no rato preto quanto nas ratazanas, capturados e infectados naturalmente, não observaram sintomas clínicos

caracterizados por diarreia. Em gatos positivos para *Cryptosporidium*, também não foram observados sintomas clínicos da doença (ARAI *et al.*, 1990).

Não se conhece quais são as diferentes graduações existentes ou não para os sintomas clínicos em diferentes espécies de hospedeiros, parasitados pelo protozoário, a não ser quando o homem e os animais são acometidos por alterações orgânicas ou agentes infecciosos, favorecendo a este agente oportunista de se desenvolver com maior facilidade, acarretando a forma clínica propriamente dita (SNYDER *et al.*, 1978; CLERIHEW, 1980; LOPES & BOMFIM, 1993; BOMFIM & LOPES, 1995a; BOMFIM & LOPES, 1995b e SOUZA & LOPES, 1995), ou ainda ressaltando as características zoonóticas das espécies deste gênero, que podem acometer não só humanos portadores de imunodeficiência, como aqueles ligados a atividades com animais (ANDERSON *et al.*, 1982; RESSE *et al.*, 1982 e TZIPORI, 1983).

4.1.2. CARACTERÍSTICAS DOS OOCISTOS, ANALISADAS EM CAMPO BRILHANTE UTILIZANDO-SE A TÉCNICA DE CENTRÍFUGO-FLUTUAÇÃO MODIFICADA EM SOLUÇÃO SATURADA DE AÇÚCAR

Utilizando-se esta metodologia, os oocistos caracterizaram-se como estruturas esferóides ou sub-esféricas, brilhantes, evidenciando uma ou mais manchas

escuras no interior do oocisto, correspondendo aos núcleos dos esporozoítas e ao resíduo do oocisto (Figura 1-A). As descrições morfológicas desses oocistos se assemelham àquelas observadas por RESSE *et al.* (1982), WILLSON & ACRES (1982), BOMFIM (1989) e BOMFIM & LOPES (1995b).

Várias outras estruturas podem ser observadas quando se utiliza a solução saturada de açúcar, podendo dificultar o diagnóstico. As leveduras, que com muita frequência são abundantes nas fezes, devem ser diferenciadas dos oocistos, por serem morfológicamente muito semelhantes, estas são vistas geralmente como estruturas arredondadas ou levemente ovaladas, contendo uma massa densa no seu interior e em algumas formas observam-se brotamentos (Figura 1-B)

4.1.3. CARACTERÍSTICAS DOS OOCISTOS CORADOS PELO ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO

O protozoário nesta coloração apresentou-se bem visível, como estruturas esféricas ou sub-esferoidais, de coloração avermelhada a levemente rósea, contrastando com um fundo de campo de coloração verde (Figura 1-C); algumas vezes, pode-se observar estruturas alongadas no interior dos oocistos, correspondendo aos esporozoítas, em número de quatro (Figura 1-D). Estas características de coloração estão compatíveis com as observadas por HENRICKSEN & POHLENZ (1981) e BOMFIM (1989). Nesta coloração, bactérias

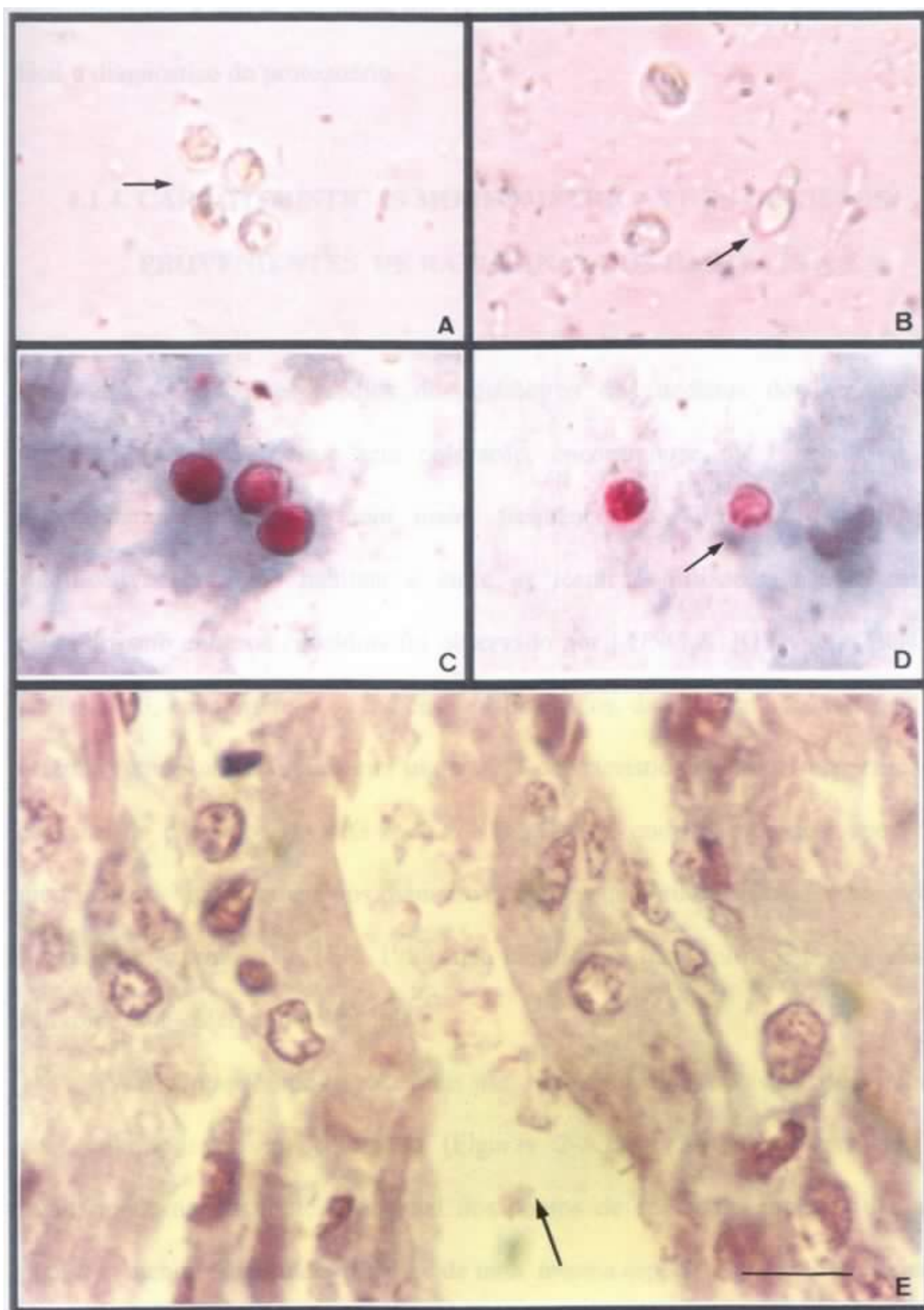


FIGURA 1. *Cryptosporidium muris*: A) oocistos e B) levedura, centrífugo-flutuação modificada, em solução saturada de açúcar em campo brilhante (→); C) oocistos e D) oocistos com esporozoítas visíveis, Ziehl-Neelsen/Modificado (→); E) presença de oocistos (→) nas glândulas gástricas de uma ratazana. H.E. (— = 10 μm).

leveduriformes e outras estruturas não se coram pela fucsina básica, portanto, sendo fácil o diagnóstico do protozoário.

4.1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DOS OOCISTOS PROVENIENTES DE RATAZANAS DOS HABITATS A E B

Os valores médios dos diâmetros dos oocistos dos animais dos habitats, observados com e sem coloração, encontram-se na Tabela 2, onde ao se comparar, observou-se com maior frequência a ocorrência de diferenças significativas entre os habitats e entre as técnicas utilizadas. Certo grau de pleomorfismo entre os coccídios foi observado por LONG & JOYNER, (1984). Já na Tabela 3, encontram-se os índices morfométricos, dando uma característica sub-esférica, sendo considerado uma importante característica adicional específica das espécies de coccídios (LONG & JOYNER, 1984), onde os oocistos, apesar das modificações significativas nos diâmetros polar e equatorial acarretados por fatores internos ou externos (FAYER, 1980) não modificam a sua forma espacial, seja ela esferóide, sub-esférica ou elipsóide.

Comparando-se as retas de regressão dos oocistos dos habitats, com coloração e sem coloração (Figuras 2-A,B e 3-A,B), observa-se uma regularidade na distribuição espacial dos pontos de confronto entre os diâmetros maior e menor, sugerindo tratar-se de uma mesma espécie, apesar das diferenças

TABELA 2. Características morfométricas e comparativas dos oocistos (μm) de *Cryptosporidium muris* provenientes de *Rattus norvegicus* nos habitats A e B, utilizando coloração pelo Ziehl-Neelsen Modificado e campo brilhante^a.

Técnicas	Medidas ^b			
	Habitat A		Habitat B	
	Diâmetro maior	Diâmetro menor	Diâmetro maior	Diâmetro menor
Zehl Neelsen Modificado	7,01 $\pm$ 0,45 ye	6,44 $\pm$ 0,50 ya	6,98 $\pm$ 0,33 ye	6,63 $\pm$ 0,40 yb
Campo brilhante	7,34 $\pm$ 0,36 zf	7,13 $\pm$ 0,38 zc	7,27 $\pm$ 0,34 zg	6,95 $\pm$ 0,33 zd

^a Medidas de 100 oocistos para cada técnica e em cada habitat, e os valores expressos em $\bar{X} \pm S(\bar{X})$.

^b Letras diferentes diferem significativamente ($P \leq 0,001$).

TABELA 3. Avaliação do índice morfométrico de oocistos de *Cryptosporidium muris* provenientes de *Rattus norvegicus*, dos habitats A e B.

Técnicas	Índice morfométrico	
	Habitat A	Habitat B
Ziehl Neelsen Modificado	1,09 ± 0,04	1,05 ± 0,03
Campo brilhante	1,03 ± 0,04	1,05 ± 0,02

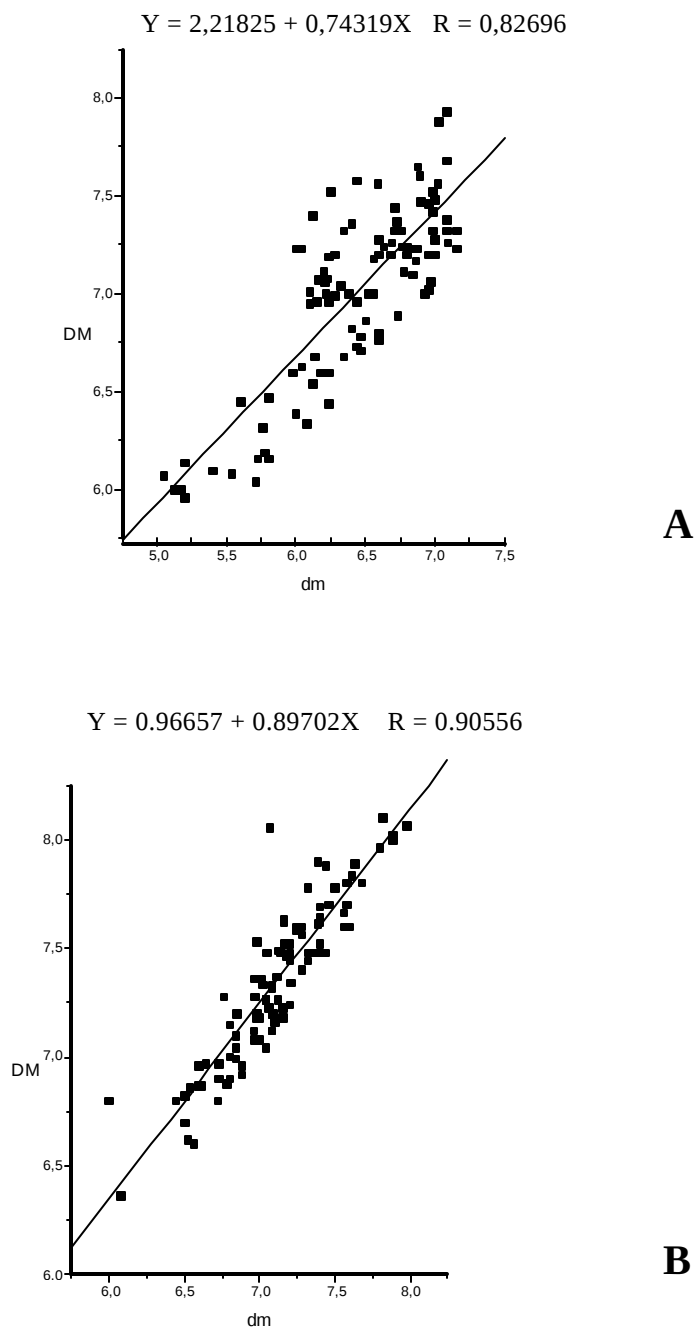


FIGURA 2. Regressão linear dos diâmetros maior e menor dos oocistos de *Cryptosporidium muris* provenientes do habitat A: **A** - corados pelo Ziehl-Neelsen Modificado e **B** - campo brilhante/solução saturada de açúcar.

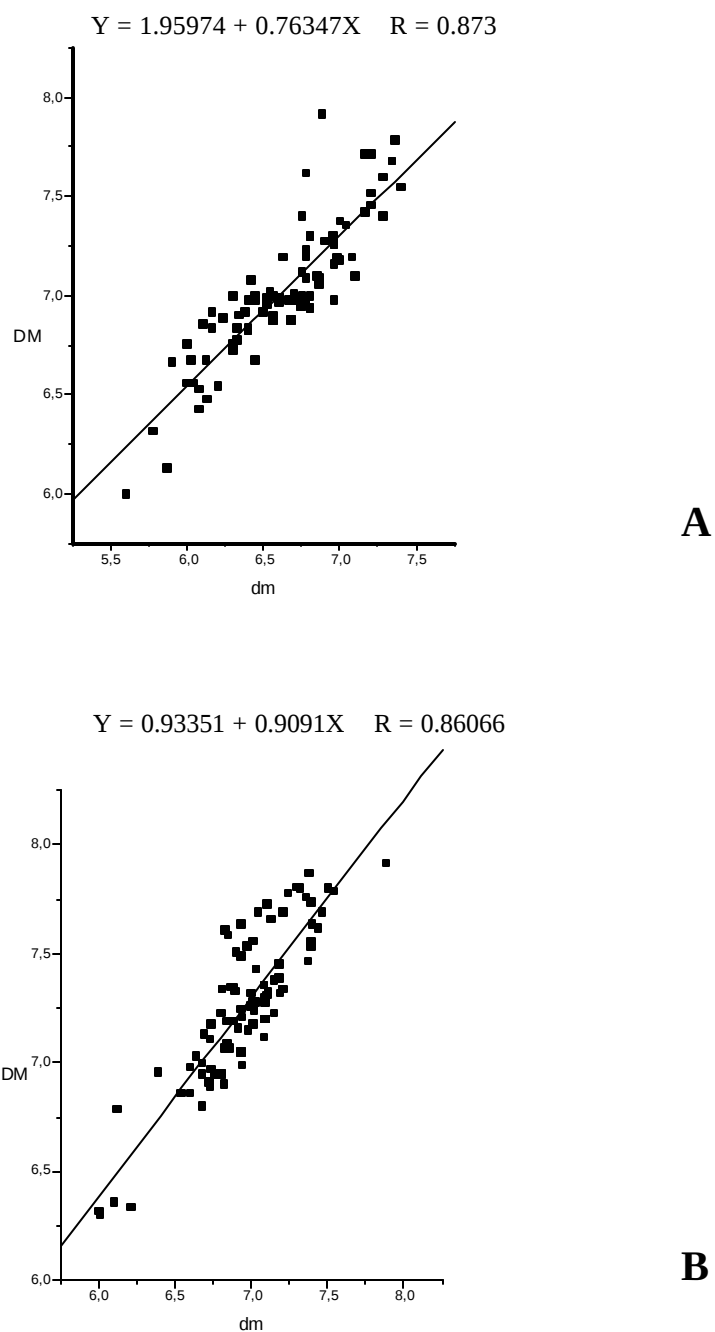


FIGURA 3. Regressão linear dos diâmetros maior e menor dos oocistos de *Cryptosporidium muris* provenientes do habitat B: **A** - corados pelo Ziehl-Neelsen Modificado e **B** - campo brilhante/solução saturada de açúcar.

significantes existentes no tamanho dos oocistos.

Existem duas espécies comuns parasitando mamíferos. Com base na morfologia dos oocistos de isolados de bovinos, UPTON & CURRENT (1985), denominaram *C. muris* os de tamanho grande, com média de 7,0-8,4 μm de diâmetro e outra espécie como *C. parvum*, considerada de tamanho pequeno, com média de 4,0-5,3 μm de diâmetro. ISEKI (1986) confirmou também que dos oocistos isolados de ratazanas e do rato preto, os de forma considerada grande tinham uma média de 8,4-6,3 μm de diâmetro e uma outra forma considerada pequena, com médias de 5,3-4,8 μm de diâmetro; foram *C. muris* e *C. parvum*, respectivamente. YAMAURA *et al.* (1990), ao encontrarem no rato preto oocistos com médias de 3,7-4,8 μm , consideraram-nos do tipo pequeno. Já neste trabalho, encontrou-se médias estabelecidas por áreas (Tabela 2), que foram consideradas como se aproximando daquelas dos oocistos de tamanho grande, podendo ser considerados como a espécie *C. muris*.

4.1.5. PREVALÊNCIA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium muris* EM RATAZANAS DOS HABITATS A E B

De um total de 173 animais capturados nos habitats, 29 (16,77%) foram positivos para *C. muris*, sendo que com relação à separação por sexo, o maior percentual nos machos foi observado em animais com pesos superiores a 201 g, considerados como adultos; já com relação às fêmeas, o maior percentual foi

observado nos animais com pesos entre 101 e 200 g, considerados como adolescentes (Figuras 4 e 5).

De um total de 61 animais estudados no habitat A, 5 (8,20%) achavam-se parasitados; já no habitat B, de um total de 112 animais, 24 (21,43%) apresentaram positividade para oocistos de *Cryptosporidium*.

Estudos experimentais têm mostrado que animais jovens são mais susceptíveis à infecção com *Cryptosporidium* do que animais mais velhos (SHEWOOD *et al.*, 1982 e TZIPORI *et al.*, 1983). YAMAURA *et al.* (1990), demonstraram que numa infecção em 31 ratos pretos, a prevalência foi consideravelmente alta no grupo de animais que possuía maior peso corporal. MIYAJI *et al.* (1989), demonstraram que a incidência de *Cryptosporidium* infectando rato preto, decrescia de acordo com o aumento de peso dos animais.

No presente trabalho, observou-se que a maior prevalência ocorreu em animais com peso superior a 201 g, considerados como adultos.

