

Abraão Garcia Gomes

SARCOCYSTIS (LANKESTER, 1882) EM BOVINOS DO ESTADO DE MI-
NAS GERAIS. OCORRÊNCIA, MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E INFECÇÃO
EXPERIMENTAL DE BEZERROS E CÃES COM SARCOCYSTIS
CRUZI (HASSELMANN, 1926)

Tese apresentada à Escola de Veteri-
nária da Universidade Federal de Mi-
nas Gerais, como parte dos requisi-
tos para obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventi-
va

Belo Horizonte
Minas Gerais
1981

Gomes, Abraão Garcia

065p

Sarcocystis (Lankester, 1882) em bovinos do Estado de Minas Gerais. Ocorrência, métodos de diagnóstico e infecção experimental de bezerros e cães com *Sarcocystis cruzi* (Hasselmann, 1926). Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. 1981.

XII + 52p. ilustr.

Tese de Mestrado.

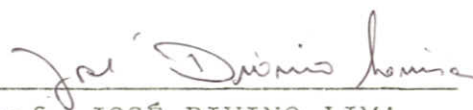
Bibliografia

1. *Sarcocystis*. Bovinos - Minas Gerais.
2. *Sarcocystis cruzi* - cães.
3. *Sarcocystis cruzi* - bezerros. I.

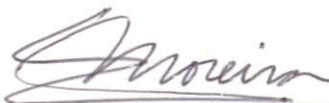
Título

CDU. 636.2:591.69 (815.1)

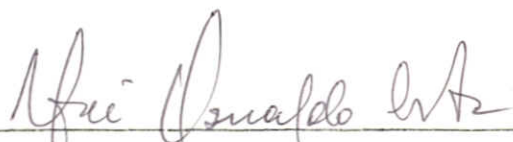
APROVADA EM 26/08/1981



Prof. JOSÉ DIVINO LIMA
- Orientador -



Prof. ÉLVIO CARLOS MOREIRA



Prof. JOSÉ OSWALDO COSTA

Pelo estímulo e entusiasmo
recebidos, dedico este tra-
balho à Eliane e ao Ricardo.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA (FEP-MVP), EPAMIG, CPq-UFMG e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. JOSÉ DIVINO LIMA, pela indispensável orientação.

Ao Prof. JOSÉ OSWALDO COSTA, pela colaboração prestada.

Aos Profs. ANTONIO DE PINHO MARQUES JÚNIOR, ROSA MARIA VIEIRA, WAGNER LUIS DOS SANTOS MOREIRA e EVALDO NASCIMENTO, pelo inestimável auxílio.

Aos funcionários DÁRIO DIAS, CARLOS ALBERTO DE OLIVEIRA e JOAQUIM REIS, pela valiosa colaboração.

A todos os colegas e professores do Curso de Pós-Graduação, pelo convívio e conhecimentos transmitidos.

Finalmente, mas de modo especial, à EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS (EPAMIG), que através de sua direção, estimulou-me, dando-me a oportunidade para que pudesse fazer o Curso de Pós-Graduação.

Enfim, a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

A frequência de *Sarcocystis* em 168 bovinos no Estado de Minas Gerais foi determinada através de exames a fresco, após a escarificação da parede do esôfago, da técnica histológica clássica e da técnica de digestão pela pepsina. Estas técnicas revelaram uma positividade de 58,4%, 79,4% e 95,8%, respectivamente. O esôfago foi o órgão mais regularmente infectado.

A infecção verificada foi multiespecífica. Entre 124 animais positivos, *S. cruzi* estava presente em 83 (66,9%), *S. hirsuta* em 10 (8,0%) e *S. hominis* em quatro animais (3,6%). Infecções mistas foram também observadas com predominância da combinação *S. cruzi/S. hirsuta* (21,4%).

Sete cães de diferentes idades foram utilizados para a infecção experimental com músculo de bovinos contendo *Sarcocystis* sp. Um cão recebeu numa única vez músculo de bovino infectado, enquanto os outros animais receberam por cinco dias consecutivos. Os animais eliminaram esporocistos, nas suas fezes, a partir do 10º dia após a infecção. O período de patência observado foi de 61 dias na infecção única e de 76 e 90 dias na infecção múltipla. Durante este período os cães não eliminaram es-

porocistos diariamente. O pique de eliminação ocorreu nos dias 24 e 25 após inoculação. As características morfológicas e dimensionais ($\bar{x} = 14,8 \times 10,5 \mu\text{m}$), permitiram identificação dos esporocistos como de *S. cruzi*.

Quatro dos bezerros com um ano de idade, inoculados com 2×10^5 e dois com 5×10^5 esporocistos de *S. cruzi*, não apresentaram sinais clínicos durante o período experimental. Ao exame histológico, as lesões produzidas foram inconstantes, não específicas, pouco extensas e de evolução subaguda.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. LITERATURA CONSULTADA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
4. RESULTADOS	18
4.1. Prevalência de <i>Sarcocystis</i> em músculos de bovinos	18
4.2. Identificação das espécies de <i>Sarcocystis</i>	18
4.3. Infecção experimental em cães	19
4.4. Infecção experimental em be- zerros	20
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DAS TABELAS

	<u>Página</u>
TABELA I - Frequência de <i>Sarcocystis</i> sp. em bovinos do Estado de Minas Gerais, abatidos no FRIMISA e Escola de Veterinária da UFMG, 1980	23
TABELA II - Distribuição das espécies de <i>Sarcocystis</i> sp. em bovinos do Estado de Minas Gerais	24
TABELA III - Hemograma do bezerro 518 inoculado experimentalmente, por via oral, com 5×10^5 esporocistos de <i>S. cruzi</i>	25
TABELA IV - Hemograma do bezerro 519 inoculado experimentalmente, por via oral, com 5×10^5 esporocistos de <i>S. cruzi</i>	26
TABELA V - Hemograma do bezerro 531 inoculado experimentalmente, por via oral, com 2×10^5 esporocistos de <i>S. cruzi</i>	27

	<u>Página</u>
TABELA VI - Hemograma do bezerro 547 inocu - lado experimentalmente, por via oral, com 2×10^5 esporocistos de <i>S. cruzi</i>	28
TABELA VII - Hemograma do bezerro 548 - Con- trole	29
TABELA VIII - Níveis séricos de desidrogenase glutâmica (DG) em bezerro con- trole e em bezerros inoculados com esporocistos de <i>S. cruzi</i>	30

LISTA DOS GRÁFICOS

	<u>Página</u>
GRÁFICO 1 - Volume globular (%) do animal controle e dos animais inoculados com <i>S. cruzi</i>	31
GRÁFICO 2 - Hemoglobina (g%) do animal controle e dos animais inoculados com <i>S. cruzi</i>	32
GRÁFICO 3 - Hemácias (milhões/mm ³) do animal controle e dos animais inoculados com <i>S. cruzi</i>	33
GRÁFICO 4 - Níveis séricos de desidrogenase glutâmica em bezerros controle e em bezerros inoculados com esporocistos de <i>S. cruzi</i>	34

LISTA DAS FIGURAS

	<u>Página</u>
FIGURA 1 - Diafragma de bovino contendo cisto de <i>S. cruzi</i> . H.E. 640x	36
FIGURA 2 - Diafragma de bovino contendo cisto de <i>S. hirsuta</i> . H.E. 640 x.	36
FIGURA 3 - Diafragma de bovino contendo cisto de <i>S. hominis</i> . H.E. 640 x	36
FIGURA 4 - Diafragma de bovino contendo- cisto de <i>S. hominis</i> . H.E. 640 x	36
FIGURA 5 - Esporocistos de <i>S. cruzi</i> . 1100 x	38
FIGURA 6 - Esôfago de bovino contendo cistos de <i>S. cruzi</i> . H.E. 192 x	38
FIGURA 7 - Língua de bovino contendo in- filtração de células inflama- tórias. H.E. 640 x.	38

1. INTRODUÇÃO

O amplo campo de investigação dos sarcosporídeos surgiu com a descrição, pela primeira vez, por MIESHER (1843), de cistos musculares em camundongo. LANKESTER (1882) denominou este gênero de *Sarcocystis*. Os membros do gênero são coccídios, pertencem ao Phylum Apicomplexa, estando colocados na família Sarcocystidae (LEVINE, 1977).

O bovino é hospedeiro intermediário de três espécies diferentes de sarcosporídeos, para os quais caninos, felinos e primatas são os hospedeiros definitivos, sendo denominados, respectivamente, *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis* (LEVINE, 1977).

Os hospedeiros definitivos eliminam com suas fezes oocistos esporulados ou, na maioria das vezes, esporocistos, que são formas muito resistentes, frente às influências ambientais, e são capazes de infectar bovinos que os ingerem com alimentos contaminados. Em um período de três a quatro semanas ocorrem três merogonias, no endotélio dos vasos sanguíneos do fígado, pulmão, rim, baço e outros órgãos. Os merozoítos alcançam a musculatura por via hematôgena, onde formam cistos capsulados, nos quais em primeiro lugar, por endodiogenia, originam

os metrócitos, que são formas não infecciosas, e dão origem aos merozoítos ou bradizoítos, que são infectantes para o hospedeiro definitivo. Após a ingestão de carne bovina crua pelos hospedeiros definitivos, os bradizoítos são liberados no duodeno e desenvolvem-se na lâmina própria do intestino delgado em micro e macrogametas (células sexuadas masculina e feminina) que após fertilização dão origem aos oocistos. Ao contrário do que ocorre em outros coccídios formadores de cistos, a esporogonia (esporulação de oocistos) ocorre no hospedeiro definitivo, de modo que saem eliminados com as fezes os oocistos esporulados ou mais frequentemente, os esporocistos (DUBEY, 1976).

As espécies de *Sarcocystis* do homem (*S. hominis*) e do gato (*S. hirsuta*) são pouco patogênicas e praticamente não provocam sinais clínicos nos bovinos. A espécie canina (*S. cruzi*) provoca em bovinos doença severa, caracterizada por anemia, anorexia, caquexia e morte em bezerras e abortos em vacas gestantes. As lesões mais pronunciadas ocorrem entre 26 e 33 dias após infecção. À necrópsia, os animais apresentam linfadenopatia, palidez das mucosas e órgãos viscerais, ascite, hidrotórax, hidropericárdio e atrofia serosa das gorduras. Ocorre hemorragia petequiral no coração, cérebro, serosas do trato alimentar e urinário. As lesões microscópicas observadas consistem de hemorragia, infiltração de linfócitos, edema no coração, no fígado, no pulmão, nos rins e nos músculos estriados (CORNER et alii, 1963; JOHNSON et alii, 1975; FAYER et alii, 1976; MEADS, 1976; FRELIER et alii, 1979).

As pesquisas realizadas até o momento sobre a frequência de sarcosporídeos em bovinos foram feitas utilizando o triquinoscópio ou métodos histológicos, resultando em consideráveis faixas de variação. Estudos conduzidos na Áustria, Estados Unidos, Brasil e Alemanha,

mostraram uma prevalência de 60 a 100% de bovinos infectados com *S. cruzi* (KALLAB, 1966; LEVINE, 1973; OGASSAWARA et alii, 1978). Os trabalhos realizados no Brasil se referem exclusivamente à frequência de *Sarcocystis* através de pesquisas de esporocistos em fezes de cães alimentados com coração de bovino (OGASSAWARA et alii, 1977, 1978).

