

HIPNOZOÍTAS DE *Cystoisospora ohioensis* (DUBEY, 1975) FRENKEL, 1977 (APICOMPLEXA: CYSTOISOSPORINAE) RECUPERADOS DE ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DA DIGESTÃO PÉPTICA

Hypnozoites of *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) recovered from organs by pepsin digestion

OLIVEIRA¹ F.C.R., ALBUQUERQUE¹ G.R., MUNHOZ¹ A.D., LOPES² C.W.G. & MASSAD³ F.V.

(1) Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária/UFRRJ, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil.
E-mail: oliveira@ufrj.br. (2) Prof. Titular, Depto de Parasitologia Animal/UFRRJ, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil.
E-mail: lopeswg@ufrj.br. (3) Estagiária SINTEG, Depto de Parasitologia Animal/UFRRJ, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil.

SUMMARY: The isolation, morphological characterization, and examination of systemic distribution in mice organs due to *Cystoisospora ohioensis* were studied. For that 80 albino mice were divided in two groups. Each group of 40 animals was distributed per eight cages with five animals in each. In one of them, mice were inoculated orally with 10^5 sporulated oocysts of *C. ohioensis*. The second group received saline solution at 0.9% as vehicle only, and was used as control. Both groups received food and water *ad libitum*. At the days 1, 3, 5, 7, 21, 28 and 35 after inoculation (DAI) five animals were sacrificed before posted at necropsy table. Their organs as: small and large intestines, Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and spleen. After day were grinder and digested in acid pepsin, hypnozoites were recovered from small and large intestines at 1 DAI, and they were measured 6.29 ± 0.92 by 1.74 ± 0.74 and 6.62 ± 0.84 by 2.04 ± 1.00 μm respectively. From Peyer's patches they were observed till 5 DAI, and measured 6.26 ± 0.81 by 2.62 ± 0.57 μm . Hypnozoites were obtained from mesenteric lymph nodes and spleen up to 35 DAI, where the parasites measured 6.10 ± 0.56 by 2.78 ± 0.58 and 11.69 ± 1.59 by 3.42 ± 1.59 μm respectively. Morphological differences were observed in all recovered hypnozoites from parasitized organs where they were found as well as according to the DAI. No hypnozoites were found in any organs of the control group.

KEY WORDS: *Cystoisospora ohioensis*, hypnozoites, albino mice, pepsin digestion.

INTRODUÇÃO

Cystoisospora ohioensis é cosmopolita e bastante comum, parasitando as células epiteliais do intestino delgado e também do ceco e cólon do cão, coioite, dingo, raposa vermelha, guaxinim e possivelmente de outros membros da família *Canidae*.

Carnívoros que não sejam hospedeiros definitivos e herbívoros podem infectar-se, através da ingestão dos oocistos esporulados de *Cystoisospora*, presentes nos locais onde vivem (DUBEY & FRANKEL, 1972; FRENKEL & DUBEY, 1972; DUBEY, 1975a e 1975b; DUBEY, 1979 e FAYER & FRENKEL, 1979). Os esporozoítas são liberados no intestino do hospedeiro intermediário, invadindo os tecidos extra-intestinais, especialmente linfonodos mesentéricos, fígado, baço, musculatura e cérebro (DUBEY, 1992). Os esporozoítas

nos tecidos aumentam de tamanho e permanecem encistados, envoltos por um vacúolo parasitóforo, constituído de uma delgada parede cística de tecido conjuntivo, conforme assinalado previamente por DUBEY & MEHLHORN (1978).

Os cistos monozoicos são assim chamados por conterem apenas um zoíta, sendo denominado hipnozoíta. Este fato reforça a evidência da não multiplicação de *Cystoisospora* no hospedeiro não definitivo (DUBEY, 1992).

Para a evidenciação destas formas extra-intestinais, a digestão enzimática tem sido amplamente utilizada para a detecção de zoítas e cistos (MARKUS, 1976 e 1978; FRENKEL, 1977; DUBEY, 1979 e 1997). FREIRE & LOPES (1995) ao avaliarem a ação da pepsina e tripsina na obtenção de hipnozoítas de *C. felis*, concluíram que a digestão péptica deve ser considerada como método de escolha na obtenção deste para estudo da biologia das formas extra-intestinais de

coccídios. Estudos realizados com hipnozoítas de *C. rivolta* obtidos através de digestão triptica, levaram à presença de formas monozoícas com ou sem vacúolo parasitóforo. Neste estudo, as formas envoltas pelo parasitóforo tiveram dimensões maiores que aquelas desprovidas de tal estrutura (BRÖSIGKE, 1981).