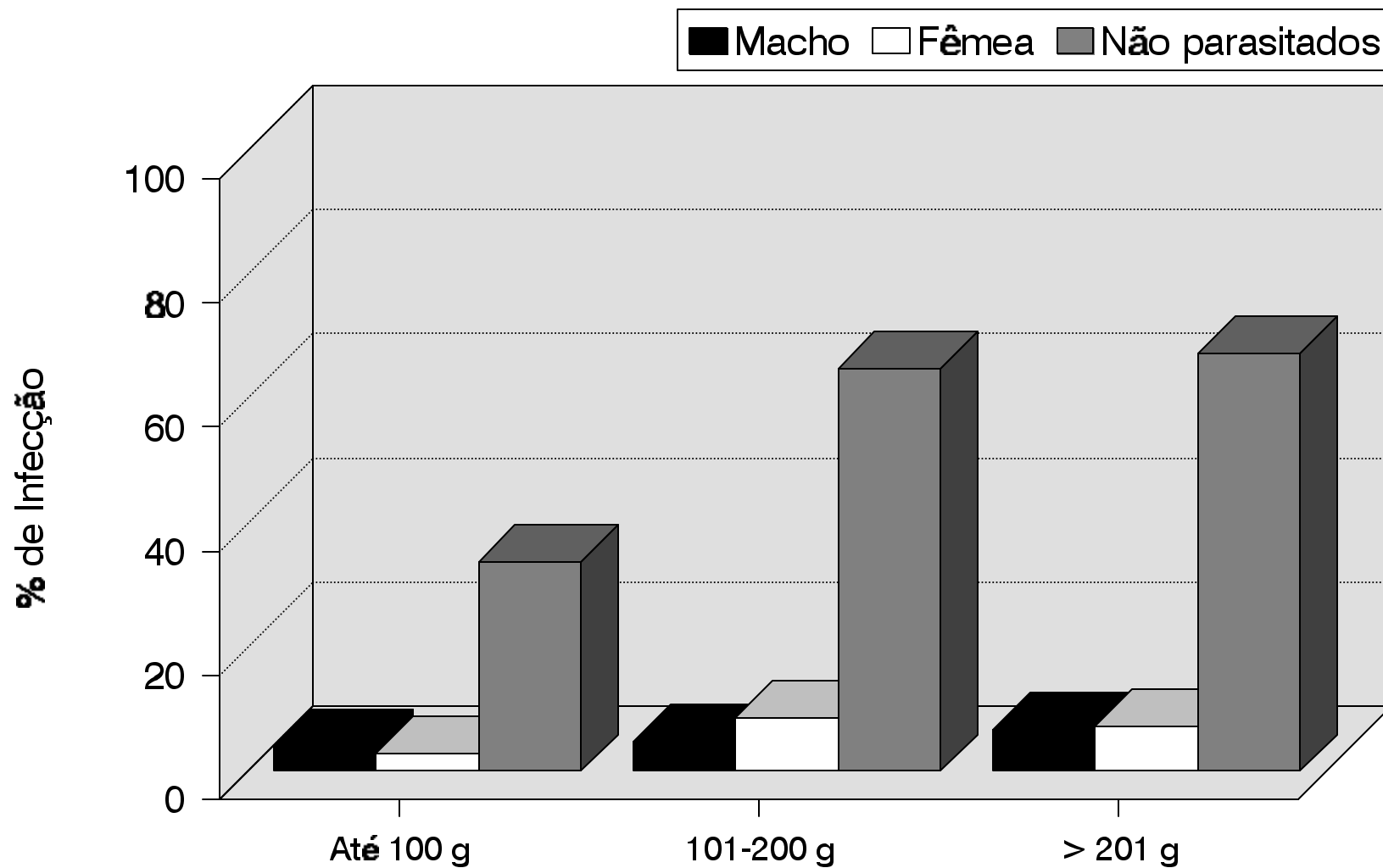


FIGURA 4. Prevalência de protozoários do gênero *Cryptosporidium*, observados em fezes de *Rattus norvegicus*, capturados nos habitats A e B, de acordo com idade e sexo.

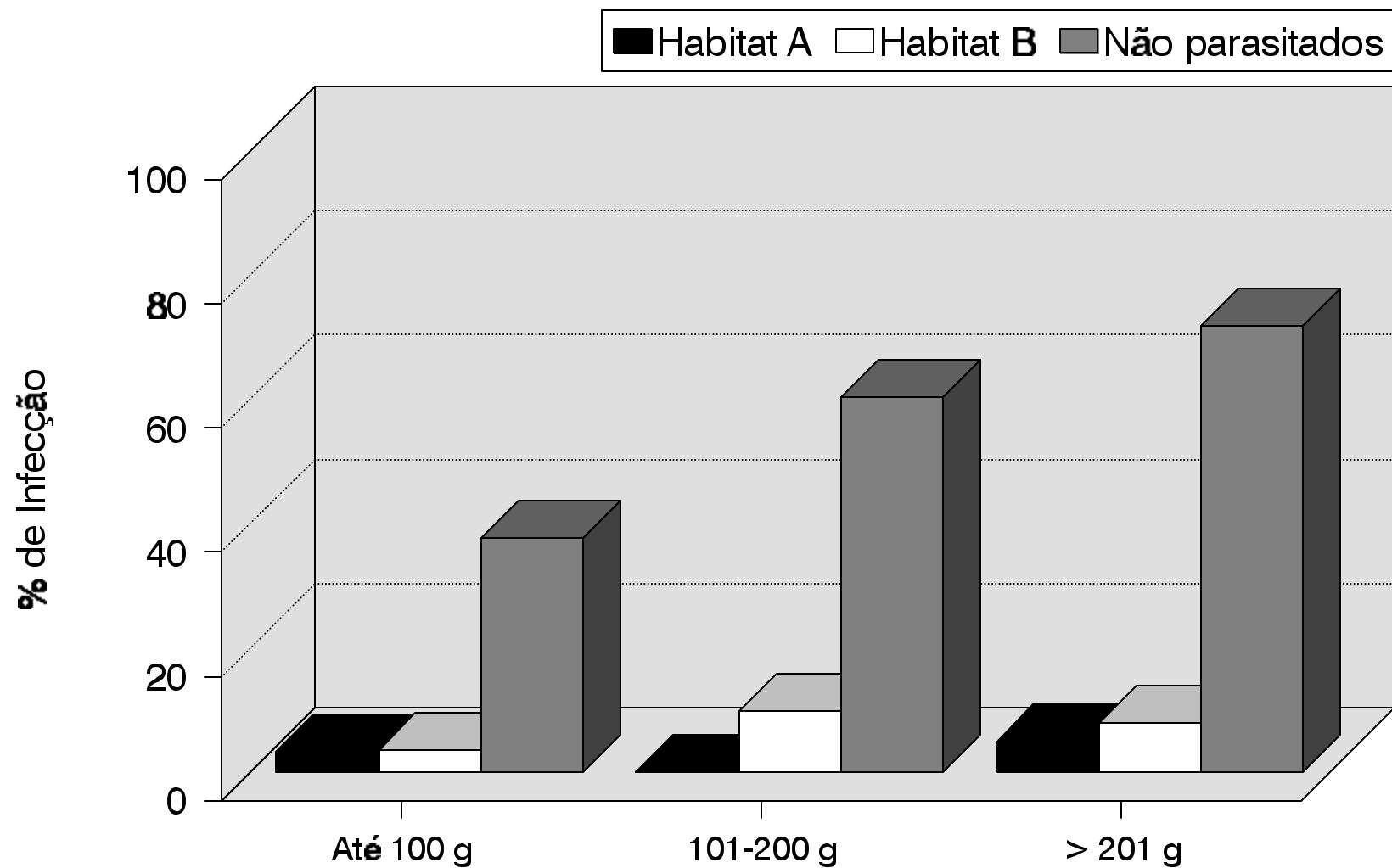


FIGURA 5. Prevalência de protozoários do gênero *Cryptosporidium*, observados em fezes de *Rattus norvegicus*, capturados nos habitats A e B.

4.1.6. O PAPEL DE RATAZANAS COMO FONTE DE OOCISTOS

DE *Cryptosporidium*

Transmissão experimental entre ovinos, e de bezerros e suínos para camundongos de laboratório, foi possível durante o período de amamentação dos camundongos (TZIPORI *et al.*, 1981 e 1983; SHEWOOD *et al.*, 1982 e BOMFIM & LOPES, 1995) e também tem sido realizada entre ratos adultos (BRASSEUR *et al.*, 1988) e hamsters (ROSSI *et al.*, 1990), utilizando animais imunossuprimidos.

YAMAURA *et al.* (1990) observaram que ratos pretos jovens e adultos foram altamente susceptíveis à infecção com oocistos isolados naturalmente de rato preto, e que não foi necessária a imunossupressão para o estabelecimento desta infecção.

Humanos adultos imunocompetentes são também susceptíveis à infecção com *Cryptosporidium* (FAYER & UNGAR, 1986). Em adição, cobaias adultos (CHRISP *et al.*, 1990) e camundongos silvestres (KLESIUS *et al.*, 1986) têm sido facilmente infectados com oocistos provenientes de cobaias e camundongos silvestres, respectivamente, sem com isto causar sinais clínicos da doença.

É aceitável que ratazanas possam ser responsáveis pela disseminação de oocistos de *Cryptosporidium* em áreas urbanas e rurais, sendo, portanto uma importante fonte de infecção. Observações feitas por FAYER & UNGAR (1986)

indicam que *Cryptosporidium* obtidos de ratos, não tiveram especificidade por hospedeiro, podendo facilmente contaminar bezerros e humanos.

A possibilidade de infecção cruzada nesta parasitose, entre roedores e outros mamíferos, é possível de ocorrer devido a não especificidade para espécies de hospedeiros mamíferos. Portanto, neste trabalho, pode-se considerar as ratazanas, independentemente de sexo e idade, como uma possível fonte de infecção, tanto para animais domésticos quanto para humanos, seja em condições urbanas ou rurais, tomando como base os habitats A e B.

4.1.7. HISTOPATOLOGIA

Cortes histológicos de intestinos e estômagos revelaram a presença de formas endógenas somente no estômago, a nível das glândulas gástricas (Figura 1-E).

TYZZER em 1907, observou em cortes histológicos de mucosa gástrica de camundongos de laboratório, formas endógenas de um protozoário nomeando-o *C. muris* em 1910; esse autor descreveu o mesmo organismo com mais detalhes, propondo para este uma nova espécie, considerada como *C. parvum*. Esta espécie, foi diferenciada de *C. muris* pela sua localização no intestino e por ser uma espécie que tinha oocistos com um diâmetro menor. Partindo-se deste princípio, que cada espécie tem o seu local de parasitismo específico, pode-se considerar o

protozoário observado nas glândulas gástricas de ratazanas, juntamente com os dados morfométricos dos oocistos, como sendo *C. muris*.

4.2. ESPÉCIES DO GÊNERO *Eimeria* OBSERVADAS EM RATAZANAS

Das três espécies consideradas válidas para ratazanas, encontrou-se duas, ou seja, *E. nieschulzi* e *E. separata* nos habitats estudados.

4.2.1. CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DOS OOCISTOS

4.2.1.1. *Eimeria nieschulzi*

Os oocistos desta espécie foram de elipsóides a ovóides, às vezes possuindo uma das extremidades mais afilada, com ausência de micrópila. A sua parede era lisa e de coloração amarelo brilhante, composta por uma camada externa transparente e uma interna finíssima. No interior do oocisto, observou-se a presença de grânulo polar e ausência de resíduo (Figura 6-A).

Apesar da discussão sobre a parede dos oocistos desta espécie, o presente trabalho está de acordo com o observado no trabalho original de BECKER *et al.* (1932) e com o de BECKER (1934) em que o oocisto teria duas

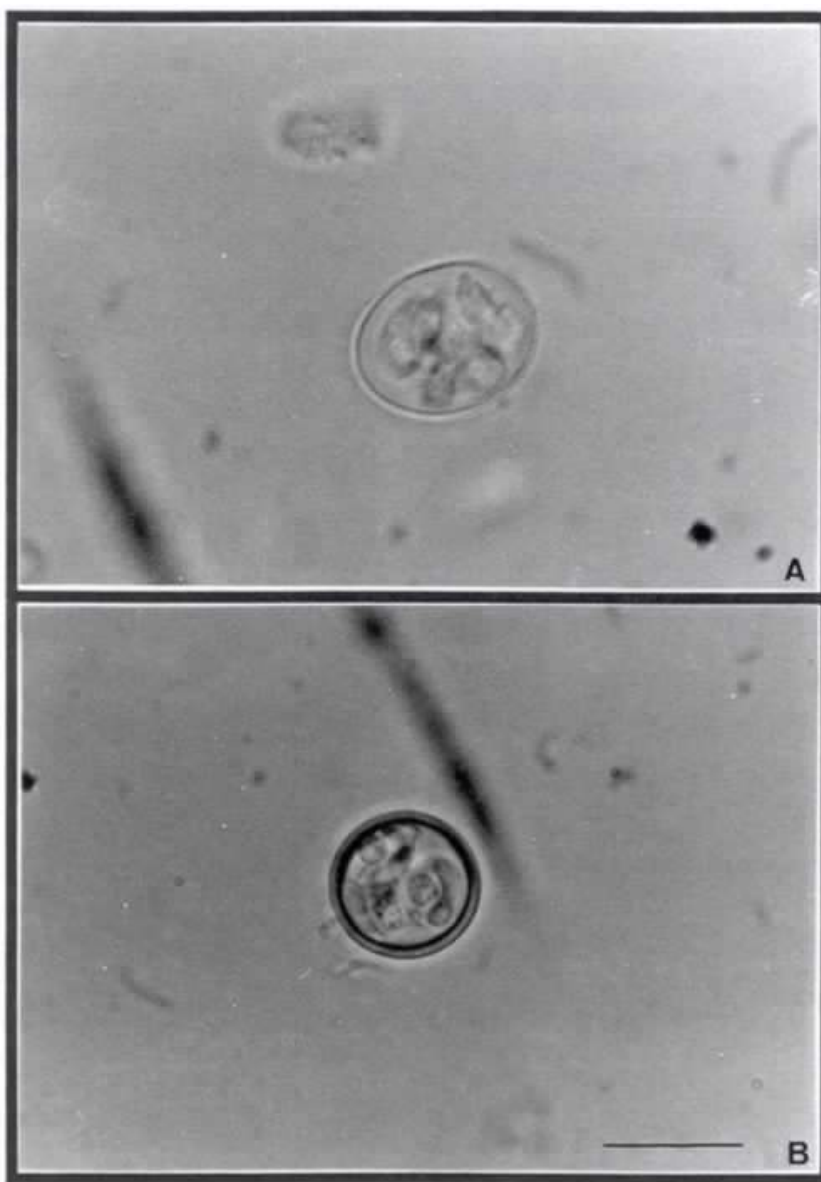


FIGURA 6. Oocistos esporulados de *Eimeria nieschulzi* (A) e *E. separata* (B). Solução saturada de açúcar. (— = 10 μ m).

camadas, mas não com o de PÉRARD (1926) e MATUBAYAS (1938) que descreveram estes oocistos com uma parede composta de uma só camada.

Os esporozoítas eram ovóides a alongados com um discreto corpo de stieda e resíduo denso, contendo de um a dois glóbulos claros e largos na extremidade dos mesmos. Esta descrição está de acordo com as observações de BECKER *et al.* (1932).

As medidas dos diâmetros maior e menor dos oocistos observados neste trabalho, de acordo com cada habitat, encontram-se na Tabela 4, onde os mesmos estão dentro das médias observadas por BECKER *et al.* (1932) que descreveram oocistos com medidas de 20,7 x 16,5 μm , tendo um índice morfométrico variando de 1,1 a 1,4. Já os esporocistos, apresentaram uma média de 11,8 x 7,0 μm , com um índice morfométrico variando de 1,6 a 1,8.

Neste trabalho, encontram-se na Tabela 5, os índices morfométricos para oocistos e esporocistos, de acordo com cada habitat estudado. As variações foram semelhantes às observadas por BECKER *et al.* (1932), independentemente dos habitats estudados.

TABELA 4. Características morfométricas dos oocistos e esporocistos de *Eimeria nieschulzi*, provenientes de *Rattus norvegicus* dos habitats A e B.

Habitat	Tamanho (μm) ^a				Espessura da parede	
	Oocisto ^b		Esporocisto ^b		Externa	Interna ^c
	Diâmetro maior	Diâmetro menor	Diâmetro maior	Diâmetro menor		
A	20,33 $\pm$ 3,03 a	16,16 $\pm$ 1,75 c	11,32 $\pm$ 1,68 b	6,72 $\pm$ 0,58 d	0,56 $\pm$ 0,07	—
B	21,32 $\pm$ 2,37 e	16,87 $\pm$ 1,26 g	10,89 $\pm$ 0,88 f	6,96 $\pm$ 0,54 h	0,55 $\pm$ 0,06	—

^a Medidas de 50 oocistos para cada habitat, e os valores expressos em $\bar{X} \pm S(\bar{X})$.

^b Letras diferentes diferem significativamente ($P \leq 0,001$).

^c Muito delgada, sendo de difícil medida.

TABELA 5. Avaliação do índice morfométrico de oocistos de *Eimeria nieschulzi* e *E. separata* provenientes de *Rattus norvegicus* dos habitats A e B.

	Índice morfométrico			
	Habitat A		Habitat B	
	Oocistos	Esporocisto	Oocisto	Esporocisto
<i>E. niechulzi</i>	1,26 ± 0,11	1,68 ± 0,26	1,26 ± 0,10	1,57 ± 0,14
<i>E. separata</i>	1,16 ± 0,07	1,61 ± 0,17	1,15 ± 0,05	1,44 ± 0,13

4.2.1.2. *Eimeria separata*

Os oocistos desta espécie variaram de elipsoidais, subesféricos a ovóides, com ausência de micrópila, com parede lisa de coloração amarelada brilhante e composta por duas camadas. A camada externa era mais espessa e transparente e a camada interna fina de coloração escura. O oocisto tinha grânulo polar e ausência de resíduo (Figura 6-B). BECKER *et al.* (1932), mencionaram que a parede dos oocistos dessa espécie, aparentemente é composta por duas camadas.

Os esporocistos eram elipsoidais, com a presença de corpo de stieda e resíduo presente; cada esporocisto continha um a dois glóbulos claros em sua extremidade. Estas descrições estão de acordo com as de BECKER *et al.* (1932).