Devido à existência de poucas pesquisas no Brasil sobre *Sarcocystis* e, como mencionado anteriormente, em vários países a sarcocistose tem provocado inúmeras perdas econômicas, através de condenação de carcaças, mortes e abortos, o presente trabalho teve por objetivo:

- 1) identificar as espécies de *Sarcocystis* presentes em bovinos, no Estado de Minas Gerais;
- 2) determinar a frequência de *Sarcocystis* no Estado de Minas Gerais;
- 3) avaliar a patogenicidade das amostras de *Sarcocystis* isoladas em matadouros, através de inoculação de cães e bezerros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Frequência de *Sarcocystis* sp.

KALLAB (1966), na Áustria, com o auxílio do triquinoscópio, encontrou 67% dos bovinos, infectados com *Sarcocystis* sp., o maior percentual de positivos situou-se entre os bovinos com idade superior a dois anos.

GARRO et alii (1971), na Espanha, examinando fragmentos de diafragma de 150 bovinos, após a digestão péptica, observaram bradizoítos de *Sarcocystis* sp. em 145 (96,6%) animais.

LEVINE (19673) relatou uma prevalência de 75% de *Sarcocystis* sp. em bovinos, nos Estados Unidos.

KRUIJF et alii (1974), pesquisando a prevalência de *Sarcocystis* em bovinos na Holanda, examinaram através de cortes histológicos, fragmentos de coração de 300 animais, encontrando 93,3% infectados.

MUNDAY (1975) estudou na Austrália a prevalência de cistos de *Sarcocystis* sp. em bovinos abatidos para consumo, encontrando-os presentes em 50% dos animais examinados. Com o auxílio da técnica de fixação de complemento verificou a presença de anticorpos anti-*Sarcocystis* em 90% deles. Concluiu o autor que a baixa incidência de cistos em animais de matadouros deveu-se à não seleção

dos tecidos e do pequeno número de secções examinadas.

BOCH et alii (1978), estudando a prevalência de *Sarcocystis* na Alemanha, examinaram após a digestão péptica, fragmentos de faringe de 1.020 bovinos, encontrando a presença de *Sarcocystis* sp. em 1.007 (99,7%) animais. Comparando os resultados dos fragmentos de órgãos dos primeiros 305 animais examinados, os autores encontraram uma incidência de 99,7% de *Sarcocystis* sp. no músculo da faringe, 93,5% na musculatura sublingual e 92,5% no diafragma. Costos foram observados em 817 dos 1.007 bovinos positivos. A identificação específica dos cistos revelaram que *S. bovicanis* estavam presentes em 531 (56,6%) animais, *S. bovisfelis* em 252 (34,5%) e *S. bovi hominis* em 520 (63,6%). Infecções mistas também foram verificadas com a predominância da combinação *S. bovicanis* / *S. bovi hominis*.

FASSI-FEHRI et alii (1978), estudando a frequência de *Sarcocystis* em bovinos e ovinos em Marrocos, utilizando das técnicas de digestão péptica e cortes histológicos, encontraram 100% dos animais infectados. Dentre os órgãos examinados, o esôfago foi mais atingido e as lesões musculares observadas foram inconstantes, não específicas, pouco extensas e de evolução subaguda.

OGASSAWARA et alii (1980), examinando fezes de 100 gatos, de distintas raças, idades, de ambos os sexos e de diferentes áreas da cidade de São Paulo, encontraram 9% de animais positivos para *Sarcocystis* sp. As dimensões dos esporocistos eram de 8,5-9,4 x 11,7 - 14,8 μm (\bar{x} = 9,4 x 13,5 μm).

PEREIRA JUNIOR & BITENCOURT (1981), realizando 10.475 exames de fezes, no Rio de Janeiro, utilizando os métodos de Kato-Katz, Hoffman-Pons Janer e exame direto após agitação (MA), encontraram 392 (3,74%) positivos para *Sarcocystis hominis*.

2.2. Infecção experimental de cães com esporocistos de *S. cruzi*

HEYDORN & ROMMEL (1972), na Alemanha, realizando estudos com *S. fusiformis*, infectaram 12 cães com esôfago de bovino naturalmente infectado. Os cães começaram a eliminar esporocistos nas fezes no 9º e 10º dias após infecção. Os animais eliminaram esporocistos em um período de oito a 10 semanas. Reinoculando estes cães, os autores observaram um período de prepatência e patência semelhante aos citados anteriormente. As dimensões máximas, mínimas e médias de 50 esporocistos eram de 13,9-17,0 x 6,2-10,8 μm , (\bar{x} = 15,9 x 8,3 μm):

FAYER (1974), estudando o desenvolvimento de esporocistos de *S. fusiformis* em cães, infectou 39 animais. O período de patência verificado variou de 13 a 22 dias. Estes cães, após paralisarem a eliminação de esporocistos, foram reinfectados, voltando novamente a eliminar estes parasitas, nove a 11 dias após. A média de 20 esporocistos alcançou 15,7 x 9,9 μm .

FAYER (1977), completando seus estudos sobre *Sarcocystis* em cães, administrou em 21 animais livres de coccídios, carne bovina infectada com *S. cruzi*. O período prepatente observado variou de nove a 33 dias. Durante este período, a eliminação de esporocistos foi intermitente, alcançando um total de três a 40 dias. O maior número de esporocistos era eliminado entre os dias 15 e 30, com o pique ocorrendo nos dias 23 e 24. Nos dias de pique a média alcançou 145.000 a 408.400 esporocistos por animal. O número médio de esporocistos eliminados pelos cães administrados com 454 a 908 g de carne variou de 861.000 para mais de 20 milhões.

OGASSAWARA et alii (1978), examinando corações de bovinos colhidos em matadouros e feiras livres da cidade de São Paulo (Brasil), encontraram 100% dos órgãos

infectados com *Sarcocystis* sp. Administrando esses órgãos a cães livres de coccídios, observaram o aparecimento de esporocistos nas fezes a partir do décimo dia após a infecção. O período patente na infecção única alcançou 59 dias, enquanto que nas múltiplas este período foi de 73 e 89 dias. Os autores concluíram, levando em consideração o tamanho e a morfologia dos esporocistos, que estes pertenciam à espécie *S. cruzi* (*S. fusiformis*).

2.3. Infecção natural de bovinos com *S. cruzi*

CORNER et alii (1963), no Canadá, foram os primeiros autores a diagnosticarem surtos naturais de sarcosporidiose em bovino. Esta doença, denominada de "Dalmeny Disease", caracterizou-se clinicamente por febre, emaciação, anemia, aborto e alta mortalidade em bovino adulto. Quatro animais em estado agônico foram sacrificados e observou-se hemorragia petequial no tecido subcutâneo, pleura, linfonodos, glândula mamária, laringe, traquéia, pulmão, miocárdio, tireóide, baço, rins, esôfago, vagina, cervix e superfícies mucosas do trato intestinal, trato urinário e útero. Embora não chegassem ao diagnóstico específico do agente, resultados laboratoriais indicaram que esta enfermidade estava associada a parasitas morfologicamente semelhantes ao *Toxoplasma*. Posteriormente os autores concluíram que estes parasitas eram *Sarcocystis* sp.

SCHMITZ & WOLF (1977) descreveram a morte de dois bezerros provocadas por *Sarcocystis* sp. nos Estados Unidos. Necropsiando esses animais, encontraram grande quantidade de líquido na cavidade pleural e peritoneal. Exames microscópicos mostraram uma densa infiltração de linfócitos no córtex renal, extensa congestão centrolobular no fígado com degeneração e necrose dos hepatócitos e pneumonia intersticial difusa. Concluíram os autores, que a morte súbita desses animais correspondeu com a fase de

esquizontes maduros nos tecidos, e embora não conhecendo o modo de infecção dos bezerros, o mais provável, seria a ingestão de material contaminado com fezes contendo esporocistos de *Sarcocystis* sp.

CLEGG (1978), na Inglaterra, relatou a ocorrência da morte de três bezerros, devido à sarcosporidiose. A confirmação do diagnóstico foi possível, pela presença de grande quantidade de esquizonte e metrócitos de *S. cruzi* no fígado, língua e pleura. Necropsiando esses animais, o autor encontrou uma pleurite generalizada envolvendo toda a superfície dos dois pulmões, linfonodos mesentéricos hipertrofiados, miocardite, miosite e lesões vasculares.

FRELIER et alii (1979) descreveram um surto de sarcosporidiose, causando morte em novilhas de um rebanho leiteiro nos Estados Unidos. Os sintomas clínicos foram caracterizados por caquexia, hipertrofia dos linfonodos periféricos e anemia. Enzimas do soro e anticorpos anti-*Sarcocystis* encontravam-se aumentados. Diferentes estágios de desenvolvimento de *S. cruzi* foram encontrados nos tecidos dos animais necropsiados. Os bovinos apresentavam esquizontes no endotélio vascular, infiltração de células mononucleares, trombos de fibrina nos capilares alveolares e necrose multifocal. Alguns animais desenvolveram cistos jovens de *S. cruzi* nas miofibrilas dos músculos cardíaco e esquelético, com conseqüente miosite degenerativa multifocal.

GILES et alii (1980) diagnosticaram sarcosporidiose em 41 bezerros de 18 meses de idade nos Estados Unidos. Os sinais clínicos observados foram anorexia, perda de peso, distúrbios nervosos, hipersalivação e queda de pêlos nas extremidades. Os achados macroscópicos, à necrópsia, incluíam linfadenopatia, erosões da cavidade oral e esofágica e severa laminite. Cistos jovens de *Sarcocystis* sp. foram observados através de microscopia óptica no coração, músculos esqueléticos e cérebro. Os animais infec-

tados tinham de moderada a severa miocardite não supurativa, miosite com degeneração focal das miofibrilas e infiltração de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas.

2.4. Infecção experimental de bovinos com *S. cruzi*

GESTRICH et alii (1975), no intuito de estudar a morfologia dos cistos e a patogenicidade de três espécies de *Sarcocystis*, das quais o bovino é hospedeiro intermediário, inocularam 21 animais com dois milhões de esporocistos eliminados por cão, gato e homem. Os bezerros inoculados com esporocistos do homem e do gato, sobreviveram sem apresentar nenhuma sintomatologia clínica, enquanto que todos os bezerros infectados com dois milhões de esporocistos de cão morreram. Quanto à morfologia dos cistos, os autores encontraram nítida diferença na espessura da parede. No cisto de *Sarcocystis* humano ela mediu 5,4-6,9 ($\bar{x} = 5,9 \pm 0,4$) μm , do gato 3,8-5,4 ($\bar{x} = 4,7 \pm 0,4$) μm , e do cão 0,5 μm .

JOHNSON et alii (1975), estudando a patogenicidade de *S. fusiformis* em bovinos, inocularam 18 bezerros de oito a 45 semanas de idade, com uma suspensão aquosa contendo de 200.000 a 1.000.000 esporocistos. Cinco animais morreram e 13 foram sacrificados após o desenvolvimento de sinais de infecção. Todos os animais foram necropsiados e as lesões mais severas foram encontradas entre os dias 26 a 33 após a infecção. Os cistos estavam presentes nos músculos esqueléticos entre os dias 33 e 54. Os exames macroscópicos mostraram linfadenopatia, palidez das mucosas, ascite, hidrotórax, hidropericárdio e atrofia serosa das gorduras. Hemorragia petequial ou equimose estava presente no coração, cérebro e serosa do trato urinário e alimentar. Lesões microscópicas observadas em todos os animais constituiu de hemorragia, infiltração de células mononucleares, edema no coração, cérebro, fígado, pul-

mão, rim e músculo estriado. Miocardite necrosante com calcificação distrófica dos músculos estriados, assim como inflamação não supurativa das meninges foram observadas em alguns animais

MAHRT & FAYER (1975), com a finalidade de determinar as variações hematológicas e os níveis de enzima do soro, durante a fase aguda da sarcosporidiose bovina, inocularam 220.000 esporocistos de *S. fusiformis* em três bezerros de sete semanas de idade. Após a terceira semana de infecção, os animais mostraram sinais de inapetência, fraqueza, anemia e perda de peso. O hematócrito e os níveis de hemoglobina estavam reduzidos, a contagem diferencial de leucócitos entre os grupos controle e o infectado estavam dentro dos limites normais. As enzimas desidrogenase láctica, transaminase glutâmica oxaloacética estavam aumentadas entre a quarta e quinta semanas após inoculação. Concluíram os autores que o aumento acentuado das enzimas reflete as extensas lesões dos tecidos, principalmente do miocárdio, observado à necrópsia e em exames macroscópicos.

FAYER et alii (1976), numa tentativa de avaliar a importância da infecção de *S. fusiformis* como causa de aborto, inocularam seis vacas no terço final da gestação, com $1,5 \times 10^5$ a 10^6 esporocistos. Todos os animais apresentaram sinais clínicos de infecção, incluindo tremores musculares, hipersalivação, diminuição da ingestão de alimentos, perda de peso, queda de pêlos, temperatura elevada, diminuição do número de hemácias e do hematócrito. Duas vacas abortaram em um período de 69 dias após inoculação. Um animal extremamente fraco foi necropsiado, sendo encontrado um feto normal em seu útero. Duas vacas não pariram e quando submetidas à necrópsia encontrou-se, no útero de uma delas, um esqueleto fetal. O sexto animal pariu um bezerro normal. Nenhuma evidência de transmissão congênita de *S. fusiformis* foi encontrada em espécimes

histológicas dos fetos abortados.

2.5. Estudo da desidrogenase glutâmica (DG) e hemograma em bovinos

COSTA VAL et alii (1971), estudando 199 hemogramas de bezerros, desde o nascimento até os seis meses de idade, constataram diferenças nos resultados dos hemogramas, entre raças e idade dos animais estudados.

COSTA (1973), realizando estudos para comprovar a sensibilidade da desidrogenase glutâmica (DG) em bovinos intoxicados experimentalmente com tetracloreto de carbono (CCl_4), encontrou uma elevação deste enzima em torno de 400 vezes maior do que o nível verificado antes da intoxicação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Determinação da frequência das espécies de *Sarcocystis* em amostras de músculos de bovinos

3.1.1. Procedência e número de amostras

O material utilizado neste estudo consistiu na maior parte de esôfago e diafragma de bovinos, procedentes do Estado de Minas Gerais e abatidos para consumo no Frigorífico Minas Gerais S.A. (FRIMISA) e de animais sacrificados para estudos ou necropsiados no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG, que incluíam também fragmentos de língua e coração.

O tamanho da amostra foi calculado segundo as recomendações do CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS (1979). Para o cálculo, considerou-se uma prevalência de 75% estimada por LEVINE (1973) para bovinos dos Estados Unidos, utilizando-se da seguinte fórmula:

$$n = \frac{P \cdot (100 - P) \cdot Z^2}{\frac{(d \cdot P)^2}{100}}$$

n = número de amostras a examinar

P = prevalência esperada

Z = grau de confiança

d = margem de erro

p = 75%

Z = 95%

d = 10

$$n = \frac{75.25 (1,96)^2}{\left(\frac{10.75}{100}\right)^2} = \frac{7.200}{56} = 128$$

O material colhido, ao chegar ao Laboratório de Pesquisas de Doenças Parasitárias, era submetido a um processo de limpeza, que consistia da retirada das aponevroses e sangue coagulado, e em seguida acondicionado em geladeira a 4°C e examinados em período máximo de quatro dias.

3.1.2. Determinação do grau de infecção

3.1.2.1. Exame a fresco

Para realização do exame a fresco, a camada muscular do esôfago era umidecida com água e escarificada com a extremidade de uma lâmina de vidro. A área escarificada era então raspada com a borda da lâmina e o material obtido examinado ao microscópio com aumento 400 x.

3.1.2.2. Exame após a digestão péptica

As amostras de todos os órgãos foram submetidos à digestão péptica, segundo técnica de JACOBS & MELTON (1957). A digestão era realizada em estufa a 37°C, durante duas horas, sob constante agitação, utilizando-se 100 ml da seguinte solução por 30 g de cada amostra:

Pepsina (DIFCO 1:10.000)	1,3 g
Cloreto de sódio	2,5 g
Ácido clorídrico	3,5 g
Água destilada	500 ml

Após a digestão o material era filtrado em gaze e centrifugado a 500 g durante 15 minutos. O sedimento residual era lavado duas vezes com salina, centrifugado novamente e examinado ao microscópio com o aumento 400 x.

3.2. Identificação das espécies de *Sarcocystis* sp.

A identificação das espécies de *Sarcocystis* sp. foi feita através do exame de preparações coradas. Amostras de esôfago, diafragma, língua e coração eram fixados em formol neutro a 10%, incluídos em parafina, seccionados em cortes de 5 µm de espessura e corados com hematoxilina de Harris e Eosina (HE). De cada órgão foram processadas duas lâminas, e a diferenciação específica foi feita de acordo com os critérios adotados por GESTRICH et alii (1975) que são baseados na estrutura e espessura das paredes dos cistos.

3.3. Infecção experimental em cães

Com a finalidade de confirmar o diagnóstico específico de *S. cruzi* e obter esporocistos para infectar bezerros, foram inoculados sete cães adultos, capturados pelo Serviço de Profilaxia da Raiva de Belo Horizonte, com fragmentos de órgãos infectados com cistos. Antes da inoculação, os cães foram submetidos a exames parasitológicos de fezes. Os cães foram alimentados durante vários dias consecutivos com esôfago e diafragma de bovinos provenientes da Escola de Veterinária da UFMG e do FRIMISA. Os cães foram examinados diariamente a partir do sexto dia após a inoculação, utilizando a técnica de FAYER & LEEK (1973). Os exames coprológicos, utilizando-se de todo o volume de fezes emitidos durante 24 horas, foram realizados durante 30 dias.. Os esporocistos presentes nas fezes dos cães i-

noculados foram identificados, com base na morfologia e tamanho, segundo os critérios de HEYDORN & ROMMEL (1972).

3.4. Infecção experimental em bezerros

3.4.1. Procedência

Cinco bezerros machos, com idade de um ano, de raça mestiça com grau de sangue 3/4 HZ foram usados no experimento. Estes animais foram selecionados de um rebanho da Fazenda Santa Rita da Empresa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Prudente de Moraes, MG. Os animais foram trazidos para a Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte, no dia 20 de dezembro de 1980, onde foram mantidos isolados em um piquete durante a fase experimental. Os bezerros foram alimentados com capim verde picado e ração granulada.

3.4.2. Dose e inoculação de esporocistos *S. cruzi*

Os esporocistos utilizados para infectar os bezerros foram concentrados, armazenados em frascos contendo solução a 1% de H_2SO_4 à temperatura de 4°C. Antes da inoculação a solução contendo os esporocistos era neutralizada com uma solução aquosa de NaOH a 3,3%, e o número de esporocistos determinado com uma câmara de Neubauer segundo a técnica de BLEDSOE (1979).

Antes da inoculação os bezerros foram sorteados e cada um recebeu o inóculo conforme a seguinte tabela:

Nº do bezerro	Natureza do inóculo	Nº de formas infectantes	Via de inoculação
531	esporocistos	2×10^5	oral
547	esporocistos	2×10^5	oral
518	esporocistos	5×10^5	oral
519	esporocistos	5×10^5	oral
548	c o n t r o l e		

O inóculo foi administrado aos bezerros através de uma cânula esofágica adaptada a uma seringa de 20 ml. A seguir, 20 a 30 ml de água eram injetados, utilizando-se a mesma seringa e cânula para a remoção dos esporocistos que por acaso estivessem aderidos à parede da cânula.

3.4.3. Exames realizados após inoculação

3.4.3.1. Exames clínicos

A partir de 15 dias após a inoculação todos os bezerros foram submetidos a exame clínico completo duas vezes por semana, sendo que a temperatura era medida diariamente. Dois meses após a inoculação, os exames clínicos passaram a ser realizados semanalmente. A ficha que era preenchida durante os exames clínicos constava de: temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos de rúmen, mucosas aparentes e apetite.

3.4.3.2. Exames de laboratório

Foram realizados os seguintes exames labora -

toriais: hemogramas, dosagens de desidrogenase glutâmica e exames anatomopatológicos. Para os exames de sangue eram colhidas amostras de cada animal antes da inoculação e posteriormente uma vez por semana. O sangue era colhido por punção da veia jugular, sendo três ml em frascos contendo anticoagulante (EDTA) para hemograma e 10 ml sem anticoagulante para determinação de desidrogenase glutâmica.

Os exames histopatológicos foram realizados em fragmentos de pulmão, coração, fígado, baço, musculatura esquelética, linfonodos (mesentéricos, subilíacos e pré-escapulares), diafragma, cérebro, cerebelo, timo, pâncreas, rins, abomaso, intestino e processados de acordo com a técnica descrita no item 3.3.

3.4.3.3. Necrôpsia dos bezerros

Os animais infectados e o animal controle foram necropsiados 120-130 dias após a inoculação, com esporocistos de *S. cruzi*. Todos os órgãos de cada animal foram examinados macroscopicamente e fragmentos foram colhidos para exame histopatológico, conforme mencionado anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. Frequência de *Sarcocystis* em músculos de bovinos

Foram examinados 168 animais, sendo 134 abatidos no Frigorífico Minas Gerais S.A. (FRIMISA) e 34 necropsiados no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG.

O exame a fresco, realizado em 168 amostras de esôfago, revelou 97 infectadas com *Sarcocystis* sp., correspondendo a **58,4%** dos bovinos examinados (TAB. I).

Após digestão péptica das amostras de músculos, 158 estavam parasitadas, correspondendo a 95,8% dos bovinos examinados (TAB. I).

Os animais negativos foram 10 bezerros de oito a 10 meses de idade, provenientes da Fazenda Santa Rita (EPAMIG), município de Prudente de Moraes, e abatidos na Escola de Veterinária da UFMG.

A distribuição de *Sarcocystis* sp., nas amostras de vários órgãos de 30 animais examinados, foi de 100% no esôfago, 96,7% no coração, 93,3% na língua e 93,3% no diafragma. Nos animais restantes os parasitas só foram pesquisados na musculatura esofágica.

4.2. Identificação das espécies de *Sarcocystis*

A presença de cada cisto foi detectada através

de exame histopatológico em 124 (79,4%) dos 158 animais positivos (TAB. II). Foi verificada a presença de três espécies de *Sarcocystis* (FIG. 1, 2, 3, 4). Entre os 124 animais positivos, *S. cruzi* estava presente em 83 (66,9%), *S. hirsuta* em 10 (8,0%) e *S. hominis* em quatro animais (3,6%).

Infecções mistas foram observadas em 27 animais (22,3%). A combinação de *S. cruzi*/*S. hirsuta* foi encontrada em 26 animais (21,4%) e a *S. cruzi*/*S. hominis* em um animal (0,9%).