As médias dos diâmetros maior e menor, tanto dos oocistos quanto dos esporozoítas, para cada habitat estudado, estão relatadas na Tabela 6 e os índices morfométricos na Tabela 5. BECKER *et al.* (1932) encontraram médias para os oocistos, de 13,4 x 11,6 μm , possuindo um índice morfométrico entre 1,0 e 1,4. Com relação aos esporozoítas, estes apresentaram com uma média de 9,0 x 5,1 μm , tendo um índice morfométrico de 1,6 a 1,9. Apesar das semelhanças existentes entre o índice morfométrico dos oocistos observados neste trabalho, com os de BECKER *et al.* (1932), o mesmo não se pode afirmar para os esporocistos, tendo em vista a dificuldade em medi-los, dando medidas aproximadas, o que não descartou ser a espécie de *Eimeria* observada neste trabalho, caracterizada como *E. separata*.

TABELA 6. Características morfométricas dos oocistos e esporocistos de *Eimeria separata* provenientes de *Rattus norvegicus* dos habitats A e B.

Habitat	Tamanho (μm) ^a				Espessura da parede	
	Oocisto ^b		Esporocisto ^b		Externa	Interna ^c
	Diâmetro maior	Diâmetro menor	Diâmetro maior	Diâmetro menor		
A	14,48 $\pm$ 1,06 a	12,45 $\pm$ 0,93 c	8,96 $\pm$ 1,11 b	5,55 $\pm$ 0,54 d	0,53 $\pm$ 0,07	—
B	15,60 $\pm$ 1,02 e	13,60 $\pm$ 0,95 g	8,76 $\pm$ 1,04 f	6,07 $\pm$ 0,55 h	0,56 $\pm$ 0,05	—

^a Medidas de 50 oocistos para cada habitat, e os valores expressos em $\bar{X} \pm S(\bar{X})$.

^b Letras diferentes diferem significativamente ($P \leq 0,001$).

^c Muito delgada, sendo de difícil medida.

4.2.2. ASPECTOS COMPARATIVOS DOS OOCISTOS DE *Eimeria*

nieschulzi E *E. separata* NOS HABITATS A E B

Atualmente, várias espécies de coccídios têm sido conhecidas pela descrição morfológica de seus oocistos e de seus hospedeiros. Desta maneira, LEVINE (1973b) e JOYNER (1982) consideraram os oocistos como a fase mais fácil de se obter de um hospedeiro e que sua morfologia anatômica é um bom instrumento taxonômica para a descrição de uma espécie de coccídia do gênero *Eimeria*. Apesar de se continuar a observar diferenças nas dimensões dos oocistos, estes ainda continuam sendo usados para diagnosticar e descrever novas espécies (LONG & JOYNER, 1984; REDUKER *et al.*, 1985b e UPTON *et al.*, 1992).

Comparando-se as médias dos oocistos e esporocistos eliminados por ratazanas dos dois habitats, seja para *E. nieschulzi* (Tabela 4) ou para *E. separata* (Tabela 6), observou-se diferenças significantes quanto ao tamanho dos oocistos e esporocistos. Tais diferenças, não comprometem em considera-las como espécies válidas para ratazanas (BECKER *et al.*, 1932), pois as variações nas dimensões dos oocistos, apesar de significantes neste trabalho, podem estar relacionadas ao período após infecção (DUSZYNSKI, 1971), ao hospedeiro e sua localização (BARKER *et al.*, 1988), ou mesmo ao fato de uma espécie parasitar mais de um hospedeiro (PEREIRA, 1987 e GARDNER & DUSZYNSKI, 1990). Estas diferenças, podem ser vistas em trabalhos experimentais, onde os oocistos de uma mesma espécie podem ter

diferenças em suas dimensões, seja em infecções naturais ou experimentais (LOSS, 1991 e LOSS & LOPES, 1992).

De acordo com MARQUARDT (1973), o índice morfométrico das espécies tem sido constante, onde a forma do oocisto é sempre estável, apesar de haver diferenças diante de algumas circunstâncias (DAVIS *et al.*, 1957 e JOYNER, 1982). Desta maneira, o índice morfométrico dos oocistos das espécies estudadas em ambos os habitats, foram semelhantes ao observado por BECKER *et al.* (1932). Ainda tomando por base este método, quando se marca o diâmetro maior sobre o diâmetro menor para cada oocisto obtém-se a projeção linear da distribuição dos oocistos (JOYNER, 1982), servindo como um meio de identificar diferenças em uma mesma espécie (LOSS & LOPES, 1992) ou em espécies de um mesmo gênero (FIGUEIREDO, 1989). Assim, pode-se visualizar nas Figuras 7 a 10, tanto para *E. nieschulzi* quanto para *E. separata*, a distribuição de seus oocistos por habitat. Estas regressões sugerem que existem variações intraespecíficas entre as mesmas espécies, porém, de habitat diferente, onde as mesmas afirmações não poderiam ser feitas neste trabalho, tomando-se por base os esporozoítas.

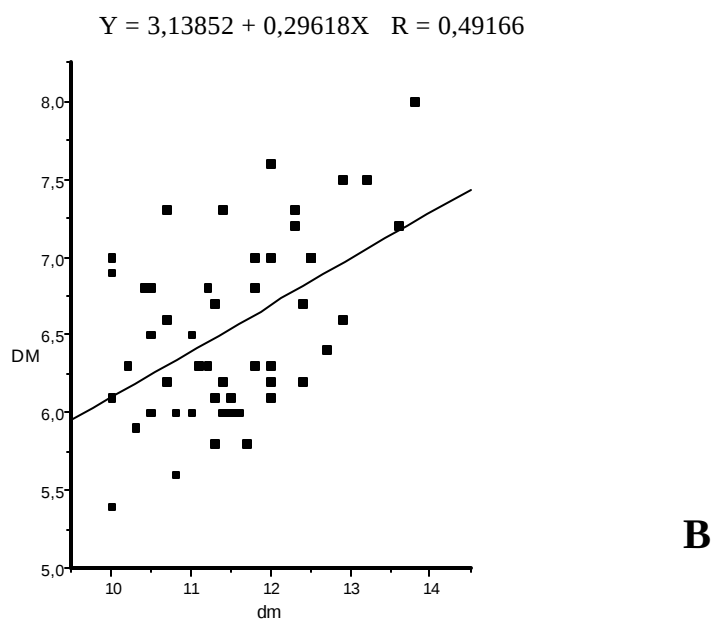
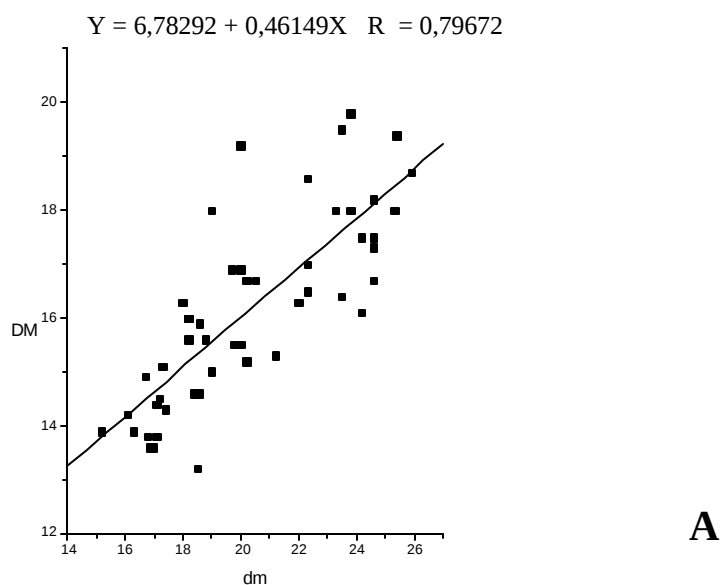


FIGURA 7. Regressão linear dos diâmetros maior e menor de *Eimeria nieschulzi* provenientes do habitat A, observados em centrífugo flutuação modificada, em solução saturada de açúcar: **A** - oocistos e **B** - esporocistos.

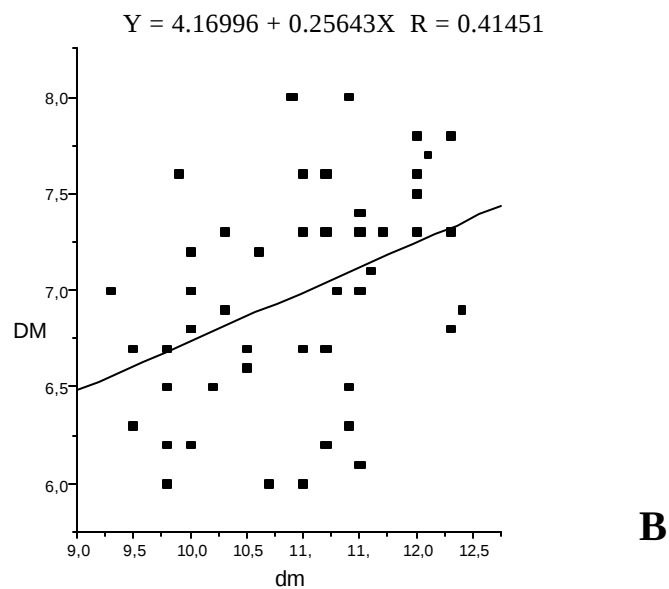
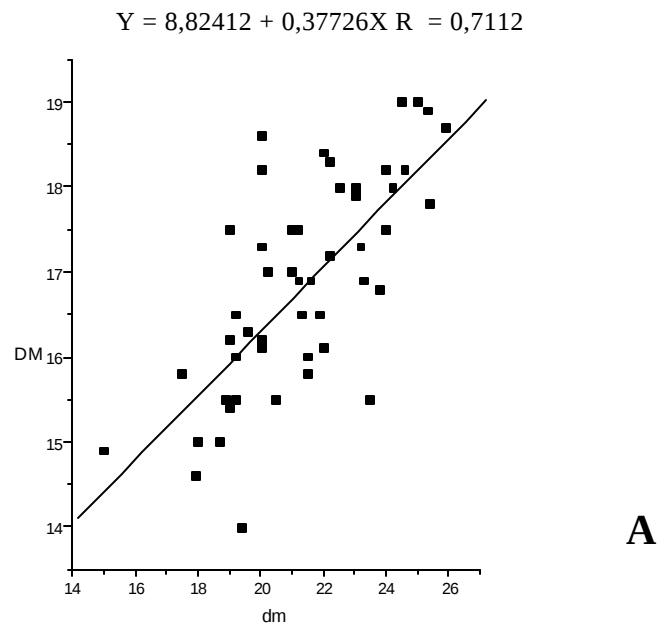


FIGURA 8. Regressão linear dos diâmetros maior e menor de *Eimeria nieschulzi* provenientes do habitat B, observados em centrífugo flutuação modificada, em solução saturada de açúcar: **A** - oocistos e **B** - esporocistos.

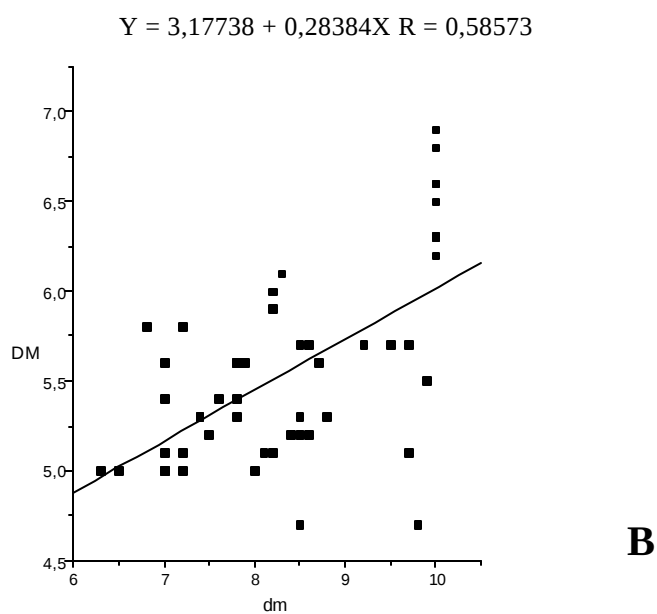
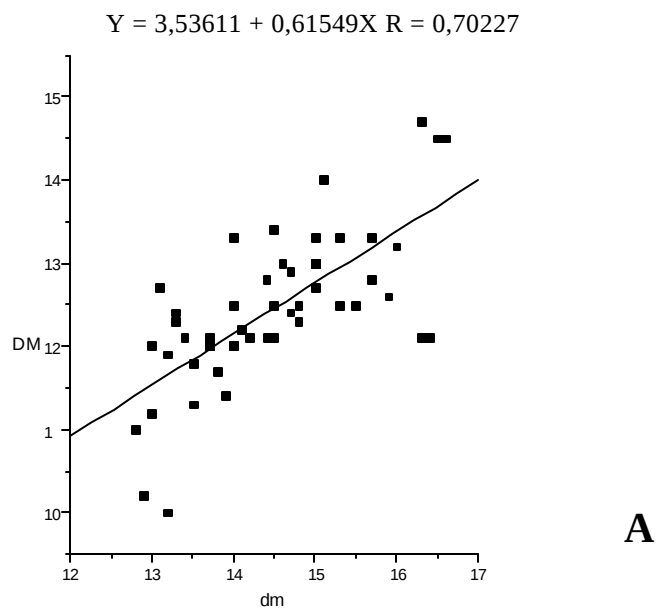


FIGURA 9. Regressão linear dos diâmetros maior e menor de *Eimeria separata* provenientes do habitat A, observados em centrífugo flutuação modificada, em solução saturada de açúcar: **A** - oocistos e **B** - esporocistos.

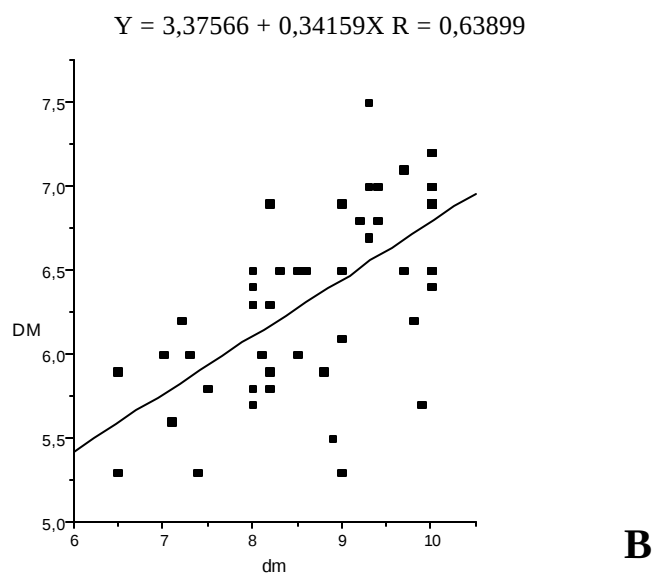
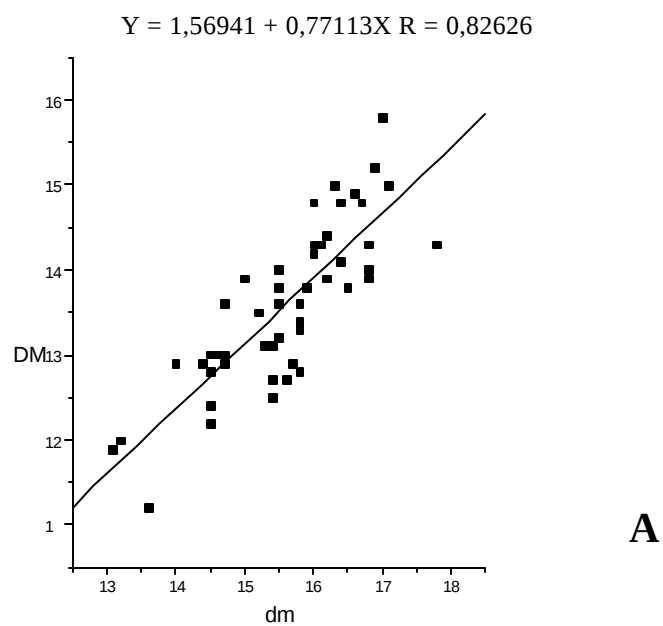


FIGURA 10. Regressão linear dos diâmetros maior e menor de *Eimeria separata* provenientes do habitat B, observados em centrífugo flutuação modificada, em solução saturada de açúcar: **A** - oocistos e **B** - esporocistos.

4.2.3. PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Eimeria* NOS HABITATS A E B

De um total de 173 ratazanas capturadas, 115 (66,48%) apresentaram-se parasitadas por *Eimeria*, sendo que 47 (27,17%) com *E. nieschulzi* e *E. separata*; 32 (18,50%) com *E. nieschulzi* e 36 (20,81%) com *E. separata*. DIAS *et al.* (1981) examinando 166 ratazanas, diagnosticaram 81 (49,79%) apresentando parasitismo por *Eimeria* e, entre estas, 56 (33,73%) por *E. separata*, 11 (6,63%) com *E. nieschulzi* e 14 (8,43%) parasitadas por ambas as espécies.

A existência de um mecanismo imunitário nas infecções de vertebrados por protozoários do gênero *Eimeria* tem sido observada por ROSE & LONG (1970) e WAXLER (1941). DIAS *et al.* (1981) encontraram 80,64% de animais com menos de 100 g, parasitados por alguma espécie de *Eimeria*; apenas 29,80% das ratazanas com peso superior a 100 g eliminaram oocistos, ocorrendo um decréscimo na prevalência de infecção quando aumentou o peso (idade) dos ratos examinados. Nas Figuras 11 e 12, observa-se que a maior prevalência de animais parasitados, considerando o peso (idade), separados por habitats, atribui-se àqueles com 101 a 200 g de peso corporal, onde no habitat A, 13 (92,86%) dos animais estavam parasitados e no habitat B, 36 (67,92%). Dos dois habitats, o A apresentou 47 (77,05%) e o B 68 (60,71%) de animais parasitados.

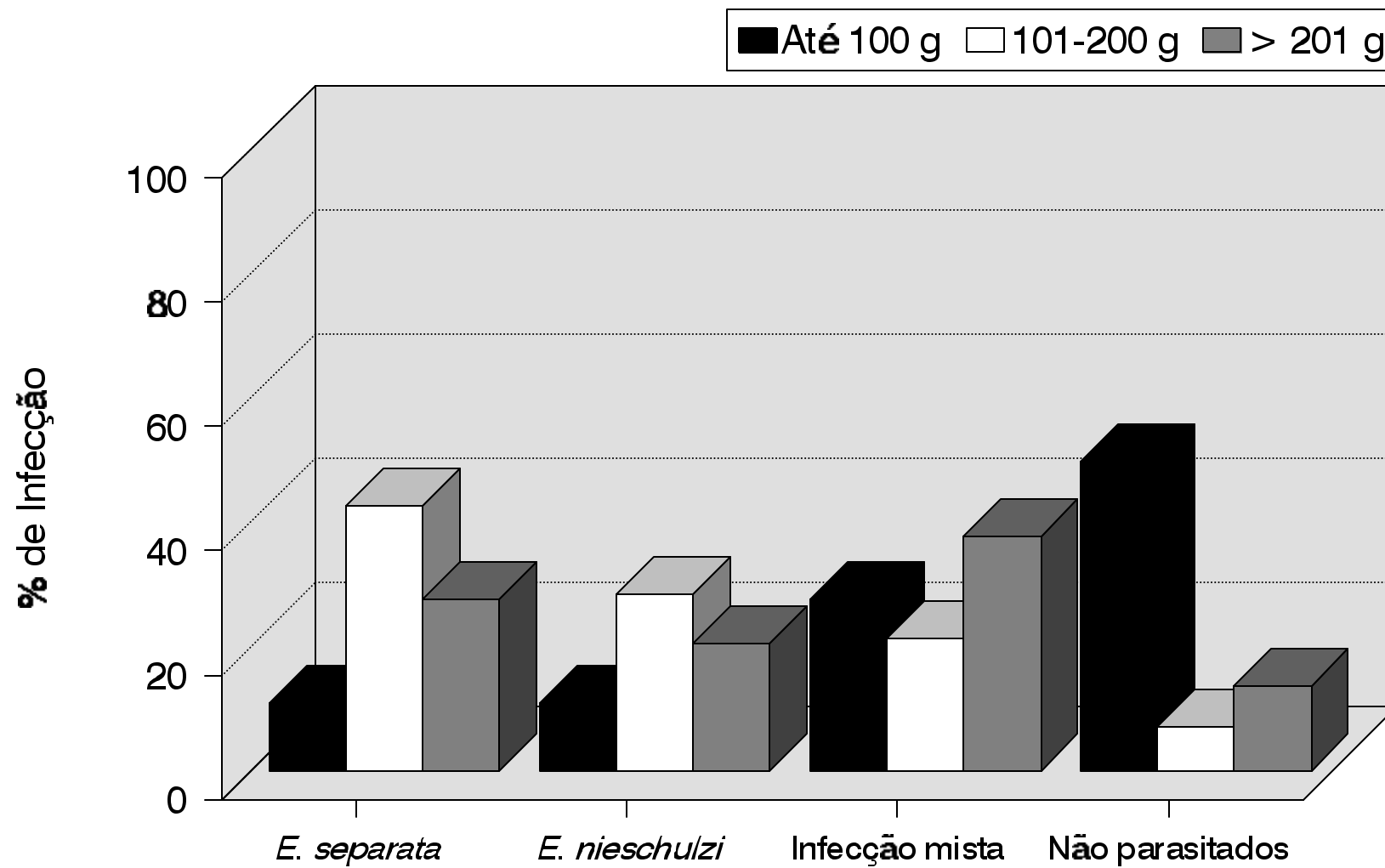


FIGURA 11. Prevalência das espécies do gênero *Eimeria*, em ratazanas capturadas no habitat A.

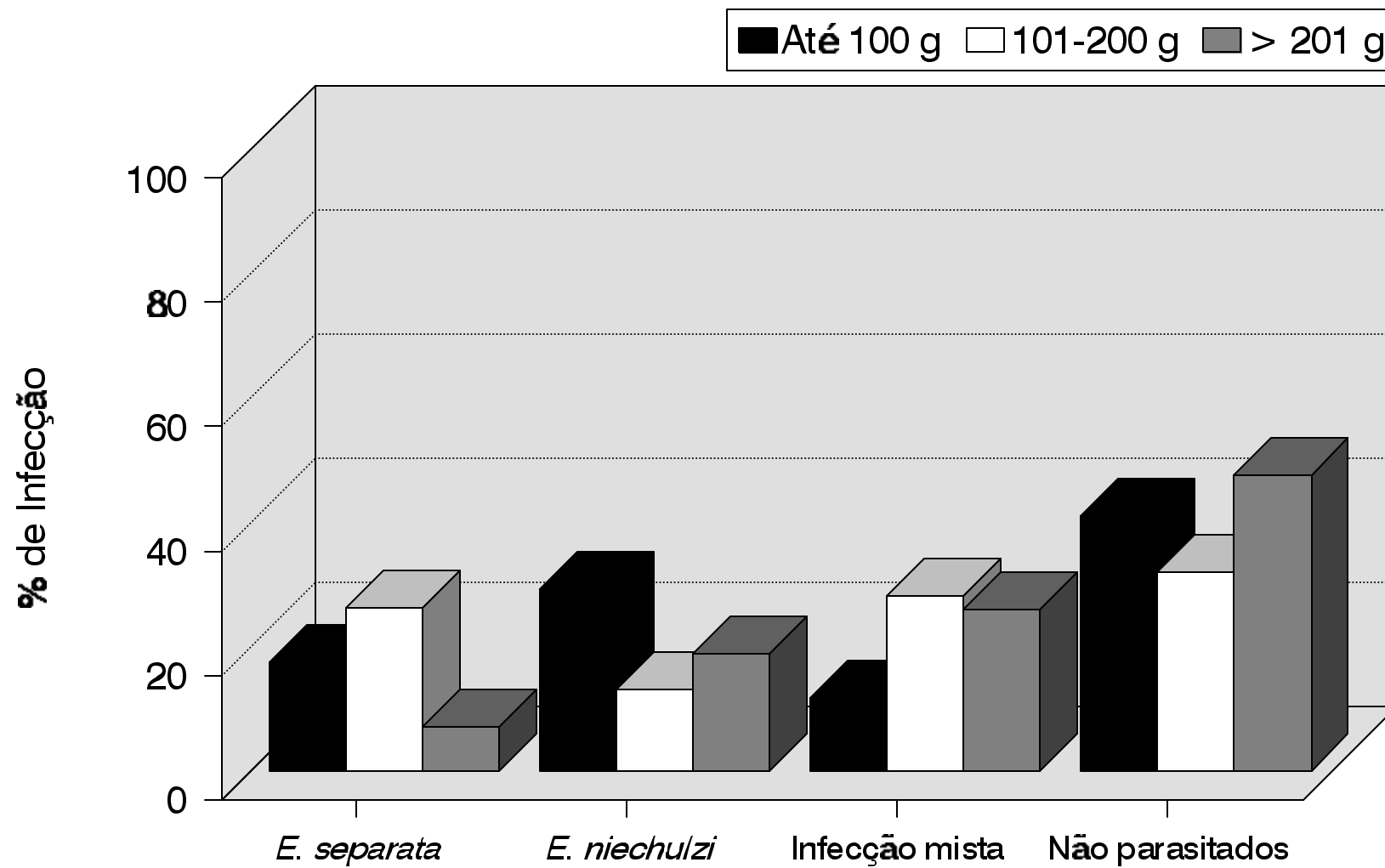


FIGURA 12. Prevalência das espécies do gênero *Eimeria*, em ratazanas capturadas no habitat B.

Quanto ao parasitismo misto, entre *E. nieschulzi* e *E. separata*, os resultados sugerem a inexistência de interações negativas ou mesmo competitivas entre as espécies, sendo que a prevalência do parasitismo misto foi de 47 (27,17%), superior ao do parasitismo isolado. Isto também foi observado por DIAS *et al.* (1981) em condições naturais de infecção e por DUSZYNSKI (1972) em condições experimentais em ratazanas.

4.3. *Pneumocystis carinii*

Somente os animais do habitat B foram positivos para *P. carinii*. O patógeno não é considerado como uma manifestação primária em vertebrados com mecanismo de defesa normal (HUGHES, 1987 e PIFER, 1984). Entretanto, pode ser fatal em hospedeiros primeiramente afetados por outras etiologias que resultem em debilidade dos mesmos. Condições tais como diarreia resultam em um decréscimo na absorção de nutrientes essenciais e perda de proteínas, permitindo o crescimento descontrolado deste organismo nos pulmões, por causa da debilidade no sistema imune (HUGHES, 1984). A PPC tem sido induzida em ratos com dieta deficiente em proteínas ou livre das mesmas (HUGHES *et al.*, 1974 e SETTNES & LODAL, 1980). SETTNES *et al.* (1986), observaram o desenvolvimento de pneumocistose em lebres com enterite causada por coccidiose e em veado com lesão mandibular, impedido de

se alimentar. Em suínos, SETTNES & HENRIKSEN (1989), observaram maciça infecção por *P. carinii*, em animais debilitados acometidos de diarreia.

De uma maneira geral, a revisão de HAY (1988) considerou que a PPC pode aparecer de duas maneiras. Uma forma epidêmica e outra esporádica. A forma epidêmica desenvolve-se vagarosamente e de maneira insidiosa; aparece em maior frequência em indivíduos jovens, pré-maturos, malnutridos, debilitados ou mesmo vivendo em condições de superpopulação. Já a forma esporádica, tem sido observada em pacientes imunocomprometidos.

4.3.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS FASES EVOLUTIVAS TECIDUAIS

4.3.1.1. Impressões de pulmões coradas pelo Giemsa

Nesta coloração, observou-se as formas pré-císticas e císticas, onde foram evidenciados os corpos intracísticos. Na Figura 13-A,B,E encontram-se formas pré-císticas contendo dois ou quatro corpos intracísticos e na 13-C,D,E observam-se formas císticas com oito corpos intracísticos. A parede, tanto dos pré-cistos quanto dos cistos, não tem afinidades pelo corante e é representada por um halo claro que às vezes é bem visível. Esta descrição, está de acordo com as observações de KIM & HUGHES (1973).

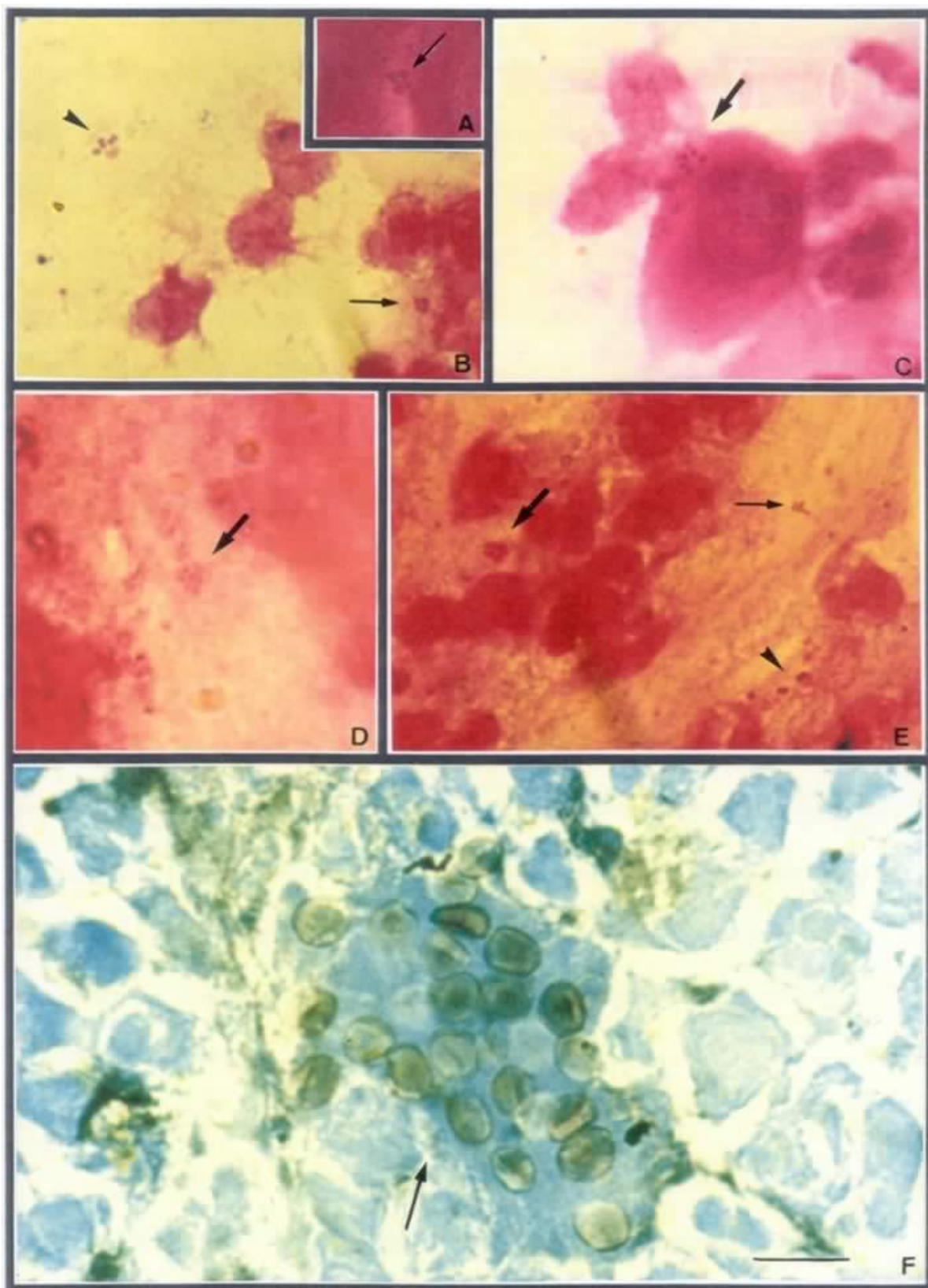


FIGURA 13. Impressão de pulmão de ratas com *Pneumocystis carinii*. B e E) Pré-cistos com dois corpos intracísticos (➤); A, B e E) pré-cistos com quatro corpos intracísticos (→); C, D e E) cistos com oito corpos intracísticos (➡), Giemsa (— = 50 µm); F) cistos, observando a parede cística (➡), Grocott (— = 10 µm).

Este método de coloração têm determinadas vantagens, por ser um método rápido e disponível em qualquer laboratório; a coloração é seu próprio controle; assim, se as células sangüíneas estão apropriadamente coradas, o *P. carinii* também estará, corando somente organismos viáveis. Com esta coloração, exige-se uma diferenciação cuidadosa do organismo, já que várias outras estruturas têm afinidade pelo corante e quando poucos organismos estão presentes nas amostras, não são facilmente identificados, a busca dos mesmos sendo tediosa e demorada.

4.3.1.2. Esfregação de pulmão corado pela prata

Com esta metodologia, observa-se somente a parede cística bem visível, sendo esta de coloração marrom escuro a marrom claro, com um fundo de contraste de cor verde (Figura 13-F). É um método excelente quando há poucos organismos. Cora também elementos vazios ou mortos, podendo informar sobre o sucesso terapêutico, correlacionando-se com o Giemsa. Apresenta desvantagem em esfregaços, por ficarem muito corados e também porque o método padrão toma muito tempo, entretanto, podem ser realizadas técnicas modificadas rápidas (10 minutos) (MAHAN & SALE, 1978). Estas observações estão de acordo com HUGHES (1975).

Em medidas de 50 cistos com esta coloração, obtiveram-se médias de $6,76 \pm 0,99 \times 5,22 \pm 0,82$ para diâmetros maior e menor, respectivamente.

4.3.2. FREQUÊNCIA DE LESÕES PULMONARES POR *Pneumocystis carinii*

De um total de 112 animais capturados no habitat B, 20 (17,86%) apresentaram lesões pulmonares sugestivas de PPC. Com relação à idade, a maior ocorrência foi observada em animais com peso corporal entre 101 e 200 g, onde 10 (8,93%) estavam parasitados. Considerando os sexos, a maior ocorrência foi nos machos, onde encontrou-se 11 (16,17%) animais parasitados. A representação gráfica das prevalências considerando idade e sexo encontra-se na Figura 14.

Esses achados foram semelhantes aos observados na Dinamarca por SETTNES & LODAL (1980), que encontraram 22% de 150 *R. norvegicus* examinados, positivos para *P. carinii*.

No entanto, as observações feitas por este trabalho no habitat B, de característica urbana, foram relacionadas às lesões macroscópicas observadas nos pulmões, sem contudo caracterizar os animais portadores.

Observações das amostras obtidas nesta população de ratazanas, caracteriza o desenvolvimento da PPC como de maneira vagarosa e insidiosa, em uma área superpovoada em virtude da facilidade de alimentação, dando uma característica epidêmica ao fato. Tal condição já tinha sido assinalada por HAY (1988) em humanos.

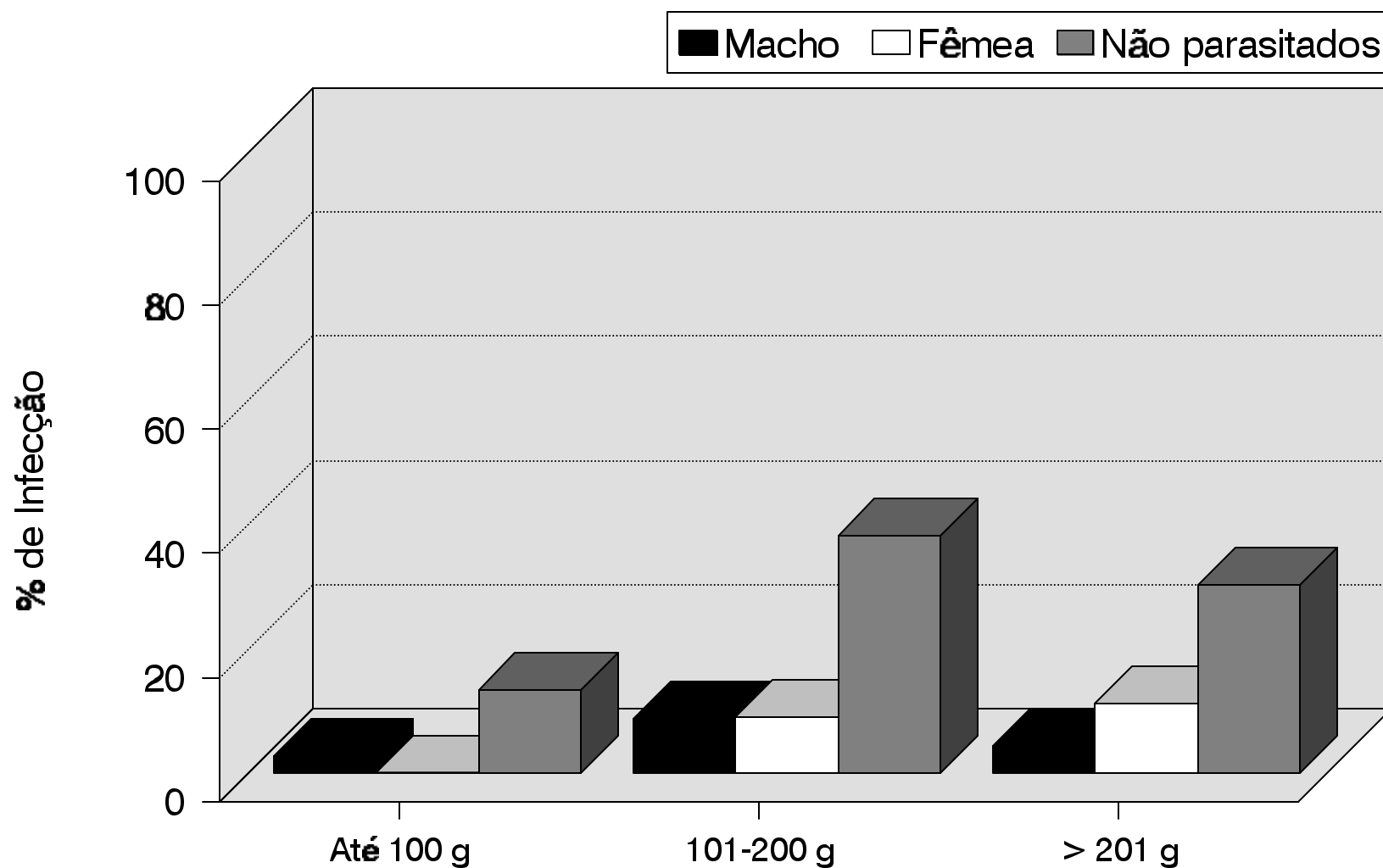


FIGURA 14. Prevalência de ratas parasitadas por *Pneumocystis carinii*, capturadas no habitat B, considerando idade e sexo.