A média das mensurações realizadas nas paredes de cinco cistos de *S. hominis* foram de 5,8 μm . Em 20 cistos de *S. hirsuta* e *S. cruzi*, as médias foram de 4,7 μm e 0,5 μm , respectivamente.

4.3. Infecções experimental em cães

Os exames coprológicos realizados nos cães antes da infecção experimental foram negativos para oocistos e esporocistos de *Sarcocystis*. Os três cães inoculados com amostras de músculo contendo *S. cruzi* tornaram-se positivos 10 dias após a inoculação. O maior número de esporocistos foi detectado entre 15 a 30 dias após a infecção, atingindo o pique no 24º e 25º dias. As médias de esporocistos eliminados durante o pique foram, respectivamente, de 900.000, 1.278.000 e 898.100, para os cães número 1, 2 e 3. Durante o período patente os cães não eliminaram o protozoário diariamente. O cão número 1, que recebeu infecção única, eliminou esporocistos por 25 dias durante 61 dias de período patente. Os cães de números 2 e 3, que receberam infecções mistas eliminaram esporocistos por 29 e 35 dias durante o período patente de 76 e 90 dias, respectivamente. As dimensões máximas, mínimas e médias de 100 esporocistos foram de 13,9-16,5 x 9,1 - 10,8 μm e \bar{x} = 14,8 x 10,5 μm , comprovando pertencer os esporocistos à espécie *S. cruzi* (FIG. 5).

Em outro experimento, quatro cães foram reinfectados com material proveniente dos bezerros infectados experimentalmente com *S. cruzi*. Os dados relativos ao período pré-patente, período patente e pico de produção de esporocistos, foram semelhantes aqueles encontrados durante a infecção inicial. A única exceção verificada foi quanto ao número de esporocistos eliminados. Os cães eliminaram individualmente cerca de 30.000.000 esporocistos durante 60 dias de observação.

4.4. Infecção experimental em bezerros

Não foi observada alteração imediata nos bezerros inoculados com 200.000 ou com 500.000 esporocistos, embora resultados de isolamentos posteriores tenham mostrado que os animais inoculados tornaram-se infectados.

4.4.1. Exames clínicos

As variações na frequência cardíaca, respiratória e de movimentos do rúmen, tanto no animal controle como nos inoculados, mantiveram-se dentro dos parâmetros normais.

4.4.2. Exame de laboratório

4.4.2.1. Hemogramas

Os resultados dos exames hematológicos, obtidos antes e após a inoculação dos bezerros com esporocistos de *S. cruzi*, indicaram que houve variações nos valores do número de hemácias, hematócrito e percentagem de hemoglobina, tanto nos animais inoculados como no controle (GRAF. 1 a 3; TAB. III a VII).

4.4.2.2. Desidrogenase glutâmica

Os níveis de desidrogenase glutâmica apresentaram alterações acentuadas nos animais inoculados. As variações foram maiores e os níveis mais elevados, e permaneceram até o final do experimento nos bezerros inoculados com a maior dose de esporocistos (GRAF. 4; TAB. VIII). Resultados da análise de variância mostrou uma diferença significativa ($P = 0,01$ e $P = 0,05$) entre as diversas épocas, como também entre as dosagens. Usando o teste de Tukey foi possível verificar que os níveis de DG dos animais inoculados com 5×10^5 esporocistos foram estatisticamente significativos ($P = 0,05$) nos dias 14 e 28.

4.4.2.3. Exame macroscópico

À necrópsia, as seguintes alterações macroscópicas foram encontradas:

- Bezerros - 519 e 518, necropsiados; respectivamente 120 e 129 dias após a inoculação com 5×10^5 esporocistos.
- Pulmão - presença de pequenos nódulos de coloração vermelho-clara, de aproximadamente 0,2 cm de diâmetro, distribuídos na superfície do órgão.
- Coração - presença de petéquias distribuídas a nível de sulco coronário. A artéria aorta apresentava na superfície interna áreas elevadas de aspecto rugoso de, aproximadamente, 0,1 cm de diâmetro, distribuídos difusamente.
- Baço - aumento de volume, bordas arredondadas. Ao corte, apresentava pontos brancos de, aproximadamente, 0,1 a 0,2 cm de diâmetro, distribuídos difusamente por todo o parênquima.
- Rins - presença de manchas brancas de, aproximadamen-

te, 0,1 cm, distribuídas amplamente na superfície dos dois órgãos.

Bezerros 531 e 547, necropsiados, respectivamente, 128 e 130 dias após inoculação com 2×10^5 esporocistos:

apresentavam lesões semelhantes às verificadas nos bezerros 519 e 518, porém mais discretas.

Bezerro 548 (controle), necropsiado 130 dias após o início do experimento: não apresentava lesões visíveis.

4.4.2.4. Exame microscópico

Todos os animais, inclusive o controle, continham cistos nos músculos esqueléticos e cardíaco. Eram poucos os cistos presentes no animal controle, e, na maioria das vezes, eles se encontravam degenerados, enquanto os animais controles apresentavam numerosos cistos maduros (FIG. 6). Alterações microscópicas foram observadas no rim, pulmão, fígado e tecido muscular. Nos rins as lesões se caracterizaram por infiltração de células inflamatórias mononucleares no interstício periglomerular e peritubulares. O pulmão continha pequenos focos de hemorragia e infiltração de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos, associados à presença de *Dictyocaulus viviparus*. No fígado observou-se infiltração de células inflamatórias, hiperplasia do ducto biliar e degeneração hidrópica centrolobular. As alterações observadas nos músculos caracterizaram-se por lesões pouco extensas, limitadas a algumas fibras musculares, de natureza degenerativa (tumefação turva) ou necrótica com fragmentação da fibra e invasão por células inflamatórias. No tecido conjuntivo intersticial as lesões foram discretas, localizadas ou difusas, com a

predominância de célula do sistema histiocitário, linfócitos, plasmócitos e, raramente, de eosinófilo (FIG. 7). Dentre os músculos, os mais atingidos foram os do esôfago, coração, língua, masseter e diafragma.

TABELA I - Frequência de *Sarcocystis* sp. em bovinos do Estado de Minas Gerais, abatidos no FRIMISA e Escola de Veterinária da UFMG, 1980

Procedência	Animais examinados	Animais examinados			
		Exame a fresco		Exame após digestão péptica	
		Nº	%	Nº	%
Belo Horizonte	34	18	53,0	24	70,5
Capitão Enéas	15	7	46,7	15	100,0
Curvelo	24	13	54,2	24	100,0
Guanhães	30	19	63,3	30	100,0
Montes Claros	20	11	55,0	20	100,0
Perdões	30	17	56,7	30	100,0
São João da Ponte	15	12	80,0	15	100,0
TOTAL	168	97	58,4	158	95,8

TABELA II - Distribuição das espécies *Sarcocystis* sp. em bovinos do Estado de Minas Gerais

Procedência	Animais com cistos				Infeção única				Infeção mista				
	Examinados	Positivos	% <i>S. cruzi</i>	% <i>S. hirsuta</i>	% <i>S. hominis</i>	% <i>S. cruzi/S. hominis</i>	% <i>S. cruzi/S. hirsuta</i>	% <i>S. cruzi/S. hirsuta</i>	%	%	%		
Belo Horizonte	24	16	66,7	1	6,2	4	25,0	1	6,2	9	56,2		
Capitão Leães	15	14	93,3	3	21,4	-	-	-	-	-	-		
Curvelo	24	15	62,5	9	60,0	-	-	-	-	6	40,0		
Guanhães	30	26	86,7	19	73,1	-	-	-	-	7	27,0		
Montes Claros	29	18	90,0	16	88,9	2	11,1	-	-	-	5,5		
Perdões	30	23	76,7	18	78,3	4	17,4	-	-	1	4,3		
São João da Ponte	15	12	80,0	10	83,3	-	-	-	-	2	16,7		
TOTAL	158	124	79,4	83	66,9	10	8,0	4	3,6	1	0,9	26	21,4

TABELA III - Hemograma do bezerro 518 inoculado experimentalmente, por via oral, com 10^5 esporocistos de *S. cruzi*

Dias após inoculação	Hemácias/ mm^3 (10^6)	Hemoglobina (g%)	Volume globular (%)	Leucócitos/ mm^3 (10^3)	Contagem diferencial (%)							
					Neutrófilo			Eosinófilo	Basófilo	Monócito	Linfócito	
					Segmentado	Bastonetes	Metamielócito					Mielócito
0	6,6	11,8	37,9	29,5	26	4	0	0	4	1	3	62
9	8,8	10,2	30,5	30,7	23	2	0	0	0	0	0	75
14	7,1	11,8	35,0	17,3	35	2	0	0	0	0	0	63
27	8,7	9,8	29,0	16,3	23	0	0	0	0	0	0	77
34	5,9	9,0	23,5	15,8	17	2	0	0	3	0	2	76
41	5,9	10,7	23,0	16,3	17	4	0	0	4	0	2	73
45	6,5	9,6	22,5	11,4	16	0	0	0	2	0	0	82
55	6,4	8,0	28,0	18,7	18	1	0	0	2	0	1	78
63	5,2	6,3	20,0	13,6	25	0	0	0	0	0	0	75
73	5,0	7,0	19,0	17,2	2	0	0	0	4	0	0	94
81	4,1	7,6	22,0	16,0	5	0	0	0	1	0	0	94
87	5,4	9,0	24,0	27,7	1	1	0	0	0	0	0	98
94	7,5	8,7	30,0	29,6	18	1	0	0	2	0	5	74
101	5,8	9,2	30,0	27,4	39	0	0	0	1	0	0	60

TABELA IV - Hemograma do bezerro 519 inoculado experimentalmente, por via oral, com 5×10^5 esporocistos de *S. cruzi*

Dias após inoculação	Hemácias/ $\text{mm}^3 (10^6)$	Hemoglo- bina($\%$)	Volume globular ($\%$)	Leucócitos/ $\text{mm}^3 (10^3)$	Contagem diferencial (%)								
					Neutrófilo			Eosi- nófilo			Linfó cito		
					Segmen- tado	Basto- nete	Baso- fílo	Metamieló- cito	Mieló- cito	Basófilo		Monócito	
0	8,1	13	42	15,9	31	1	0	0	0	5	0	1	62
9	8,2	11,8	35,5	20,6	30	2	0	0	0	0	0	0	68
14	6,2	9,8	27,0	11,9	20	1	0	0	0	0	0	1	78
27	8,8	11,5	31,0	14,6	30	2	0	0	0	0	0	0	68
34	6,8	11,7	31,0	15,0	32	0	0	0	0	3	0	0	65
41	7,2	12,0	31,0	14,7	24	2	0	0	0	6	0	1	67
48	7,9	10,7	26,0	11,0	31	1	0	0	0	3	0	0	65
55	6,7	8,0	21,0	17,8	30	0	0	0	0	8	0	0	62
63	6,4	9,8	27,0	19,0	49	0	0	0	0	1	0	1	49
73	7,1	10,7	29,0	15,8	32	0	0	0	0	3	0	0	65
81	4,9	10,0	27,9	15,3	38	2	9	9	9	3	0	0	57
87	9,2	11,0	31,0	23,6	33	2	0	0	0	6	0	1	58
94	8,3	12,35	34,5	26,7	23	0	0	0	0	2	0	0	75
101	8,8	11,5	39,0	18,1	26	1	0	0	0	4	0	0	69

TABELA V - Hemograma do bezerro 531 inoculado experimentalmente, por via oral, com 2×10^5 esporocistos de *S. cruzi*

Dias após inoculação	Hemácias/ $\text{mm}^3 (10^6)$	Hemoglobina (g%)	Volume globular (%)	Leucócitos/ $\text{mm}^3 (10^3)$	Contagem diferencial (%)						Linfócito			
					Neutrófilo			Eosinófilo	Basófilo	Monócito				
					Segmentado	Bastonetes	Metamielócito					Mielócito		
0	8,3	11,8	36	11,7	20	3	0	0	0	5	0	0	2	70
9	8,2	11,7	34,5	18,5	28	1	0	0	0	0	0	0	0	71
14	6,3	9,6	27,0	9,3	21	1	0	0	0	0	0	0	0	78
27	8,7	11,3	30,0	10,9	22	0	0	0	0	0	0	0	0	78
34	6,7	9,4	27,0	13,6	21	1	0	0	0	0	0	0	0	78
41	7,1	12,0	28,5	12,6	11	2	0	0	0	6	0	0	1	80
48	7,6	9,6	22,0	13,3	6	0	0	0	0	4	0	0	2	88
55	6,1	8,6	22,0	16,4	22	0	0	0	0	2	0	0	1	75
63	5,8	8,7	23,0	18,3	30	0	0	0	0	5	0	0	0	65
73	6,1	10,7	29,0	19,4	10	0	0	0	0	2	0	0	0	88
87	7,4	11,0	30,0	18,4	17	2	0	0	0	0	0	0	1	80
94	6,9	11,0	35,0	29,5	22	1	0	0	0	2	0	0	4	71
101	6,3	10,2	31,0	23,7	22	0	0	0	0	2	0	0	0	76

TABELA VI - Hemograma do bezerro 531 inoculado experimentalmente, por via oral, com 2×10^5 esporocistos de *S. cruzi*

Dias após inoculação	Hemácias/ $\text{mm}^3 (10^3)$	Hemoglobina (g%)	Volume globular (%)	Leucócitos/ $\text{mm}^3 (10^3)$	Contagem diferencial (%)						Linfócito		
					Neutrófilo			Eosinófilo	Basófilo	Monócito			
					Segmentado	Bastonetes	Mitamielócito						
0	6,6	11,5	36,0	14,4	23	2	0	0	0	3	0	0	72
9	8,8	10,0	28,0	20,0	31	1	0	0	0	0	0	0	68
14	6,3	9,6	27,0	9,3	21	1	0	0	0	0	0	0	78
27	8,7	10,2	29,0	12,4	29	2	0	0	0	0	0	0	69
34	5,7	9,6	25,0	14,4	29	0	0	0	0	5	0	0	66
41	7,3	11,5	28,0	13,4	20	1	0	0	0	7	0	2	70
48	6,9	10,7	25,0	13,8	14	2	0	0	0	6	0	0	78
55	6,3	8,4	25,0	16,9	20	0	0	0	0	0	0	2	78
63	5,8	9,2	22,5	15,8	14	0	0	0	0	3	0	0	83
73	6,0	9,4	24,0	17,6	25	1	0	0	0	4	0	0	70
81	4,5	9,2	23,0	16,8	9	0	0	0	0	0	0	0	91
87	6,3	10,2	27,5	20,3	33	1	0	0	0	3	0	0	63
94	7,3	11,8	32,0	26,7	22	0	0	0	0	3	0	0	75
101	5,6	9,6	31,0	28,3	36	1	0	0	0	5	0	0	58

TABELA VII - Hemograma do bezerro 548 - Controle

Dias após inoculação	Hemácias/ mm ³ (10 ⁶)	Hemoglobina(g%)	Volume globular (%)	Leucócitos/ mm ³ (10 ⁶)	Contagem diferencial (%)						Linig cito		
					Neutrófilo		Eosinófilo	Basófilo	Monócito	Linfócito			
					Bastonetes	Metamielócito						Mielócito	
Segmentado	Bastonetes	Metamielócito	Mielócito	Eosinófilo	Basófilo	Monócito	Linfócito						
0	8,0	11,0	37	16,0	24 *	1	0	0	1	0	0	6	68
9	7,7	9,6	29	19,9	11	2	0	0	1	0	0	0	86
14	7,3	10,2	30,5	18,3	9	0	0	0	0	0	0	7	84
27	8,6	9,3	28,0	15,3	34	0	0	0	0	0	0	1	65
34	7,0	9,8	24,0	15,7	26	0	0	0	1	0	0	0	73
41	6,7	10,7	26,0	13,2	13	0	0	0	1	0	0	6	80
48	6,3	9,3	23,5	11,8	21	1	0	0	2	0	0	0	76
55	6,0	8,2	22,0	16,5	16	1	0	0	0	0	0	1	82
63	5,7	8,7	22,0	14,1	16	0	0	0	0	0	0	0	84
73	5,8	8,4	22,5	17,4	5	0	0	0	2	0	0	0	93
87	6,3	10,2	27,5	20,3	32	1	0	0	3	0	0	0	64
94	5,3	6,75	20,0	29,3	22	2	0	0	0	0	0	1	75

TABELA VIII - Níveis séricos de desidrogenase glutâmica (DG) em bezerro controle e em bezerros inoculados com esporocistos de *S. cruzi*

Bezerros	Níveis de desidrogenase glutâmica (μ moles/h/100 ml soro)							
	Dias após a inoculação							
	0	7	14	28	42	56	70	84
Controle								
548	18,0	20,0	17,0	11,0	15,0	22,0	26,0	24,0
Inoculados								
531	26,0	32,0	72,0	69,0	48,0	34,0	28,0	17,0
547	25,0	28,0	55,0	62,0	29,0	30,0	27,0	16,0
518	31,0	34,0	173,0	110,0	153,0	55,0	57,0	52,0
519	34,0	29,0	175,0	189,0	62,0	54,0	42,0	49,0

— 518 (500.000)
 - - - 519 (500.000)
 —●— 531 (200.000)
 —○— 547 (200.000)
 |—|—| 548 (CONTROLE)

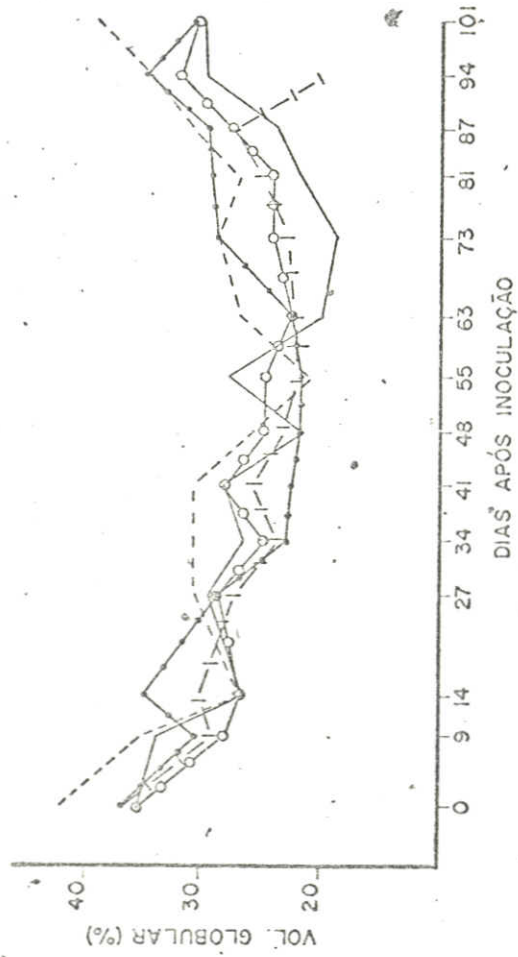


GRAFICO 1 - Volume globular (%) do animal controle e dos animais inoculados com *S. cruzi*.

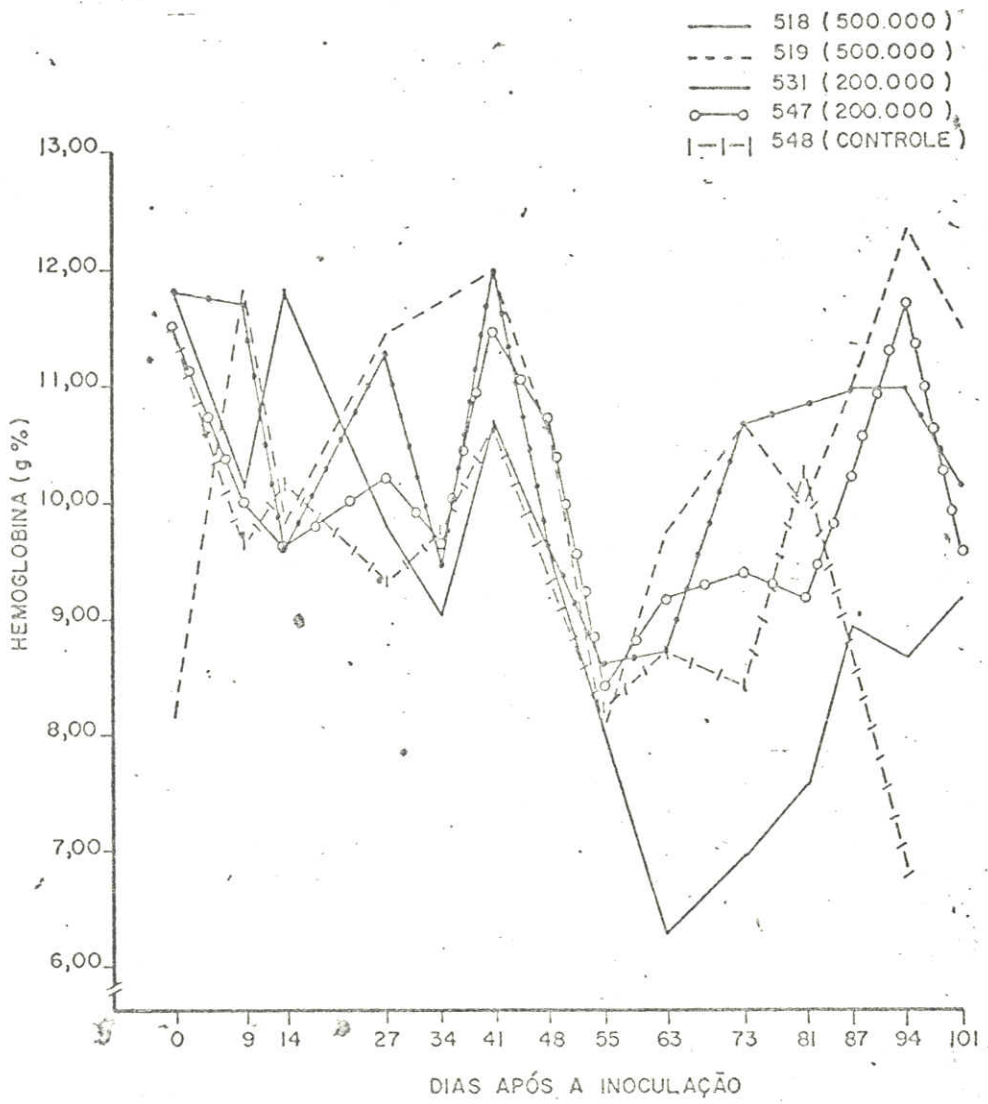


GRÁFICO 2 - Hemoglobina (g%) do animal controle e dos animais inoculados com *S. cruzi*