Com a permanência do *P. carinii* de maneira assintomática, a significância destes animais como reservatório natural é grande. Importância a este fato tem sido dada por JIROVEC (1961) e KUCÉRA (1966) ao estudar casos esporádicos de PPC em humanos. Provavelmente isto esteja bem consolidado, já que *P. carinii* de ratos e de outros animais são a mesma espécie, sendo idêntica àquela que se estabelece em humanos (GOETZ, 1960; BARTON & CAMPBELL, 1969; CAMPBELL, 1972; KIM *et al.*, 1972 e KAGAN & NORMAN, 1976). Pequenas nuances não podem ser utilizadas para separar *P. carinii* observados em ratos e humanos, como foi sugerido por FRENKEL *et al.* (1966).

Finalizando, observa-se que as ratazanas, por viverem em estreita relação com os animais e o homem, podem representar um papel importante na epidemiologia da PPC, tendo em vista o que foi observado neste trabalho quando se tomou por base os animais acometidos de lesões pulmonares e não os portadores, que se supõe sejam em número bem maior.

4.3.3. PATOLOGIA EM CASOS NATURAIS DE PNEUMOCISTOSE EM RATAZANAS

À necropsia, os animais suspeitos de PPC apresentaram pulmões com volume aumentado, consolidados e não colapsados. A coloração do órgão variou do róseo nas áreas de consolidação a cinza pálido ao castanho nas áreas focais. Ao corte

a superfície pulmonar era áspera e irregular, vertendo uma substância líquida do parênquima. Estas características foram semelhantes às observadas por HAY (1988), SETTNES & HENRIKSEN (1989), BILLE-HANSEN *et al.* (1990) e SMULIAN & WALZER (1992).

Exame das lesões microscópicas da PPC nas ratazanas, revelou a presença de exsudado de coloração eosinofílica preenchendo os espaços alveolares (Figura 15), acompanhado por hipertrofia da parede alveolar e da pleura visceral, observando ainda descamação das células da parede alveolar, com presença expressiva de macrófagos (Figura 16). Já em outras áreas, as lesões eram mais antigas, caracterizando-se por infiltrações do parênquima pulmonar por células inflamatórias, em sua maioria células mononucleares. Ao mesmo tempo, observou-se um aumento de tecido conectivo, substituindo por completo os espaços inter-alveolares (Figura 17). Foram ainda observadas áreas caracterizadas por presença de granulomas e fibrose peribronquiolar, esta de aspecto cístico com metaplasia endotelial de sua mucosa, em cujo interior fazia-se presente uma substância eosinofílica de caráter protéico, com algumas células inflamatórias (Figura 18 e 19).

Estas alterações observadas nas ratazanas foram semelhantes às assinaladas em outras espécies, inclusive em humanos (HAY, 1988; SETTNES & HENRIKSEN, 1989; BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; LIPSCHIK & MASUR, 1991 e

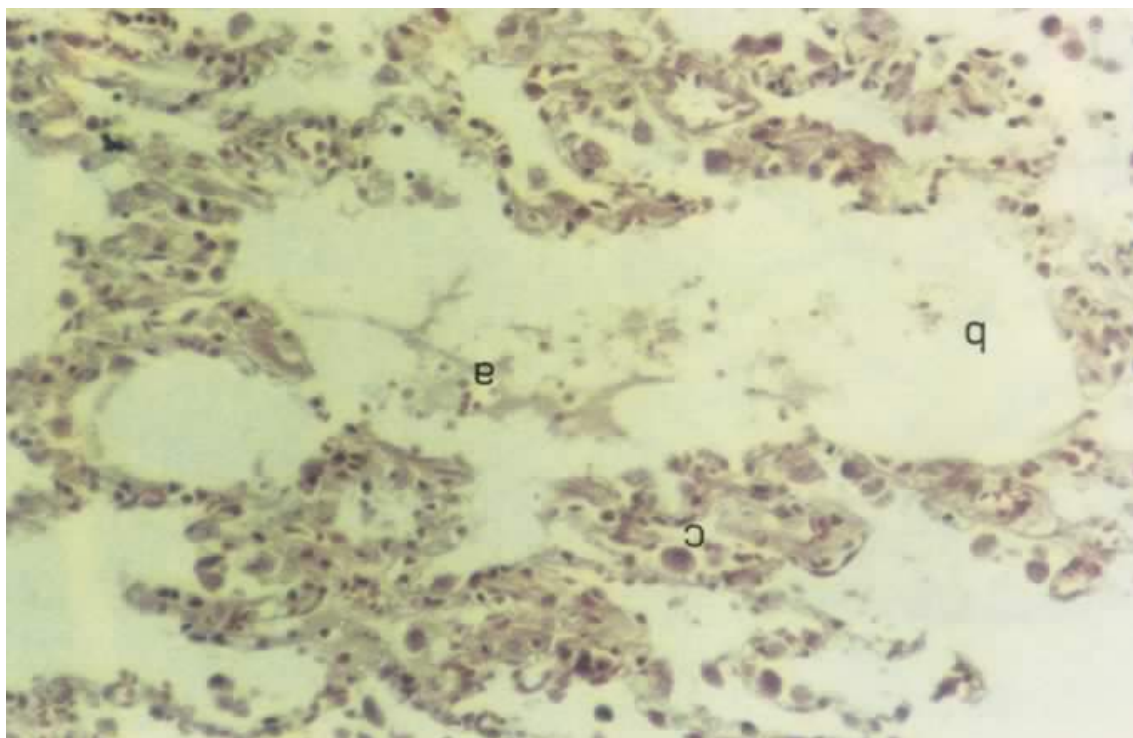


FIGURA 15. Pulmão de uma ratazana. Exsudato de coloração eosinofílica (a), colapsamento alveolar (b) e macrófagos (c). H.E. (— = 50 μ m).

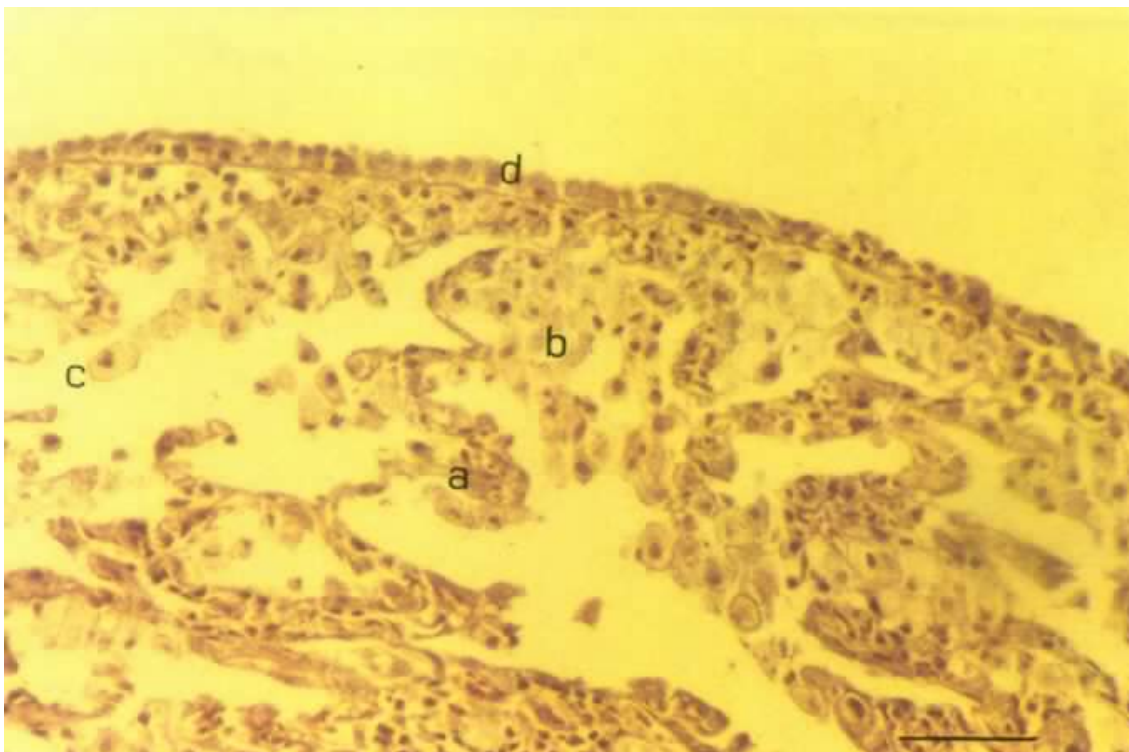


FIGURA 16. Pulmão de uma ratazana. Hipertrofia da parede alveolar (a), descamação celular (b), macrófagos (c) e hipertrofia celular (d). H.E. (— = 50 μ m).

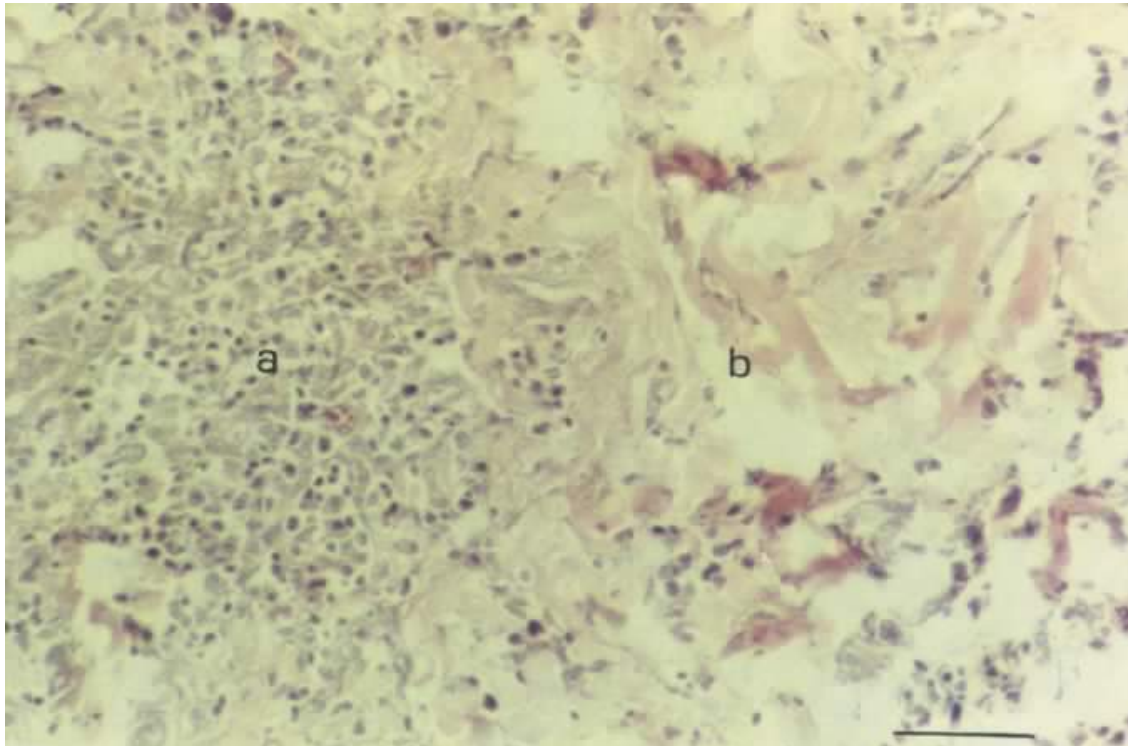


FIGURA 17. Pulmão de uma ratazana. Infiltração celular (a) e fibrose inter-alveolar (b). H.E. (— = 50 μm).

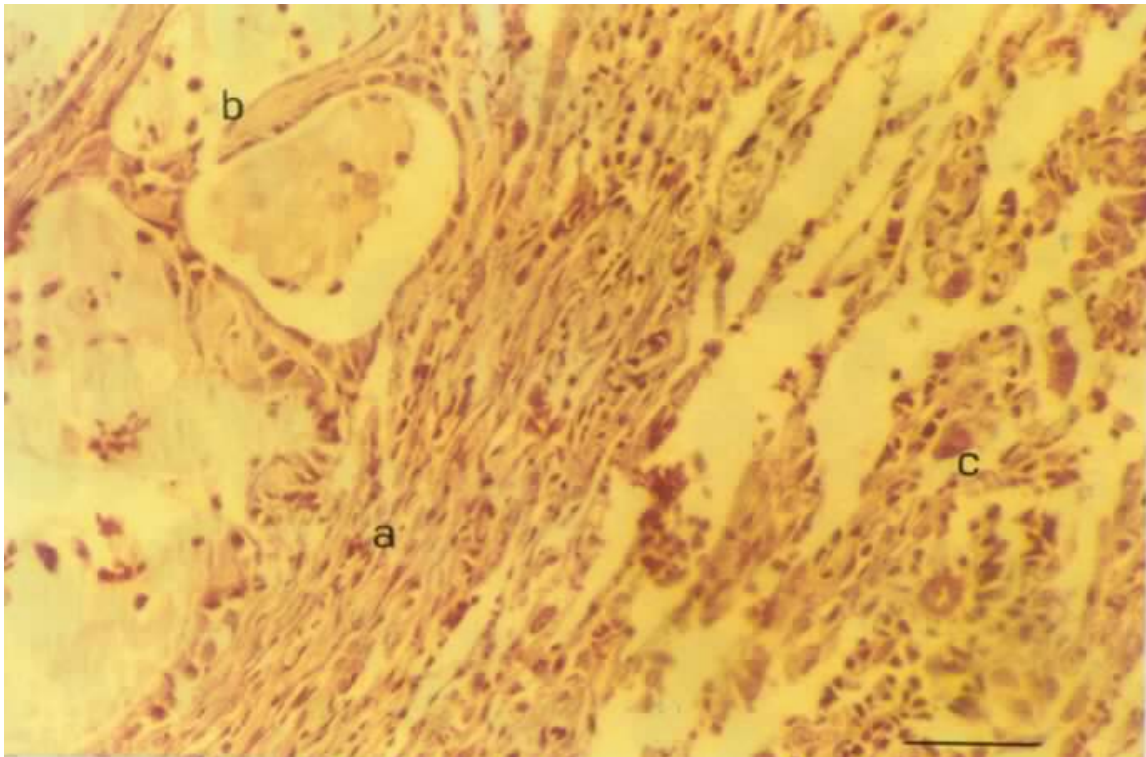


FIGURA 18. Pulmão de uma ratazana. Fibrose peribronquiolar (a), aspecto papilar do bronquíolo com metaplasia de mucosa (b) e granuloma parenquimatoso (c). H.E. (— = 50 μ m).

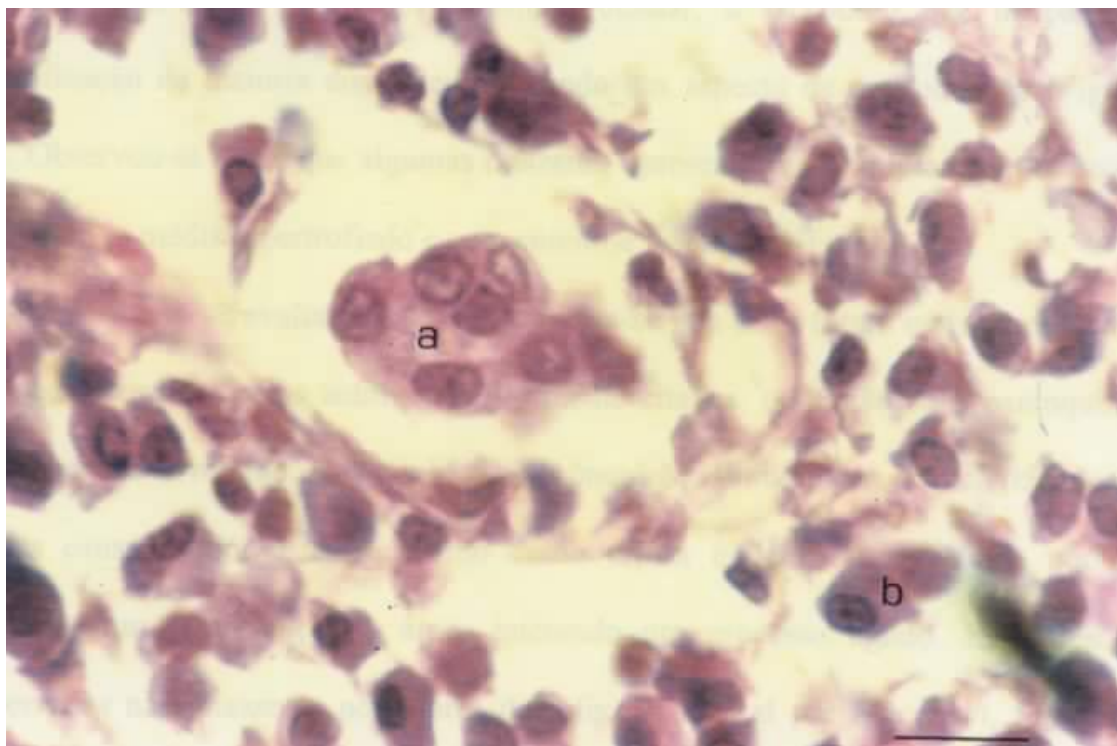


FIGURA 19. Aumento maior da Figura 18. Caracterização da área granulomatosa, com presença de células gigantes (a) e linfócitos (b). H.E. (— = 10 μ m).