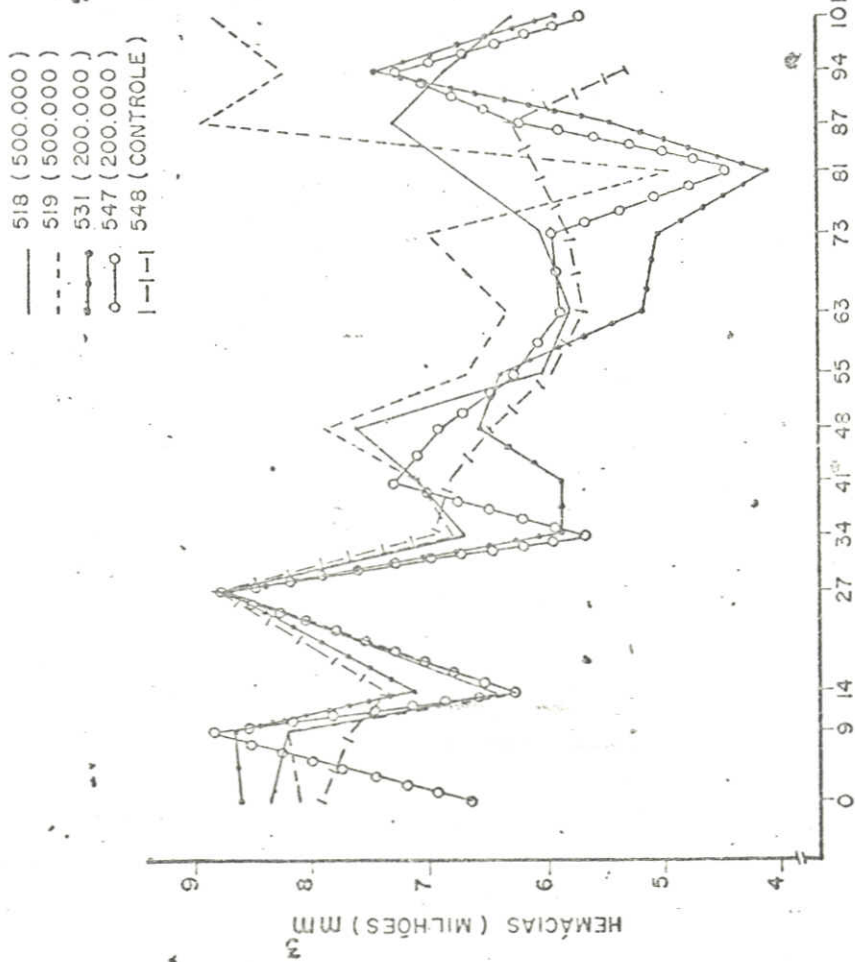


GRÁFICO 3 - Hemácias (milhões), do animal controle e dos animais inoculados com *S. cruzi*

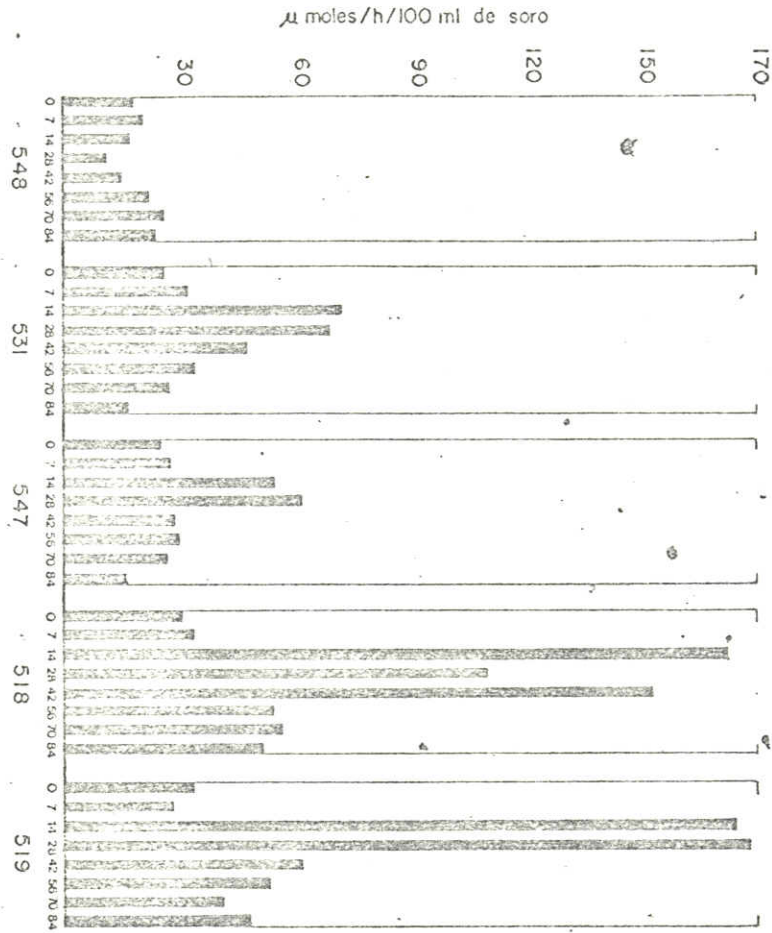


GRÁFICO 4 - Níveis séricos de desidrogenase glutâmica em bezerra controle e em bezerras inoculadas com esporocistos de *S. cruzi*

FIG. 1 - Diafragma de bovino contendo cisto de
S. cruzi. H.E. 640 x.

FIG. 2 - Diafragma de bovino contendo cisto de
S. hirsuta. H.E. 640 x.

FIG. 3 - Diafragma de bovino contendo cisto de
S. hominis. H.E. 400 x.

Fig. 4 - Diafragma de bovino contendo cisto de
S. hominis. H.E. 640 x.

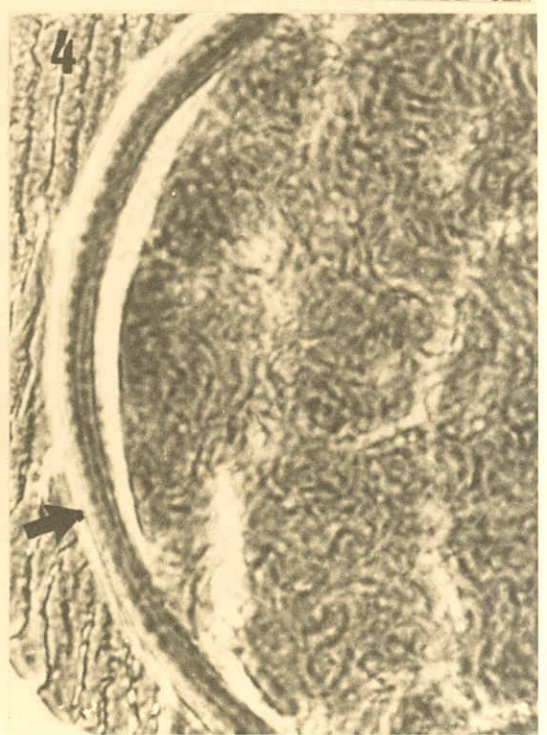
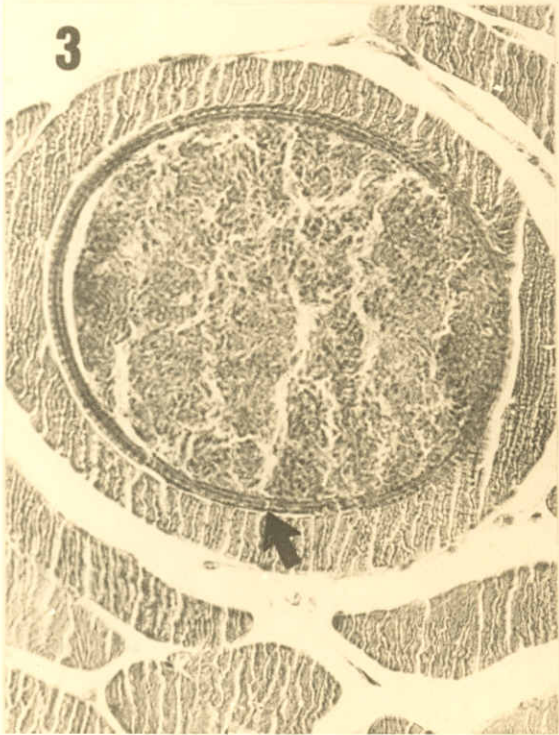
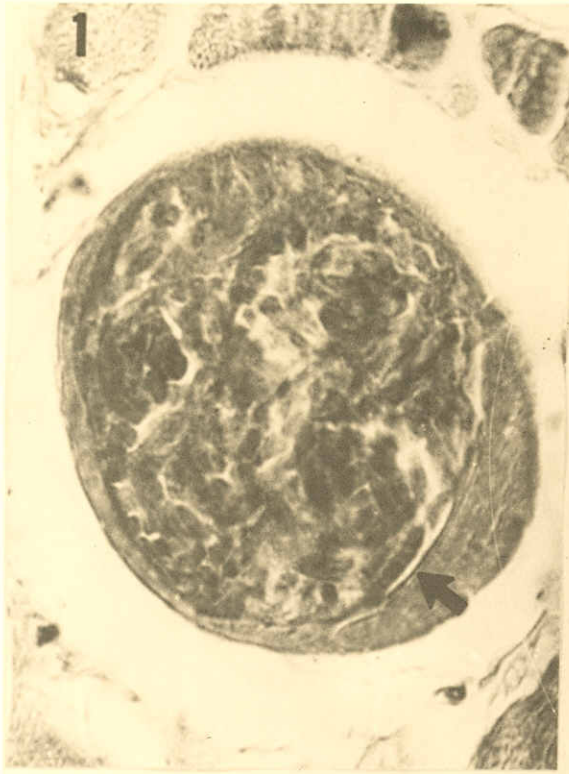
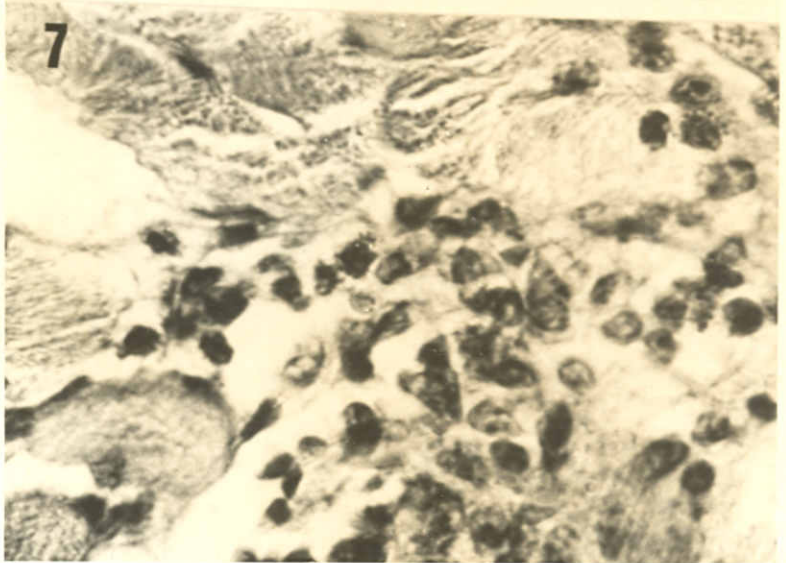
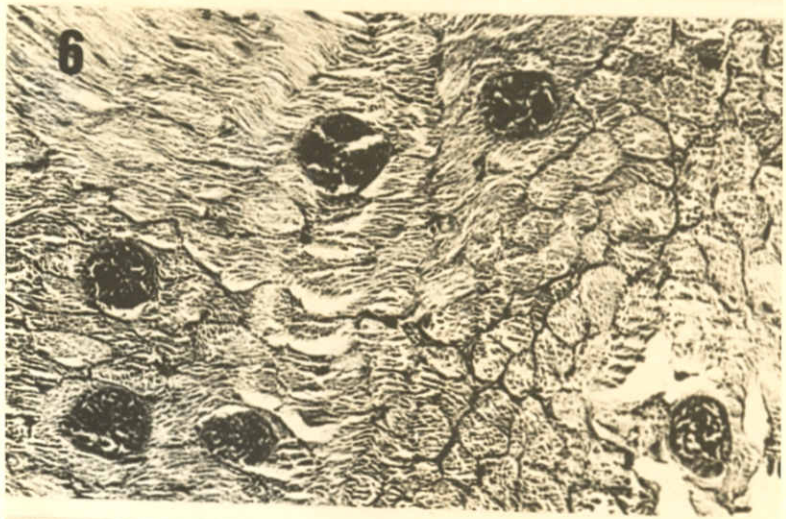


FIGURA 5 - Esporocisto de *S. cruzi*. 1100 x.