SMULIAN & WALZER, 1992). Alterações como hiperplasia da mucosa dos bronquíolos, com o lumém repleto de células descamadas e de células inflamatórias representadas por células mononucleares, linfócitos e macrófagos foram observadas. Também nota-se ao seu redor infiltrado celular, a tal ponto que dificulta a identificação da maioria dos alvéolos, dando um aspecto de consolidação (Figura 20). Observou-se ainda que algumas ratazanas apresentavam arteríolas com o tecido muscular da média hipertrofiado e com entenose de sua luz (Figura 21).

Ao se avaliar tais lesões, observa-se que estas foram mais extensas do que as observadas pelos autores anteriormente citados, onde não só o parênquima pulmonar foi envolvido, mas também os brônquios e bronquíolos, caracterizando as lesões causadas por este organismo como difusa e de caráter crônico, porém, também com a presença de áreas iniciando um processo agudo. Estas lesões observadas nas ratazanas, portadoras da infecção natural por *P. carinii*, foram de uma broncopneumonia intersticial crônica.

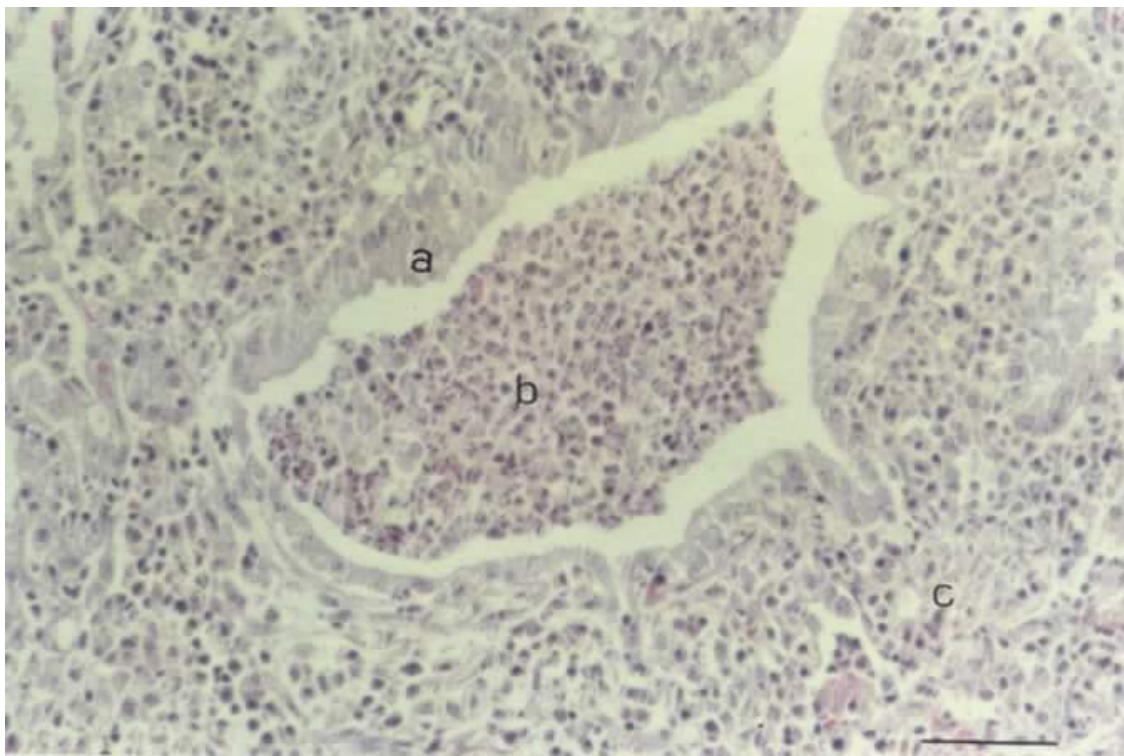


FIGURA 20. Pulmão de uma ratazana. Hiperplasia celular da mucosa do bronquíolo (a), infiltrado celular no lúmen (b) e no parênquima (c). H.E. (— = 50 μ m).

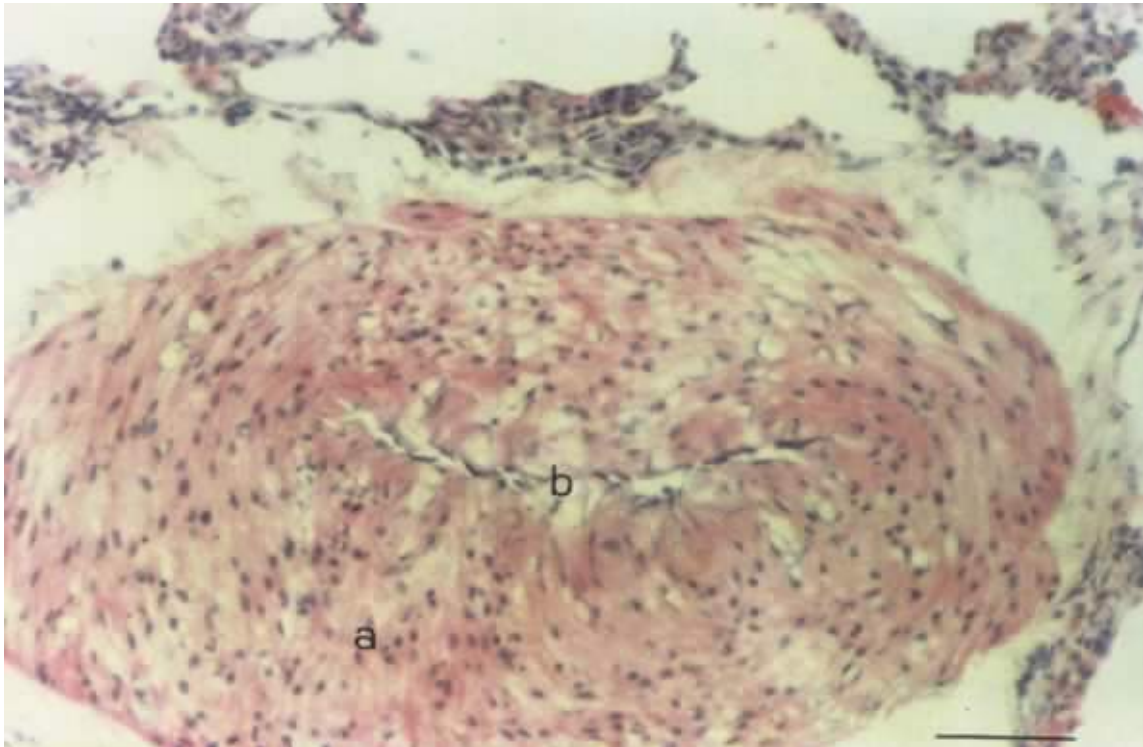


FIGURA 21. Pulmão de uma ratazana. Hipertrofia muscular da camada média de uma arteríola (a) e estenose do lúmen (b). H.E. (— = 50 μ m).

5. CONCLUSÕES

Das ratazanas procedentes de dois habitats, um rural (A) e outro urbano (B), localizados o primeiro no município de Seropédica e o segundo no de Nova Iguaçu, ambos na microrregião fluminense do Grande Rio, estado do Rio de Janeiro, tirou-se as seguintes conclusões:

1. Nas fezes de ratazanas nos habitats A e B foram encontrados oocistos caracterizados como sendo da espécie *Cryptosporidium muris*, com base nas dimensões de seus oocistos e na localização de formas endógenas do parasito nas glândulas gástricas.

2. Apesar das diferenças significativas existentes entre as dimensões dos oocistos procedentes das ratazanas dos habitats A e B, observou-se um certo grau de pleomorfismo nesta fase de desenvolvimento biológico, caracterizando com isto a existência de variações dentro de uma mesma espécie.

3. As dimensões dos oocistos corados pelo Ziehl-Neelsen modificado, ao serem comparadas com aquelas obtidas dos oocistos observados em campo brilhante foram significativas, independentemente da procedência do material estudado. Desta maneira, observou-se modificações das dimensões dos oocistos, mesmo sendo de mesma amostra, mantendo-se, ainda assim, nos limites preconizados para os oocistos da espécie *C. muris*.

4. A maior frequência de oocistos de *C. muris* foi observada entre os adultos, independentemente de sexo e habitat.

5. As espécies *Eimeria nieschulzi* e *E. separata* observadas no presente trabalho, foram diagnosticadas com base nas dimensões e morfologia dos oocistos e nos índices morfométricos dos mesmos, que os caracterizaram como elipsoidais e subsféricos, respectivamente.

6. As variações observadas nas dimensões dos oocistos de ambas as espécies, procedentes dos habitats A e B, apesar de serem significativas, são características de modificações observadas dentro de uma mesma espécie, capazes de caracterizar o amplo pleomorfismo existente em ambas as espécies.

7. Quanto ao parasitismo por *E. nieschulzi* e *E. separata*, não se observou interações negativas ou mesmo competitivas entre ambas as espécies, independentemente dos habitats estudados, onde a frequência foi observada nos

animais considerados adolescentes, por serem expostos à infecção por estas espécies durante um maior período.

8. Formas endógenas do *Pneumocystis carinii* foram observadas em lesões pulmonares de ratazanas somente do habitat B, enfatizando o desenvolvimento da doença causada por este microorganismo como lenta e insidiosa em uma área superpovoadas, onde a permanência do *P. carinii* causando pneumocistose assintomática torna as ratazanas reservatórios, dando característica epidêmica ao fato.

9. As lesões pulmonares observadas em 17,86% dos animais foram caracterizadas por um processo patológico de caráter progressivo, responsável por causar uma broncopneumonia intersticial crônica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B.C.; DONNDELINGER, T.; WILKINS, R.M. & SMITH, J. 1982. Cryptosporidiosis in a veterinary student. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **180**:408-409.
- ARAGÃO, H.B. 1913. Nota sobre as schizogonias e gametogonias dos trypanosomas. **Bras. Med.**, **27**:271-272.
- ARAI, H.; FUKUDA, Y.; HARA, T.; FUNAKOSHI, Y.; KANEKO, S.; YOSHIDA, T.; ASAH, H.; KUMADA, M.; KATO, K. & KOYAMA, T. 1990. Prevalence of *Cryptosporidium* infection among domestic cats in Tokyo Metropolitan District, Japan. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, **43**:7-14.
- ASKIN, F.B. & KATZENSTEIN, L.A. 1981. *Pneumocystis carinii* masquerading as diffuse alveolar damage. **Chest**, **79**:420-422.

- BARKER, I.K.; O'CALLAGHAN, M.G.; BURRIDGE, I. & CLOSE, R.L. 1988. Host-parasite associations of *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in rock wallabies, *Petrogale* spp. (Marsupialia: Macropodidae). **Inter. J. Parasitol.**, **18**:353-363
- BARNETT, R.N.; HULL, J.G.; VORTEL, Y.; KRALOVE, H. & SCHWARTZ, J. 1969. *Pneumocystis carinii* in lymphnodes and spleen. **Arch. Pathol.**, **88**:173.
- BARTA, K. 1969. Complement-fixation test for pneumocystosis. **Ann. Intern. Med.**, **70**:235.
- BARTLETT, M.S.; VERBANAC, P.A. & SMITH, J.W. 1979. Cultivation of *Pneumocystis carinii* with WI-38 cells. **J. Clin. Microbiol.**, **10**:796-799.
- BARTON, E. & CAMPBELL, W. 1969. *Pneumocystis carinii* in lungs of rats treated with cortisone acetate. **Am. J. Pathol.**, **54**:209-236.
- BAXBY, D.; BUUNDELL, N. & HART, C.A. 1984. The development and performance of a simple sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **J. Hyg.**, **93**:317-323.

- BECKER, E.R. 1934. Coccidia and coccidiosis of domesticated game, and laboratory animals and of man. Collegiate Press. Ames, Iowa, 147 p. *In*: LEVINE, N.D. & IVENS, V. 1965. **The coccidian parasites (Protozoa: Sporozoa) of Rodents.** Illinois Biological Monographs, University of Illinois Press, Urbana, p. 357.
- BECKER, E.R. & HALL, P.R. 1931. *Eimeria separata*, a new species of coccidium from the norway rat (*Epemys norvegicus*). **Iowa St. Coll. J. Sci.**, **6**:131.
- BECKER, E.R. & HALL, P.R. 1933. Cross-immunity and correlation of oocyst production during immunization between *Eimeria miyarii* and *E. separata* of the rat. **Am. J. Hyg.**, **18**:220-223.
- BECKER, E.R.; HALL, P.R. & HAGER, A. 1932. Quantitative, biometric and host-parasite studies on *Eimeria miyarii* and *Eimeria separata* in rat. **Iowa St. Coll. J. Sci.**, **6**:299-316.
- BECKER, E.R. & SMITH, L. 1942. Nature of *Eimeria nieschulzi* - growth - promoting potency of feeding stuffs. Riboflavin and nicotinic acid. Proc. Iowa Acad. Sci., 49:503-506. *In*: LEVINE, N.D. & IVENS, V. 1965. **The coccidian parasites**

(Protozoa: Sporozoa) of Rodents. Illinois Biological Monographs, University of Illinois Press, Urbana, p. 357.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C. de & FREITAS NETO, A.G. de. 1976. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica.** EDART, São Paulo, 239 p.

BEIER, T.V. & SIDORENKO, N.V. 1993. On yet another biological characteristic of coccidia from the genus *Cryptosporidium* (Sporozoa: Apicomplexa). **Parazitologiya**, 27:309-319.

BEVERLY, S.; ELLENBERGER, T.E. & CORDINGLEY, J.S. 1986. Primary structure of the gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymedylate syntethase of *Leishmania major*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 83: 2584.

BILLE-HANSEN, V.; JORSAL, S.E. & HENRIKSEN, S.A. 1990. *Pneumocystis carinii* pneumonia in Danish piglets. **Vet. Rec.**, 20:407-408.

BLAGBURN, B.L. & CURRENT, W.L. 1983. Accidental infection of a researcher with human *Cryptosporidium*. **J. Infect. Dis.**, 148:772-773.

BLUMENFELD, W.; BASGOZ, W.; OWEN, W.E. & SCHMIDT, D.M. 1988.

Granulomatous pulmonary lesions in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and *Pneumocystis carinii* infection. **Ann. Intern. Med.**, **109**:505-507.

BOMFIM, T.C.B. do. 1989. *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em suínos: Identificação, diagnóstico e alguns aspectos epidemiológicos. Tese de Mestrado, UFRRJ, Itaguaí, 113 p.

BOMFIM, T.C.B. do & LOPES, C.W.G. 1995a. Infecção experimental em camundongos com oocistos do gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) provenientes de suínos. **Rev. Bras. Med. Vet.**, **17**:17-20.

BOMFIM, T.C.B. do & LOPES, C.W.G. 1995b. Aspectos comparativos dos oocistos de *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae), procedentes de suínos (*Suis scrofa domestica*), camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus rattus*) coabitando o mesmo local. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, **4**:29-32.

BONNIN, A.; PETRELLA, T.; DUBREMETZ, J.F.; MICHIELS, J.F.; PUY-GAUTHIER-TOUBAS, D. & CAMERLYNCK, P. 1990. Histopathological method for

diagnosis of cryptosporidiosis using monoclonal antibodies. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **9**:664-666.

BRASSEUR, P.; LEMETTEL, D. & BALLEET, J.J. 1988. Rat model for human cryptosporidiosis. **J. Clin. Microbiol.**, **26**:1037-1039.

BRENNER, M.; OGNIBENE, F.P. & LACK, E.E. 1987. Prognostic factors and life expectancy of patients with acquired immunodeficiency syndrome and *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **136**:1199-1206.

BURKE, B.A. & GOOD, R.A. 1973. *Pneumocystis carinii* infection. **Medicine**, **52**:23-51.

CABRAL DE SOTERO, A. 1956. Notas sobre *Pneumocystis carinii*. Raridade atual deste parasito em animais de laboratório. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **54**:87-91.

CALHOUN, J.B. 1962. **The Ecology and Sociology of the Norway Rat**. Washington, U.S. Gov. Print. Off., 210 p.

CAMPBELL, W.B. 1972. Ultrastructure of *Pneumocystis* in human lung. Life cycle in human pneumocystosis. **Arch. Pathol.**, **93**:312.

- CARINII, A. 1910. Formas de eschizogonia de *Trypanosoma lewisi*. **Arch. Soc. Med.**, São Paulo, **16**.
- CARTER, T.R.; COOPER, P.H.; PETRI, W.A.; KIM, C.K.; WALZER, P.D. & GUERRANT, R.L. 1988. *Pneumocystis carinii* infection of the small intestine in a patient with acquired immune deficiency syndrome. **Am. J. Clin. Pathol.**, **89**:679-683.
- CASEMORE, D.P. 1990. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. **Epidemiol. Infect.**, **104**:1-28.
- CASEMORE, D.P.; ARMSTRONG, M. & JACKSON, B. 1984. Screening for *Cryptosporidium* in stools. **Lancet**, **i**:734-735.
- CHAGAS, C. 1909. Nova tripanozomiaza humana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **1**:159-218.
- CHAGAS, C. 1911. The life cycle of *Schizotrypanum cruzi* in man and laboratory animals. **Bull. Soc. Path. Exot.**, **4**:467-471.

- CHALVARDJIAN, A.M. & GRAWE, L.A. 1963. A new procedure for identification of *Pneumocystis carinii* in tissue sections and smears. **J. Clin. Pathol.**, **16**:383-384.
- CHICHINO, G.; BRUNO, A.; CEVINI, C.; ATZORI, C.; GATTI, S. & SCAGLIA, M. 1991. New rapid staining methods of *Cryptosporidium* oocysts in stools. **J. Protozool.**, **38**(supl.):212S-214S.
- CHRISP, C.E.; REID, W.C.; RUSH, H.G.; SUCKOW, M.A.; BUSH, A. & THOMANN, M.J. 1990. Cryptosporidiosis in guinea pigs: an animal model. **Infect. Imm.**, **58**:674-679.
- CHRISP, C.E.; SUCKOW, M.A.; FAYER, R.; ARROWOOD, M.J.; HEALEY, M.C. & STERLING, C.R. 1992. Comparison of the host ranges and antigenicity of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium wrairi* from guinea pigs. **J. Protozool.**, **39**:406-409.
- CHUSID, M.J. & HEYRMAN, K.A. 1978. An outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia at a pediatric hospital. **Pediatrics**, **62**:1031-1035.