FIGURA 6 - Esôfago de bovino contendo cistos de *S. cruzi*. H.E. 192 x.

FIGURA 7 - Língua de bovino contendo infiltração de células inflamatórias. H.E. 640 x.



5. DISCUSSÃO

A alta frequência (95,8%) de *Sarcocystis* sp. encontrada em fragmentos musculares de 168 bovinos, provenientes de várias regiões do Estado de Minas Gerais, aparentemente é um fato comum, pois vários autores também encontraram frequência elevada deste parasita em outras partes do mundo (KALLAB, 1966; GARRO et alii, 1971; LEVINE, 1973; KRUIJF et alii, 1974; MUNDAY, 1975; BOCH et alii, 1978; FASSI-FEHRI et alii, 1978). Os dados de frequência descritos na literatura, apesar de elevados, são muito variáveis. As diferenças de frequência de *Sarcocystis* encontradas pelos vários autores provavelmente dependem mais dos métodos empregados para a pesquisa do que da distribuição geográfica e da estação do ano. O exame a fresco após raspagem da parede do esôfago, utilizado como método de triagem, detectou apenas 58,4% de positividade dos 168 animais examinados, revelando desta forma, ser uma técnica pouco precisa. O método da digestão péptica, descrita por JACOBS & MELTON (1957), mostrou ser no bovino um processo preciso e seguro para a pesquisa de sarcosporídeos. Dentre os 168 bovinos examinados, encontrou-se com o auxílio desta técnica apenas 10 animais negativos, cujas idades variavam de oito a 10 meses. Estes

animais eram criados em regime de semi-estabulação e com pequenas oportunidades de contato com fezes de cães.

Os exames de fragmentos de esôfago, coração, língua, diafragma, realizados em 30 amostras colhidas de bovinos, revelaram positividade de 100, 96,7, 93,3 e 93,3%, respectivamente, assemelhando-se aos resultados de BOCH et alii (1978).

Através de exame em cortes histológicos, foram detectados 124 (79,4%) bovinos com cistos, dentre os 158 positivos. Nestes cortes foi também realizada a diferenciação das espécies de *Sarcocystis* presentes nas amostras estudadas, através de mensurações realizadas nas paredes dos cistos. Encontrou-se, em média, cistos com paredes de 0,5 μm , 4,8 μm , 5,8 μm . GESTRICH et alii (1975), utilizando a mesma técnica, descreveram três espécies de *Sarcocystis*, baseados na espessura e estrutura das paredes. Os cistos, cujas paredes mediam menos de 0,5 μm , foram identificados como pertencentes à espécie *S. bovicanis*. Os cistos das paredes espessas, possuindo em média 4,7 μm e 5,3 μm de espessura, foram identificados como pertencentes às espécies *S. bovisfelis* e *S. bovishominis*, respectivamente. Essa nomenclatura, embora útil, pois, de acordo com DUBEY (1976), resume o ciclo evolutivo do parasita em uma só palavra, não pode ser usada de acordo com as regras internacionais de nomenclatura zoológica para espécies já conhecidas com nomes válidos e, assim, as três espécies que parasitam o boi devem ser chamadas, respectivamente, *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis hirsuta* e *Sarcocystis hominis* (*Isospora hominis*), cujos nomes específicos têm prioridade (LEVINE, 1977). GESTRICH et alii (1975), examinando posteriormente cistos ao microscópio eletrônico, verificaram que os de estrutura espessa, cujos hospedeiros eram o gato e o homem, não se diferenciavam apenas pela espessura da parede, mas também nos detalhes de construção da mesma. Resultados de infecção em

gatos e voluntários humanos confirmaram este achado. Baseando-se nos resultados destes autores, os cistos cujas paredes mediam 0,5 μ m, 4,8 μ m e 5,8 μ m, encontrados neste trabalho, foram identificados como *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*, respectivamente.

Após a identificação das espécies através da espessura das paredes dos cistos, verificou-se frequência de 66,9% de *S. cruzi*, 8,0% de *S. hirsuta* e 3,6% de *S. hominis*, sendo também observadas infecções mistas com predominância da combinação *S. cruzi/S. hirsuta*. BOCH et alii (1978) encontraram resultados semelhantes para *S. bovicanis* (*S. cruzi*). Entretanto, para *S. bovi hominis* e *S. bovi felis* foram encontrados valores diferentes, 63,6% e 34,5% respectivamente. O baixo índice de infecção para *S. hominis* e *S. hirsuta*, verificado neste trabalho, provavelmente pode ser explicado pela pequena taxa de infecção dos hospedeiros definitivos, homem e gato, e das poucas possibilidades de bovino de se infectar com fezes desses animais, considerando-se o manejo e o tipo de exploração existente nas áreas de criação de Minas Gerais. Tornam-se, entretanto, necessários maiores estudos em Minas Gerais para comprovação deste fato, pois os únicos dados de infecção da população humana e felina com *S. hominis* e *S. hirsuta* foram relatados por PEREIRA JUNIOR (1980) e OGASSAWARAA et alii (1980), respectivamente, na cidade do Rio de Janeiro e na cidade de São Paulo. A alta taxa de infecção para *S. hominis* (63,6%), encontrada por BOCH et alii (1978), talvez possa ser explicada pelo maior contato entre o homem e a população bovina, pois os animais permanecem estabulados durante todo o inverno. Ressalta-se que os animais encontrados positivos para *S. hominis*, neste experimento, eram oriundos da região de Belo Horizonte, onde o sistema de criação intensivo e semi-intensivo é mais utilizado, proporcionando possibilidades de contatos dos animais com fezes humanas, o que

seria difícil nas outras regiões estudadas onde o sistema extensivo de criação é utilizado. Apesar da incidência encontrada para *S. hominis* (3,6%), este dado é importante do ponto de vista higiênico, porque desta maneira está formado um meio de infecção para o homem, através da ingestão de carne crua ou mal cozida.

Foi possível, em condições experimentais, completar-se o ciclo *S. cruzi* utilizando o modelo cão-bovino-cão. Os dados relativos ao período pré-patente, período patente e pico de produção de esporocistos nos cães utilizados no presente experimento, assemelham-se aos resultados obtidos em infecções experimentais de caninos, realizados por HEYDORN & ROMMEL (1972), FAYER (1974, 1977) e OGASSAWARA et alii (1978). Os esporocistos observados nas fezes dos cães eram incolores, elípticos, esporulados, contendo quatro esporozoítos e através das características morfológicas e dimensionais, verificou-se identidade com encontrados em trabalhos anteriores, pelos autores citados. A identificação de esporocistos de *S. cruzi*, realizada dentro dos esquemas preconizados por HEYDORN & ROMMEL (1972), não deixou nenhuma dúvida quanto a sua natureza. O diagnóstico correto destas estruturas é de grande importância, porque esporocistos extremamente semelhantes de outras espécies de *Sarcocystis* também utilizam o cão como hospedeiro definitivo.

Encontrou-se neste trabalho um período patente de 61 dias na infecção única e 76 a 90 nas infecções múltiplas. Apesar do período de patência ter sido longo, a eliminação foi intermitente, a partir do 10º dia após infecção. FAYER (1974) obteve resultados semelhantes e admitiu a hipótese da diferença de linhagem e a dose infectante de *Sarcocystis*, para explicar a persistência na eliminação de esporocistos.

Com relação a reinfecção de cães, constatou-se que o período de eliminação de esporocistos era apro-

ximadamente a mesma verificada na primeira infecção. Resultados semelhantes foram descritos por HEYDORN & ROMMEL (1972). Estes achados e as observações histológicas no intestino delgado de cães, infectados com *S. fusiformis* (*S. cruzi*), realizados por FAYER (1974), sugerem pequenos níveis de resistência à reinfecções destes animais. Resultados de reinfecções verificadas neste experimento caracterizaram-se por longo período patente, elevada quantidade de esporocistos eliminados, superiores aos encontrados na primeira infecção, devido ao grande número de parasitas existentes no material infectante.

FAYER (1977) sugeriu, com base em suas pesquisas, que o longo período de patência e a facilidade com que cães se locomovem de um lugar para outro, podem conduzir a uma grande disseminação de esporocistos em determinada área. Todavia, se esses animais ficam confinados em uma área, aumentam as possibilidades de uma concentração maciça de esporocistos neste local. Apesar do autor admitir a oportunidade de uma contaminação alta do meio ambiente, com os esporocistos de *Sarcocystis*, mais estudos seriam necessários a fim de esclarecer o papel do cão e de outros animais, na cadeia epidemiológica de transmissão da sarcocistose, particularmente no caso de sistemas de criação extensiva de bovinos, onde 95,8% dos bovinos encontram-se infectados.

Os hemogramas dos animais experimentalmente infectados e do controle apresentaram alterações não definidas. Hemogramas em bovinos apresentam variações de acordo com a raça e a idade (COSTA VAL et alii, 1971). A variação do número de leucócitos, hemácias, volume globular e hemoglobina ocorreram em todos os animais, não permitindo relacioná-los com sarcocistose, porque permaneceu dentro dos limites normais. Por outro lado, MAHRT & FAYER (1975), inoculando bezerros de seis a sete semanas de idade com 200.000 esporocistos de *S. cruzi*, verificou uma queda além dos limites normais nos níveis de

hemoglobina, número de hemácias, volume globular e número de linfócitos. Segundo estes autores, o decréscimo no número de linfócitos circulantes, nos bezerros infectados, podem refletir uma extensa exsudação destas células da circulação para a área infectada, tecidos perivascularares, coração, músculos esqueléticos, pulmão, fígado e rim. A explicação para as diferenças nos níveis dos hemogramas encontrada neste trabalho, quando comparada aos dados de MAHRT & FAYER (1975), pode estar relacionada com a idade e a susceptibilidade dos animais utilizados neste experimento. Apesar de estarem dentro dos limites normais, o número de hemácias, leucócitos, hemoglobina e volume globular oscilou durante o experimento, principalmente entre a sétima e a 11ª. semana. Este fato pode ter sido ocasionado pela mudança de alimentação dos animais, quando foi utilizada silagem, substituindo capim picado e ração, que vinha sendo usado nas suas dietas alimentares.