- CLERHEW, L.W. 1980. Cryptosporidia associated with rotavirus and an *Escherichia coli* in an outbreak of calf scour. **Vet. Rec.**, **106**:458-460.
- CROSS, R.F. & MOORHEAD, P.D. 1984. A rapid staining technique for cryptosporidia. **Moder. Vet. Pract.**, **65**:307.
- CURRENT, W.L. & GARCIA, L.S. 1991. Cryptosporidiosis. **Cli. Microbiol. Rev.**, **4**:325-358.
- CURRENT, W.L. & HAYNES, T.B. 1984. Complete development of *Cryptosporidium* in cell cultures. **Science**, **224**:603-605.
- CURRENT, W.L.; REESE, N.C.; ERNEST, J.V.; BAILEY, W.S.; HEYMAN, M.B. & WEINSTEIN, W.M. 1983. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. **New Engl. J. Med.**, **308**:1252-1257.
- CURRENT, W.L.; UPTON, S.J. & HAYNES, T.B. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chickens. **J. Protozool.**, **33**:289-296.

- D'ANTONIO, R.G.; WINN, R.E.; TAYLOR, J.P.; GUSTAFSON, T.L.; CURRENT, W.L.; RHODES, M.M.; GARY, G.W. & ZAJAC, R.A. 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Ann. Inter. Med.**, **103**:886-888.
- DEI-CAS, E.; CAILLEZ, J.; PALLUAULT, F.; ALIOUAT, E.; MAZARS, E.; SOULEZ, B.; SUPPIN, J. & CAMUS, D. 1992. Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent? **Eur. J. Clin. Epidemiol.**, **8**:460-470.
- DAVIS, L.R.; BOWMAN, G.W. & BOUGHTON, D.C. 1957. The endogenous development of *Eimeria alabamensis* Christensen, 1941, an intranuclear coccidium of cattle. **J. Protozool.**, **4**:219-225.
- DELANÖE, P. & DELANÖE, M. 1912. Sur les rapports des kystes de Carini des pulmons des rats avec *Trypanosoma lewisi*. **Acad. Sci. Paris**, **155**:39-41.
- DE PUYTORAC, P.; GRAIN, J. & MIGNOT, J. 1987. **Precis de Protistologie**. Boubée et Fondation Singer Polignac ed., Paris, 583 p.
- DIAS, R.M.D.S.; CHIEFFI, P.P.; TORRES, D.M.A.G.V. & MANGINI, A.C.S. 1981. Parasitas do gênero *Eimeria* (Coccidia, Eimeriidae), *E. separata* e *E. nieschulzi*,

em *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, SP, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **41**:101-105.

DIEBEN, C.P.A. 1924. Over de morphologie en biologie van het ratten coccidium *Eimeria nieschulzi* n. sp. en zijne verspreiding in Nederland. **Proefschrift. Veeartesenijk. Hoogeschool.**, Utrecht, 119 p. *In*: LEVINE, N.D. & IVENS, V. 1965. **The coccidian parasites (Protozoa: Sporozoa) of Rodents**. Illinois Biological Monographs, University of Illinois Press, Urbana, p. 357.

DIEBEN, C.P.A. *in* BECKER, E.R.; HALL, P.R. & HAGER, A. 1932. Quantitative, biometric and host-parasite studies on *Eimeria miyarii* and *Eimeria separata* in rats. **Iowa St. Coll. J. Sci.**, **6**:299-316.

DIECKMANN, H.; LINDNER, E. & STOPKA, E. 1954. Defund bei interstitieller plamacellularer Pneumonie. **Beitr. Pathol. Anat.**, **114**:48-64.

DUSZYNSKI, D.W. 1971. Increase in size of *E. separata* oocysts during patent period. **J. Parasitol.**, **57**:948-952.

- DUSZYNSKI, D.W. 1972. Host and parasite interactions during single and concurrent infections with *Eimeria nieschulzi* and *E. separata* in the rat. **J. Protozool.**, **19**:82-88.
- DUSZYNSKI, D.W. & MOORE, D.W. 1986. Coccidian parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) from insectivores. II. Six new species from Japanese shrew moles (Talpidae). **J. Protozool.**, **33**:276-281.
- EDMAN, J.; KOVACS, J.; MASUR, H. & SANTI, D. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. **Nature**, **334**:519-522.
- ERNEST, J.A.; BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S. & CURRENT, W.L. 1986. Infection dynamics of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in neonatal mice (*Mus musculus*). **J. Parasitol.**, **72**:796-789.
- ESTERLY, J.A. & WARNER, N.E. 1965. *Pneumocystis carinii* pneumonia twelve cases in patients with neoplastic lymphoreticular disease. **Arch. Pathol.**, **80**:433.
- FAYER, R. 1980. Epidemiology of protozoan infection: the coccidia. **Vet. Parasitol.**, **6**:75-103.

- FAYER, R. & UNGAR, B.L.P. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiol. Rev.**, 50:458-483.
- FIBGE, 1985. **Censo Agropecuário. 20.** IBGE, Rio de Janeiro, 370 p.
- FIGUEIREDO, P.C. de. 1989. **Espécies do gênero *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Apicomplexa: Sarcocystidae) parasitas de ruminantes domésticos que têm o cão como hospedeiro definitivo: morfologia, biologia e diagnóstico.** Tese de Doutorado, UFRRJ, Itaguaí, 124 p.
- FIGUEIREDO, P.C. de; SERRA FREIRE, N.M. da & GRISI, L. 1984. Eimérias de bovinos leiteiros no estado do Rio de Janeiro: técnicas de diagnóstico e espécies identificadas. **Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro**, 24:3-10.
- FONSECA, J.S. da; MARTINS, G. de A. & TOLEDO, G.L. 1985. **Estatística Aplicada.** 2 ed., São Paulo, Atlas, 267 p.
- FRENKEL, J.K.; GOOD, J.T. & SCHULTZ, J.A. 1966. A latent pneumocystis infection of rats, relapse, and chemotherapy. **Lab. Invest.**, 15:1559.

FRÓES, O.M. 1976. Novos registros para a fauna parasitária do Rio Grande do Sul.

An. Fac. Med. Porto Alegre, 36:23-26.

GARCIA, L.S.; SHUM, A.C. & BRUCKNER, D.A. 1992. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. **J. Clin. Microbiol., 30:3255-3257.**

GARDNER, S.L. & DUSZYNSKI, D.W. 1990. Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. **J. Parasitol., 76:805-811.**

GARRISON, R. 1983. **Ultrastructural Cytology of Pathogenic Fungi. Dans, Fungi Pathogenic for Humans and Animals.** Howard D.H. ed., New York, Marcel Dekker, Inc., 229-321.

GAYADHAR, A.A. 1994. Host specificity studies and oocyst description of a *Cryptosporidium* sp. isolated from ostriches. **Parasitol. Res., 80:316- 319.**

- GOEBEL, E. & BRAENDLER, U. 1982. Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogamy of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice. **Protistologia**, **18**:331-334.
- GOETZ, O. 1960. Die Actiologic der interstitiellen Sogenannten plasmacellulare pneumonie des jungens Sauglings. **Arch. Kinderheilkd. (Suppl.)**, **163**:1.
- GRIFFIN, L. & LUCAS, S.B. 1982. Does *Pneumocystis carinii* occur in Kenya. **Trans. Societ. Trop. Med. Hyg.**, **72**:198-199.
- GROCOTT, R.G. 1955. A stain for tissue sections and smears using gomori's methenamine-silver nitrate technic. **Am. J. Clin. Pathol.**, **25**:975-979.
- GUERREIRO, C. & MACHADO, A. 1913. Duas reações de Bordet e Gengow na molestia de Carlos Chagas como elemento de diagnóstico. **Bras. Med.**, **27**:681-685.
- HANSEN, J.S. & ONGERTH, J.E. 1991. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Appl. Envir. Microbiol.**, **57**:2790-2795.

HAY, J. 1988. *Pneumocystis carinii* and pneumocystosis. **Pharmac. J.**, 5:600-603.

HEINE, J. 1982. Eine einfache Nach-Weismethode für Kryptosporidien im Kot. **Zbl. Vet. Med. B**, 29:324-327.

HENDLEY, J.O. & WELLER, T.H. 1971. Activation on transmission in rats of infection with *Pneumocystis carinii*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 137:1401.

HENRICKSEN, S.A. & POHLENZ, J.F.L. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Vet. Scand.**, 22:594-596.

HOERR, F.J.; RANCK, F.M. & HASTINGS, T.F. 1978. Respiratory cryptosporidiosis in turkeys. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 173:1591-1593.

HSU, C.K. 1979. **The Laboratory Rat**. Vol. I. Chapter 12. Academic Press. Inc., 412 p.

HUGHES, W.T. 1975. Current status of laboratory diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, 6:145.

- HUGHES, W.T. 1982a. Comparison of cyclosporin and dexamethasone to induce pneumocystosis in rats. **J. Infect. Dis.**, **145**:767.
- HUGHES, W.T. 1982b. Natural mode of acquisition for the new infection with *Pneumocystis carinii*. **J. Infect. Dis.**, **145**:842-848.
- HUGHES, W.T. 1984. *Pneumocystis carinii*: A model for nutrition - immunity interaction. In: **Neonatal Infections**. Ed. by P.L. Ogra, Grune & Stratton, New York, p. 247-263.
- HUGHES, W.T. 1987. *Pneumocystis carinii* Pneumonitis. Vol. 1, CRC Inc., Boca Raton, 131 p.
- HUGHES, W.T. 1989. *Pneumocystis carinii*, taxing taxonomy. **Eur. J. Epidemiol.**, **5**:265-269.
- HUGHES, W.T.; BARTLEY, D.L. & SMITH, B.M. 1983. A natural source of infection due to *Pneumocystis carinii*. **J. Infect. Dis.**, **147**:595.
- HUGHES, W.T.; FELDMAN, S.; CHAUDHARY, C.C.; OSSI, M.J.; COX, F. & SAWYAL, S.K. 1978. Comparison of pentamidine isethionate and trimethoprim-

sulfamethoxazole in treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **J. Pediatr.**, **92**:285.

HUGHES, W.T.; FELDMAN, S. & SANYAL, S.K. 1975. Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis with trimethoprim-sulfamethoxazole. **Can. Med. Assoc. J.**, **112**:47-50.

HUGHES, W.T.; PRICE, R.A.; SISKI, F.; HAVRON, W.S.; KAFATOS, A.G.; SCHONLAND, D.M. & SMYTHE, D.M. 1974. Protein-calorie malnutrition. A host determinant for *Pneumocystis carinii* infestation and pneumonitis. **Amer. J. Dis. Child**, **128**:44-52.

ISEKI, M. 1986. Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. **Jpn. J. Parasitol.**, **35**:521-526.

ITATANI, C. & MARSHALL, G. 1988. Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* in situ and from bronchoalveolar lavage. **J. Parasitol.**, **74**:700-712.

IVADY, G. & PALDY, L. 1958. Ein neues behandlungsverfahren der interstitiellen plasmazelligen pneumonie fruhgeborener mit fünfwertigen stibium und aromatischen diamidien. **Monat. Kinderheilkd**, **106**:10.

JACKSON, H.; COLTHURST, D.; HANCOCK, V.; MARRIOTT, M. & TUIITE, M. 1991. No detection of characteristic fungal protein elongation factor EF-B in *Pneumocystis carinii*. **J. Infect. Dis.**, **163**:675-677.

JÉCNY, V. 1973. *Pneumocystis carinii* findings in young ones of some farm animals. **Epidemiol. Microbiol. Immunol.**, **22**:135-140.

JIROVEC, O. 1954. Weitere beiträge zur kenntnis der von *Pneumocystis carinii* verursachten interstitiellen pneumonie der säuglinge. **Bibl. Paediat.**, **58**: 85-95.

JIROVEC, O. & VANEK, J. 1956. Weitere beiträge zur morphologie von *Pneumocystis carinii*. **Zbl. Allg. Path. Anat.**, **94**:499-517.

JOKIPII, L.; POHJOLA, S. & JOKIPII, A.M.M. 1985. Cryptosporidiosis associated with travelling and giardiasis. **Gastroenterology**, **89**:838-842.

- JONES, E.E. 1932. Size as a species characteristic in coccidia: variation under diverse conditions of infection. **Arch. Protistenkd.**, **76**:130-170.
- JOYNER, L.P. 1982. Host and site specificity. *In*: LONG, P.L. **The Biology of the Coccidia**. Univ. Park Press, Baltimore, 2:35-62.
- JOYNER, L.P. & LONG, P.L. 1974. The specific characters of the *Eimeria*, with special reference to the coccidia of the fowl. **Avian Pathol.**, **3**:147-157.
- KAGAN, I.G. & NORMAN, L.G. 1976. Serology of pneumocystosis. **Natl. Câncer Inst. Monogr.**, **43**:121.
- KAWAMOTO, F.; MIZUNO, S.; FUJIOKA, H.; KUMADA, N.; SUGIYAMA, E.; TAKEUCHI, T.; KOBAYASHI, S.; ISEKI, M.; YAMAD, M.; MATSUMOTO, Y.; TEGOSHI, T. & YOSHIDA, Y. 1987. Simple and rapid staining for detection of *Entamoeba*, cysts and other protozoans with fluorochromes. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, **40**:35-46.
- KIM, H.K. & HUGHES, W.T. 1973. Comparison of methods for identification of *Pneumocystis carinii* in pulmonary aspirates. **Am. J. Clin. Pathol.**, **60**:462.

- KIM, H.K.; HUGHES, W.T. & FELDMAN, S. 1972. Studies of morphology and immunofluorescence of *Pneumocystis carinii*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **141**:304.
- KLESIUS, P.H.; HAYNES, T.B. & MALO, L.K. 1986. Infectivity of *Cryptosporidium* sp. isolated from wild mice for calves and mice. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **189**:192-193.
- KOVACS, J.; GILL, V.; OGNIBENE, F.; SHELMAMER, J.; PARRILLO, J. & MASUR, H. 1986. Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Lancet**, **2**:1-3.
- KUCÉRA, K. 1966. *Pneumocystis carinii*, parasite du poumon des animaux et de l'homme et pneumonie interstitielle du nourrisson. **Bull. Soc. Pharm. Quest.**, **8**:105-122.
- LAGE, H.A. & LAGE, S.A. 1973. *Pneumocystis carinii*, its incidence in rodents and enhancement of the infection by corticosteroids. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **71**:87-93.

- LAGER, D.J. & LANDAS, S.K. 1991. Correlative light and scanning electron microscopy of intestinal giardiasis, cryptosporidiosis and spirochetosis. **Ultrastruc. Pathol.**, 15:585-591.
- LAISON, R. 1994. Observations ou some avian coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) in Amazonian, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 89:303-311.
- LAISON, R. & SHAW, J.J. 1975. *Pneumocystis* and *Histoplasma* infections in wild animals from the Amazon region of Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 69:505-508.
- LAISON, R. & SHAW, J.J. 1989. Two new species of *Eimeria* and three new species of *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from brasilian mammals and bird. **Bull. Mus. Nat. Hist. Natur., Section A**, 11:349-365.
- LAPPONI, J.C. 1995. **Estatística usando Excel, versões 4 e 5**. São Paulo, Treinamento e Ltda, 292 p.
- LATORRE, C.R.; SULZER, A.J. & NORMAN, L.G. 1977. Serial propagation of *Pneumocystis carinii* in cell line cultures. **Appl. Microbiol.**, 33:1204.

- LeCHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D. & LEE, R.G. 1991. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. **Appl. Envir. Microbiol.**, 57:2617-2621.
- LEVINE, N.D. 1973a. **Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man**. 2nd ed. Minneapolis, Minn., Burgess, 406 p.
- LEVINE, N.D. 1973b. Introduction, History and Taxonomy. *In*: HAMMOND, D.M. & LONG, P.L. **The Coccidia**. Univ. Park Press, Baltimore, 1:1-22.
- LEVINE, N.D. 1980. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **J. Protozool.**, 31:94-98.
- LEVINE, N.D. 1982. Taxonomy and life cycles of coccidia. *In*: LONG, P.L. ed. **The Biology of the Coccidia**. University Park Press, Baltimore, 1:1-33.
- LEVINE, N.D. 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **J. Protozool.**, 31:94-98.
- LEVINE, N.D. 1985. **Veterinary Protozoology**, 1st ed., Iowa State University Press, Ames, 414 p.

- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. & SUNDERMANN, C.A. 1986. Host specificity of *Cryptosporidium* sp. isolated from chickens. **J. Parasitol.**, 72:565-568.
- LIPSCHIK, G.Y. & MASUR, H. 1991. *Pneumocystis carinii* Pneumonia (PCP). In: SUN, T. **Progress in Clinical Parasitology**. Field & Wood, Medical Publishers Inc., 2:27-71.
- LONG, P.L. & JOYNER, L.P. 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. **J. Protozool.**, 31(4):535-541.
- LONG, P.L. & REID, W.M. 1982. A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens. In: LONG, P.L. & JOYNER, L.P. 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. **J. Protozool.**, 31:535-541.
- LOPES, C.W.G. & BOMFIM, T.C.B. do. 1993. Diarréia em um felino associada a infecção por *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1910 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Rev. Bras. Med. Vet.**, 15:75-77.
- LOSS, Z.G. 1991. **Cistoisossorose felina**. Tese de Doutorado, UFRRJ, Itaguaí, 104 p.

- LOSS, Z.G. & LOPES, C.W.G. 1992. *Besnoitia wallacei* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) in a cat and its experimental transmission. **Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J.**, 15:203-206.
- MA, P. & SOAVE, R. 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **J. Infect. Dis.**, 147:824-828.
- MAHAM, C.T. & SALE, G.E. 1978. Rapid methenamine silver stain for *Pneumocystis* and fungi. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 102:351-352.
- MANN, E.D.; SEKLA, L.H.; NAYAR, G.P.S. & KOSCHIK, C. 1986. Infection with *Cryptosporidium* spp. in humans and cattle in Manitoba. **Can. J. Vet. Res.**, 50:174-179.
- MARGULIS, L.; CORLISS, J.O.; MELKONIAN, M. & CHAPMAN, D.J. 1989. **Handbook of Protoctista**. Jones & Bartlett Publishers, Boston, 914 p.
- MARQUARDT, W.C. 1973. Host and site specificity in the coccidia. *In*: HAMMOND, D.M. & LONG, P.L. **The Coccidia**. Univ. Park Press, Baltimore, 2:23-43.

- MARQUARDT, W.C.; PAFUM, B.A. & BUSCH, D. 1987. Immunity to *Eimeria separata* (Apicomplexa: Eimeriina): expose-and-challenge studies in rats. **J. Parasitol.**, **73**:342-344.
- MASUR, H.; GILL, V.J.; OGNIBENE, F.P.; SHELHAMER, J.; GODWIN, C. & KOVASCIS, J.A. 1988. Diagnosis of pneumocystis pneumonia by induced sputum technique in patients without the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann. Intern. Med.**, **109**:755-756.
- MATSUMOTO, Y. & YOSHIDA, Y. 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear structures observed in precysts. **J. Protozool.**, **31**:420-428.
- MATSUMOTO, Y. & YOSHIDA, Y. 1986. Advance in *Pneumocystis carinii* biology. **Parasitol. Today**, **2**:137-142.
- MATSUMOTO, Y.; MATSUDA, S. & TEGOSHI, T. 1989. Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. **J. Protozool.**, **36**:215S-225S.

- MATUBAYAS, H. 1938. Studies on parasitic protozoa in Japan. IV. Coccidia parasitic in wild rats (*Epimys rattus alexandrinus* and *E. norvegicus*). **Annot Zool. Japon**, 17:144-163.
- MATUSCHKA, F.R. 1985. *Caryospora telescopis* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the cot snake, *Telescopus fallax* (Serpent: Colubridae), and *Cariospora* sp. from the west caucasian viper, *Vipera Kaonakovi* (Serpentes: Viperidae). **Arch. Protistenkd.**, 132:93-99.
- MCALLISTER, C.T. & UPTON, S.J. 1990. Description of the oocysts of *Eimeria paludosa* (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Zulica americana* (Birds: Gruiformes), with comments on synonyms of eimerian species from related birds. **J. Parasitol.**, 76:27-29.
- MCALLISTER, C.T. & UPTON, S.J. 1992. A new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Pseudemys texana* (Testudines: Emydidae) from north-central Texas. **Texas J. Sci.**, 44:37-41.
- MCALLISTER, C.T.; UPTON, S.J. & GARRET, C.M. 1993. *Eimeria sternfeldi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Australian blue-tongued skink, *Tchiqua multizasciata* (Sauria: Scincidae). **J. Parasitol.**, 79:681-683.

- MCCLURE, H.M.; KEELIN, M.E.; CUSTER, R.P.; MARSHAK, R.R.; ABT, D.A. & FERRER, J.F. 1974. Erythroleukemia in two infant chimpanzees fed milk from cows naturally infected with bovine C - type virus. **Cancer Res.**, **34**:2745-2757.
- MEER, G. VAN DER & BRUG, S.L. 1942. Pneumocystis als parasiet by de mensch. **Ned. T. Geneesk.**, **26**:2066-2075.
- MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, C. & RUBIN, C.E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, **70**:1156-1160.
- MEUTEN, D.J.; KRUININGEN, H.J. VAN & LEIN, D.H. 1974. Cryptosporidiosis in a calf. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **165**:914-917.
- MIYAJI, M.; TANIKAWA, T. & SHIKATA, J. 1989. Prevalence of *Cryptosporidium* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus* in Japan. **Jpn. J. Parasitol.**, **38**:368-372.
- MOON, H.W. & BEMRICK, W.J. 1981. Fecal transmission of calf to pigs. **Vet. Pathol.**, **18**:248-255.

- MUSAEV, M.A. & ISMAILOV, S.C. 1988. Aspects of the development of species of *Eimeria* of birds in secondary hosts. **Parazitologiya**, **22**:282-292.
- NICHOLS, G.L.; MCLAUSHLIN, J. & SAMUEL, D. 1991. A technique for typing *Cryptosporidium* isolates. **J. Protozool.**, **38**(supl.):237S-240S.
- NIKOLSKIJ, S.N. & SÉETININ, A.N. 1967. Pnevmozystoz u sviněj. **Veterinaria**, **44**:65-66.
- NINA, J.M.S.; MCDONALD, V.; DEER, R.M.A.; WRIGHT, S.E.; DYSON, D.A.; CHIODINI, P.L. & McADAM, K.P.W.J. 1992. Comparative study of the antigenic composition of oocyst isolates of *Cryptosporidium parvum* from different hosts. **Parasite Immunol.**, **14**:227-232.
- NORTON, C.C. & JOYNER, L.P. 1981. *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life cycle and ability to develop in the chicken embryo. **Parasitology**, **83**:269-279.
- O'DONOGHUE, P.J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Intern. J. Parasitol.**, **25**:139-195.

- OHIRA, T. 1912. Ein beitrag zur coccidiumforschung. Ueber ein bei *Ratten* *gefunden*es coccidium (*Eimeria miyairii*). **Mitt. Med. Gesell. Tokio**, **26**:1045-1055.
- PALLUAUT, F.; PIETRZYK, B.; DEI-CAS, E.; & CAMUS, D. 1991. 3-D reconstruction in parasitology. **Parasitol. Today**, **7**:125-217.
- PALLUAUT, F.; SLOMIANNY, C.; SOULEZ, B.; DEI-CAS, E. & CAMUS, D. 1992. High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embbeding. **Parasitol. Res.**, **78**:437-444.
- PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W. & GARNER, F.M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. **Vet. Pathol.**, **8**:479-484.
- PAUL, V.K.; GHOSH, S. & HALDAR, D.P. 1991. Three new species of *Isospora* (Apicomplexa: Sporozoa) from the birds of est Bengal. **Envir. Ecol.**, **9**:128-134.
- PAVLÁSEK, I. 1984. First record of developmental stages of *Cryptosporidium* sp. in various stages of experimentally infected mice and spontaneously infected calves. **Folia Parasitol.**, **31**:191-192.

PÉRARD, C. 1926. Sur la coccidiose du rat. **Rec. Med. Vet. Bull. Mem. Soc. Centr. Med. Vet.**, **102**:120-124.

PEREIRA, M.J.S. 1987. **Aspectos biomorfológicos de *Hammondia heydornii* (Tadros & Laarman, 1976) Dubey, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae)**. Tese de Mestrado, UFRRJ, Itaguaí, 83 p.

PIFER, L.L. 1984. *Pneumocystis carinii*: A misunderstood opportunist. **Europ. J. Clin. Microbiol.**, **3**:169-173.

PIFER, L.L. & HUGHES, W.T. 1977. Propagation of *Pneumocystis carinii* in vitro. **Pediatr. Res.**, **11**:305.

PIFER, L.L.; HUGHES, W.T.; STAGNO, S. & WOODS, D. 1978. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. **Pediatrics**, **61**:35.

PINTO, C. 1928. *Eimeria carinii* nova espécie. Parasita de *Mus (E.) norvegicus* do Brasil. **Bol. Biol. Lab. Parasit.**, **1**:127-128.

- POELMA, F.G. 1975. *Pneumocystis carinii* infections in Zoo animals. **Z. Parasitenkd**, **46**:61-68.
- POHJOLA, S. & LINDBERG, L.A. 1986. Experimental cryptosporidiosis in mice, calves and chicken. **Acta Vet. Scand.**, **27**:80-90.
- POHJOLA, S.; JOKIPII, A.M.M. & JOKIPII, L. 1986b. Sporadic cryptosporidiosis in a rural population is asymptomatic and associated, with contact to cattle. **Acta Vet. Scand.**, **27**:91-102.
- POHJOLA, S.; NEUVONEN, E.; NISKANEN, A. & RANTAMA, A. 1986a. Rapid immunoassay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. **Acta Vet. Scand.**, **27**:71-79.
- POHJOLA, S.; OKSANEN, H; JOKIPII & JOKIPII, A.M.M. 1986c. Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. **Scand. J. Infec. Dis.**, **18**: 173-178.
- PORTER, A. 1915. The occurrence of *Pneumcystis carinii* in mice in England. **Parasitology**, **8**:255-259.
- POUT, D.D. 1965. Coccidiosis in lambs. **Vet. Rec.**, **77**:887-888.

- PRICE, R.A. & HUGHES, W.T. 1974. Histopathology of *Pneumocystis carinii* and infection in malignant disease in childhood. **Hum. Pathol.**, 5:737-752.
- REDUKER, D.W.; DUSZYNSKI, D.W. & YATES, T.L. 1987. Evolutionary relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa) infecting cricetid rodents. **Can. J. Zool.**, 65:722-735.
- REDUKER, D.W.; HERTEL, L. & DUSZYNSKI, D.W. 1985a. *Eimeria* species (Apicomplexa: Eimeriidae) infecting *Peromyscus* rodents in South Western United States and Northern Mexico with description of a new species. **J. Parasitol.**, 71(5):604-613.
- REDUKER, D.W.; HERTEL, L. & DUSZYNSKI, D.W. 1985b. *Eimeria* species (Apicomplexa: Eimeriidae) from the northern bobwhete, *Colinus virginianus* (L.). **J. Wild. Dis.**, 21:361-370.
- REESE, N.C.; CURRENT, W.L.; ERNEST, J.V. & BAILEY, W.S. 1982. Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 31:226-229.

- RICHARDSON, A.J.; FRANKENBERG, R.A.; BUCK, A.C.; SELKON, J.B.; COLBOURNE, J.S.; PARSONS, J.W. & MAYON-WHITE, R.T. 1991. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. **Epidemiol. Infect.**, **107**:485-495.
- ROLLISON, D. 1975. Electrophoretic variation on species of *Eimeria* of enzymes in chicken coccidia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **69**:436-437.
- ROSE, M.E. & LONG, P.L. 1970. Resistance to *Eimeria* infection in the chicken; the effects of thymectomy, bursectomy, whole body irradiation and cortisone treatment. **Parasitology**, **60**:291-299.
- ROSENBLATT, J.E. & SLOAN, L.M. 1993. Evolution of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **31**:1468-1471.
- ROSSI, P.; POZIO, E.; BESSE, M.G.; GOMEZ MORALES, M.A. & LA ROSA, G. 1990. Experimental cryptosporidiosis in hamsters. **J. Clin. Microbiol.**, **28**:356-357.

- RUFFOLO, J.; CUSHION, M. & WALZER, P. 1989. Ultrastructural observations on life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. **J. Protozool.**, **36**:535-545.
- RUSKIN, J. 1976. *Pneumocystis carinii*. In: REMMINGTON & KLEIN. **Infectious diseases of fetus an the Newborn infant**. London: Saunders, Chap. 16:701.
- SCHAEFER, R.L. & ANDERSON, R.B. 1989. **The Student Edition of Minitab Addison-Wesley**. Pub. Co. Inc., 365 p.
- SCHINELLA, R.A.; BREDI, S.D. & HAMMERSCHLAG, P.E. 1987. Otic infection due to *Pneumocystis carinii* in an apparently healthy man with antibody to the human immunodeficiency virus. **Ann. Intern. Med.**, **106**:399-400.
- SETTNES, O.P.; ELVESTAD, K. & CLAUSEN, B. 1986. *Pneumocystis carinii* Delanoë & Delanoë, 1912 found in lungs of freeliving animals in Denmark at autopsy. **Nord. Vet.-Med.**, **38**:11-15.
- SETTNES, O.P. & HENRIKSEN, S.A. 1989. *Pneumocystis carinii* in large domestic animals in Denmark. A preliminary report. **Acta Vet. Scand.**, **30**:437-440.
- SETTNES, O.P. & LODAL, J. 1980. Prevalence of *Pneumocysts carinii* Delanöe & Delanöe, 1912 in Rodents in Denmark. **Nord. Vet. Med.**, **32**:17-27.

- SHEWOOD, D.; ANGUS, K.W.; SNODGRASS, D.R. & TIZIPORI, S. 1982. Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. **Infect. Immun.**, **38**:471-475.
- SHIRLEY, M.W. 1975. Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. **Parasitology**, **71**:369-376.
- SHIRLEY, M.W. 1994. Novas armas que podem ser usadas para estudos sobre a epizootiologia da *Eimeria* spp. In: **Simpósio Internacional sobre Coccidiose Epizootiologia**, Santos, SP, Brasil, p. 18-21.
- SHIVELY, J.N.; DELLERS, R.W.; BUERGELT, C.D.; HSU, F.S.; KABELAC, L.P.; MOE, K.K.; TENNANT, B. & VAUGHAN, J.T. 1973. *Pneumocystis carinii* pneumonia in two foals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **162**:648-652.
- SINGER, C.; ARMSTRONG, D.; ROSEN, P.P. & SCHOTTENFELD, D. 1975. *Pneumocystis carinii* pneumonia: A cluster of eleven cases. **Ann. Intern. Med.**, **82**:772-777.
- SLAVIN, D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **J. Comp. Pathol. Therap.**, **65**:262-266.

- SMULIAN, G. & WALZER, P.D. 1992. The biology of *Pneumocystis carinii*. **Critical Rev. Microbiol.**, **18**:191-216.
- SNYDER, S.P.; ENGLAND, J.J. & McCHESNEY, A.E. 1978. Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. **Vet. Pathol.**, **15**:12-17.
- SORVILLO, F.J.; FUJIOKA, K.; NAHLEN, B.; TORMEY, M.P.; KEBABJIAN, R. & MASCOLA, L. 1992. Swimming-associated cryptosporidiosis. **Am. J. Pub. Health**, **82**:742-744.
- SOUZA, J.C.P. de & LOPES, C.W.G. 1995. Criptosporidiose em bezerros de rebanhos na baia leiteira sul-fluminense, Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, **4**:33-36.
- STEHR-GREEN, J.K.; McCAIG, L.; REMSEN, H.M.; RAINS, C.S.; FOX, M. & JURANEK, D.D. 1987. Shedding of oocysts in immunocompetent individuals infected with *Cryptosporidium*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **36**:338-334.
- STIBBS, H.H. & ONGERTH, J.E. 1986. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. **J. Clin. Microbiol.**, **24**:517-521.

STRINGER, S.; STRINGER, J.; BLASE, M.; WALZER, P. & CUSHION, M. 1989.

Pneumocystis carinii, sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. **Exp. Parasitol.**, **68**:450-461.

TAKEUCHI, S. 1980. Electron microscopic observation of *Pneumocystis carinii*. **Jpn.**

J. Parasit., **29**:427-453.

TILLEY, M.; FAYER, R.; GUIDRY, A.; UPTON, S.J. & BLAGBURN, B.L. 1990.

Cryptosporidium parvum (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) oocyst and sporozoite antigens recognized by bovine colostrum antibodies. **Infect. Immun.**, **58**:2966-2971.

TOTH, G.; BALOGH, E. & BELAY, M. 1966. Tracheal smear in pentamidine-treated

plasma - cell pneumonia. **Acta Paediatr. Acad. Sci. Hung.**, **7**:339.

TZIPORI, S. 1983. Cryptosporidiosis in animal and humans. **Microbiol. Rev.**, **47**:84-

88.

- TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; CAMPBELL, I. & CLERIHEW, L.W. 1981. Diarrhea due to *Cryptosporidium* infection in artificially reared lambs. **J. Clin. Microbiol.**, **14**:100-105.
- TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; CAMPBELL, I. & GRAY, E.W. 1980a. *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. **Infect. Immun.**, **30**:884-886.
- TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; GRAY, E.W. & CAMPBELL, I. 1980b. Vomiting and diarrhea associated with cryptosporidial infection. **New Engl. J. Med.**, **303**:818.
- TZIPORI, S.; SMITH, M.; HALPIN, C.; ANGUS, K.W.; SHERWOOD, D. & CAMPBELL, I. 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. **Vet. Rec.**, **112**:116-120.
- TYZZER, E.E. 1907. A protozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **5**:12-13.
- TYZZER, E.E. 1910. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* of the gastric glands of the common mouse. **J. Med. Res.**, **23**:487-509.

- TYZZER, E.E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Arch. Protistenkd**, **26**:394-412.
- TYZZER, E.E. 1929. Coccidiosis in gallnaceous birds. **Am. J. Hyg.**, **15**:269-383.
- UNGAR, B.L.P.; WARD, D.J.; FAYER, R. & QUINN, C.A. 1990. Cessation of *Cryptosporidium* - associated diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient after treatment with hyperimmune bovine colostrum. **Gastroenterology**, **98**:486-491.
- UPTON, S.J. & CURRENT, W.L. 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. **J. Parasitol.**, **71**:625-629.
- UPTON, S.H.; CAMPBELL, T.W.; WEIGEL, M. & McKOUN, R.D. 1990. The Eimeridae (Apicomplexa) of raptores: review of the literature and description of new species of the genera *Caryospora* and *Eimeria*. **Can. J. Zool.**, **88**:1256-1265.
- UPTON, S.J.; PITTS, R.M.; McALLISTER, C.T. & HOLLANGER, R.R. 1992. New lost records for *Eimeria geomydis* Skidmore, 1929, from *Gromys* (Rodentia:

Geomyidae) and redescription of the oocysts from *Geomys crursarius*. **Texas J. Sci.**, **44**:95-98.

VANÉK, J. 1951. Atypical interstitial pneumonia of infants by *Pneumocystis carinii*. **Cas. Lek. Cesk.**, **90**:1121.

VANÉK, J. & JIROVEC, O. 1952. Parasitäre pneumonie interstitielle "Plasmazellen-pneumonie der Frühgeborenen, verursacht durch *Pneumocystis carinii*. **Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.**, **158**:120-127.

VAVRA, J. & KUCERA, K. 1970. *Pneumocystis carinii* Delanöe: its ultrastructure and ultrastructural affinities. **J. Protozool.**, **17**:463-483.

YAMAURA, H.; SHIRASAK, R.; ASAH, H.; KOYAMA, T.; MOTOKI, M. & ITO, H. 1990. Prevalence of *Cryptosporidium* infection among house rats, *Rattus rattus* and *R. norvegicus* in Tokyo, Japan and experimental cryptosporidiosis in roof rats. **J. Parasitol.**, **35**:439-444.

YOSHIDA, Y. & IKAI, T. 1979. *Pneumocystis carinii* pneumonia: epidemiology in Japan and cyst concentration method. **Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.**, **244**:405-410.

- YOSHIKAWA, H.; MORIOLA, H. & YOSHIDA, Y. 1987. Freeze fracture localization of filipensterol complexes in plasma and cyto-membranes of *Pneumocystis carinii*. **J. Protozool.**, **34**:131.
- YOSHIKAWA, H. & YOSHIDA, Y. 1987. Freeze fracture studies on *Pneumocystis carinii*. III. Fine structure of the precyst and cyst. **Parasitol. Res.**, **74**:36-42.
- WALZER, P.D.; POWELL Jr., R.D. & YONEDA, K. 1979. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in different strains of cortisonized mice. **Infect. Immun.**, **24**:939-947.
- WATANABE, J.; HORI, H.; TANABE, K. & NAKAMURA, Y. 1989. Phylogenetic association of *Pneumocystis carinii* with the “Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group” indicated by the 5S ribosomal RNA sequences. **Mol. Biol. Parasitol.**, **32**:163-168.
- WAXLER, S.H. 1941. Immunization against cecal coccidiosis in chickens by the use of X-ray attenuated oocysts. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **99**:481-485.

- WEBER, R.; BRYAN, R.T. & JURANEK, D.D. 1992. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **30**:2869-2873.
- WELLER, R. 1955. Zur erzeugung von pneumocystosen im tierversuch. **Z. Kinderheilkd**, **76**:336.
- WILLSON, P.J. & ACRES, S.D.A. 1982. Comparation of dichromate solution flotation and fecal semears for diagnosis of cryptosporidiosis in calves. **Can. Vet. J.**, **23**:240-246.
- WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, **51**:221.