Os animais do presente experimento, mostraram uma resposta com elevação dos níveis séricos da enzima desidrogenase glutâmica (DG). Os animais infectados com 500.000 esporocistos apresentaram um aumento em torno de cinco vezes maior do que o nível verificado antes da infecção. Mesmo nos animais infectados com 200.000 esporocistos houve uma elevação evidente. Observou-se que os resultados elevados ocorreram entre o 14º e 42º dias após infecção. SCHMITZ & WOLF (1977), relatando casos naturais de sarcocistose, observaram em fígado de bovino, através de exames histológicos, extensa congestão centrolobular, com degeneração e necrose dos hepatócitos. Provavelmente, os níveis elevados de DG, encontrados neste trabalho, estão associados com a multiplicação de *S. cruzi* nas células endoteliais das pequenas artérias do fígado com o aparecimento simultâneo de lesões. A elevação nas dosagens de desidrogenase glutâmica tem significado clí-

nico de destruição hepática, devido a vários processos patológicos, conforme relata COSTA (1973). Apesar desta enzima não ser específica da infecção, a sua dosagem, somada com outros dados clínicos, pode ser de utilidade no diagnóstico de sarcocistose aguda em bovinos.

À necrópsia as lesões verificadas, tanto nos animais que receberam inoculação com 2×10^5 como nos que receberam inoculação com 5×10^5 esporocistos, não foram acentuadas. Estas lesões discretas poderiam justificar a ausência de sintomas dos animais durante o experimento. Todavia, o exame histopatológico destas lesões revelou a presença de *S. cruzi* em todos os animais, inclusive o controle, indicando a possibilidade dos animais estarem infectados antes da inoculação. Os cistos verificados nos animais inoculados foram numerosos, quando comparados com aqueles encontrados no animal controle.

Apesar de vários autores terem encontrado lesões macroscópicas em sarcocistose natural (CORNER et alii, 1963; SCHMITZ & WOLF, 1977; GLEGG, 1978; FRELIER et alii, 1979; GILES et alii, 1980) e experimental (GESTRICH et alii, 1975; JOHNSON et alii, 1975; MAHRT & FAYER, 1975; FAYER et alii, 1976), as lesões encontradas neste trabalho foram inconstantes, pouco extensas e de evolução subaguda. Embora o parasita fosse encontrado em vários órgãos, o esôfago foi o mais comumente parasitado, seguindo-se o coração, língua e diafragma. O esôfago constituiu-se, portanto, no órgão de eleição para o diagnóstico da infecção.

As explicações prováveis para o não aparecimento de sintomas e lesões características de sarcocistose nos animais inoculados com *S. cruzi*, podem estar relacionadas com a patogenicidade da amostra estudada. A hipótese desses animais estarem infectados antes da inoculação e, portanto, resistentes à reinfecção, parece não ter muita importância, pois, segundo FASSI-FEHRI et alii

(1978), a natureza das reações celulares, essencialmente histio-monocitária, acompanhada às vezes de linfócitos e plasmócitos, raramente de eosinófilos, verificadas em animais com sarcocistose, demonstram o fraco poder imunogênico dos sarcosporídeos.

6. CONCLUSÕES

Para as condições em que foi conduzido o trabalho e em face dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1) a frequência de *Sarcocystis* sp. em bovinos no Estado de Minas Gerais é elevada, sendo o esôfago o órgão mais infectado, consistindo no material de escolha para o diagnóstico de infecção por *Sarcocystis*;

2) as espécies de *Sarcocystis* que parasitam bovinos podem ser diferenciadas através da espessura da parede dos cistos;

3) o cão desempenha no nosso meio o papel de hospedeiro definitivo para uma das espécies de *Sarcocystis* encontradas em bovinos, o *Sarcocystis cruzi*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLEDSOE, B.W. Life cycle of Sarcocystis sp. in deer mice and gopher snakes. Urbana, University of Illinois, 1979. 137p. (Tese, Doctor Veterinary Medicine).
2. BOCH, J.; LAUPHEIMER, K.E.; ERBER, M. Drei Sarcosporidienarten bei Schlachtrindern in Süddeutschland. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., Hamburg, 91 (21):426-31, 1978.
3. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, Ramos Mejia. Procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Ramos Mejia, Buenos Aires, 1979. 35p. (Nota Técnica, 18 Rev. 1).
4. CLEGG, F.G.; BEVERLEY, J.K.A.; MARKSON, L.M. Clinical disease in cattle in England resembling Dalmeny disease associated with suspected *Sarcocystis* infection. J. Comp. Pathol., New York, 88(1):105-14, 1978.
5. CORNER, A.H.; MITCHELL, D.; MEADS, E.B.; TAYLOR, P.A. Dalmeny disease. An infection of cattle presumed to be caused by an unidentified protozoon. Can. Vet. J., Ottawa, 4(10):252-4, 1963.

6. COSTA, R.R. Valor diagnóstico das desidrogenase glutâmica e sorbitol, transaminae glutâmica oxalacética e pivúrica e do teste de proteção da BSF em bovinos com lesão hepática provocada experimentalmente. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1973. 31p. (Tese, Mestre em Medicina Veterinária).
7. COSTA VAL, V.P.; PESSOA, J.M.; FERREIRA NETO, J.M. Variações no hemograma de bezerros durante os primeiros estágios de vida após o nascimento. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 23:291-6, 1971.
8. DUBEY, J.P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. J. Am. Med. Assoc., Schaumburg, 169(10):1061-78, 1976
9. FASSI-FEHRI, N.; CABARET, J.; AMAQUODOUF, A.; DARDAR, F. La sarcosporidiose des ruminants au Maroc etude epidemiologique par deux techniques histologiques. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(3):409-17, 1978.
10. FAYER, R. Development of *Sarcocystis fusiformis* in the small intestine of the dog. J. Parasitol., Lawrence, 60(4):660-5, 1974.
11. FAYER, R. Production of *Sarcocystis cruzi* sporocysts by dogs fed experimentally infected and naturally infected beef. J. Parasitol., Lawrence, 63(6):1072-5, 1977.
- 12. FAYER, R.; JOHNSON, J.; LUNDE, M.N. Abortion and other signs of disease in cows experimentally infected with *Sarcocystis fusiformis* from dogs. J. Infect. Dis., Chicago, 134(6):624-6, 1976.
13. FAYER, R. & LEEK, R.G. Excystation of *Sarcocystis fusiformis* sporocysts from dogs. Proc. Helminthol. Soc. Wash., Lawrence, 40(2):294-6, 1973.

14. FRELIER, P.F.; MAYHEW, I.G.; POLLOCK, R. Bovine sarcocystosis: Pathologic features of naturally occurring infection with *Sarcocystis cruzi*. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 40(5):651-7, 1979.
15. GARRO, M.C.P.; OSÓRIO, M.R.; GARCIA, V.G.; CASTRO, J. G. Contribucion al estudio de la sarcosporidiosis. Su frecuencia en el ganado vacuno de la provincia de Granada. Rev. Iber. Parasitol., Granada, 31(3/4):315-8, 1971.
16. GESTRICH, R.; HEYDORN, A.O.; BAYSU, N. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. VI. Untersuchungen zur Artendifferenzierung bei *Sarcocystis fusiformis* und *Sarcocystis tenella*. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., Hamburg, 88(10,11):191-7, 201-4, 1975
17. GILES, R.C.; TRAMOTIN, R.; KADEL, W.L.; WHITAKER, K.; MIKSCH, D.; BRYANT, D.W.; FAYER, R. Sarcocystosis in cattle in Kentucky. J. Am. Med. Assoc., Schaumburg, 176(6):543-8, 1980.
18. HEYDORN, A.D. & ROMMEL, M. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. II. Hund und Katze als Überträger der Sarkosporidien des Rindes. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., Hamburg, 85(7):121-3, 1972.
19. JACOBS, L. & MELTON, M.L. A procedure for testing meat samples for *Toxoplasma*, with preliminary results of a survey of pork and beef samples. J. Parasitol., Lawrence, 43(5):38-9, 1957. (Abstract).
20. JOHNSON, A.J.; HILDEBRANDT, P.K.; FAYER, R. Experimentally induced *Sarcocystis* infection in calves: pathology. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 36(7):995-9, 1975.
21. KALLAB, K. Über das Vorkommen von Sarkosporidien.

- Wien. Tierärztl. Monatsschr., Horn, 53(1):34-9, 1966.
22. KRUIJF, J.M.; VAN LOGTESTIJN, J.G.; FRANKEN, P.; HERDER, K.A.M. Sarcosporidiosis in cattle and swine. Tijdschr. Diergeneeskd., Utrecht, 99(6): 303-8, 1974.
23. LANKESTER, E.R. On *Drepanidium ranarum*, the cell-parasite of the frog's blood and spleen. Q. J. Microsc. Sci., Oxford, 22:53-65, 1882 apud LEVINE, N.D. Nomenclature of *Sarcocystis* in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat. J. Parasitol., Lawrence, 63(1):36-51, 1977.
24. LEVINE, N.D. Nomenclature of *Sarcocystis* in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat. J. Parasitol., Lawrence, 63(1):36-51, 1977.
25. LEVINE, N.D. Protozoan parasites of domestic animals and of man. 2.ed., Minneapolis, Burgess, 1973. 406p.
26. MAHRT, J.L. & FAYER, R. Hematologic and serologic changes in calves experimentally infected with *Sarcocystis fusiformis*. J. Parasitol., Lawrence, 61(5):967-9, 1975.
27. MEADS, E.B. Dalmeny disease. Another outbreak probably sarcocystosis. Can. Vet. J., Ottawa, 17(10):271, 1976.
28. MIESCHER, F. Über eigenthümliche Schläuche in den Muskeln einer Hausmaus. Berl. Verh. Naturforsch. Ges. Basel., Augsburg, 5:198-202, 1843 apud LEVINE, N.D. Nomenclature of *Sarcocystis* in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat. J. Parasitol., Lawrence, 63(1):38-51, 1977.

29. MUNDAY, B.L. The prevalence of sarcosporidiosis in Australian meat animals. Austr. Vet. __., Brunswick, 51(10):478-80, 1975.
30. OGASSAWARA, S.; BENASSI, S.; LARSSON, C.E.; HAGIWARA, M.K. *Sarcocystis* sp.; ocorrência de esporocistos em gatos na cidade de São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 47(1/2):23-6, 1980.
31. OGASSAWARA, S.; LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; HAGIWARA, M.K.; GOUVEIA, G. Ocorrência de esporocistos de *Sarcocystis* sp., em cães na cidade de São Paulo. Rev. Microbiol., São Paulo, 8(1):21-3, 1977
32. OGASSAWARA, S.; NIKITIN, T.; LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; BARBUTO, O.J.M.; HAGIWARA, M.K. Infecção experimental de cães com coração de bovinos parasitado por *Sarcocystis* sp. Rev. Fac. Med. Zootec. USP, São Paulo, 15(1):51-8, 1978.
33. PEREIRA JUNIOR & BITENCOURT, D. Utilização do método Kato-Katz para o diagnóstico de *Isospora*: resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 4., Belo Horizonte, 1981. Anais. Belo Horizonte, 1981. p.30. (Resumo).
34. SCHMITZ, J.A. & WOLF, W.W. Spontaneous fatal sarcocystosis in a calf. Vet. Pathol., Washington, 14(5):527-31, 1977.