MATERIAL E MÉTODO

Os oocistos esporulados de *C. ohioensis* foram obtidos a partir de fezes de cães de uma ninhada, com idade aproximada de oito semanas, concentrados em solução saturada de açúcar (sacarose). A esporulação se deu pela adição de bicromato de potássio a 2,5% e a aeração, através de borbulhamento de ar, proveniente de uma bomba de aquário por 72 horas. Decorrido este período, os oocistos foram lavados em solução tampão fosfato (PBS), para remoção do bicromato de potássio e o excesso de sacarose. O total de todo o volume das fezes eliminadas pelos cães foi concentrado em um volume final de 50 mL e mantidos em geladeira a 4°C. Uma alíquota da suspensão de oocistos, previamente concentrada, foi contada em Câmara de Neubauer, sendo o tamanho do inóculo definido de modo que cada camundongo do recebesse 0,5 mL da suspensão contendo 10^5 oocistos esporulados.

Um total de 80 camundongos albinos (Swiss Webster) foi dividido em dois grupos. Cada grupo contendo 40 animais foi distribuído em oito gaiolas com cinco camundongos. Os animais de um dos grupos foram inoculados por via oral com 10^5 oocistos esporulados de *C. ohioensis* por camundongo. O outro grupo foi estabelecido como controle sendo os animais inoculados, em mesmo volume e via, com o veículo solução salina utilizados para efetuar-se a suspensão de oocistos esporulados. Todos os animais receberam água e ração *ad libitum*, durante todo o experimento.

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados nos 1, 3, 5, 9, 14, 21 e 35 (DAI), necropsiado e eviscerados. Estômago, intestino delgado; intestino grosso, placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, baço, fígado, pulmão e coração, foram retirados, identificados e cortados, individualmente, em pequenos fragmentos e triturados em grau e pistilo, adicionado de solução salina 0,9%, de modo que o homogeneizado tivesse um volume de 5 mL e colocados em um tubo plástico de centrifuga de 50 mL.

Os hipnozoítas de *C. ohioensis* foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por DUBEY (1997), com ligeira modificação. Ao homogeneizado, adicionava-se 10 mL de solução de pepsina ácida a 37°C, preparada no momento do uso, com atividade de ensaio de 1 : 3.000, 2,6 g; NaCl, 5,0 g; HCl, 7,0 mL e diluído até o volume de 500 mL com pH ~

1,10-1,20), sendo incubado em uma câmara com agitador por 60 minutos. O material digerido foi filtrado em camada dupla de gaze e em seguida centrifugado a 1200 x g por 10 minutos em tubos de centrifuga de 50 mL. O sobrenadante foi desprezado e o material restante, aderido ao fundo do tubo e ressuspensão em 5 mL de solução tampão (PBS. pH ~ 7,2). A neutralização foi feita adicionando-se ao tubo 8 a 10 mL de bicarbonato de sódio a 1,2% (pH ~ 8,3), preparado imediatamente ao uso. O material neutralizado com bicarbonato de sódio foi centrifugado a 1200 x g por 10 minutos. A seguir desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o material em 0,5 a 2 mL de PBS.

O número de hipnozoítas por órgãos infectados foi estabelecido de acordo com a metodologia descrita por BRÖSIGKE (1981) para *C. rivolta*, com ligeira modificação. Alíquotas de 10 mL de suspensão de hipnozoítas eram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de contraste de fase. O número era obtido pela seguinte formula: $H = N \times 100 \times V$; onde N é o número de hipnozoítas contido na alíquota de 10 mL; 100 é a correção para 1000 mL e V o volume total da amostra. A morfometria dos hipnozoítas foi realizada com auxílio de ocular micrométrica K-15X, em microscópio biocular. Para facilitar as mensurações, fixou-se os hipnozoítas em solução a 2,5% de glutaraldeído (SGT). Através deste procedimento, impediu-se a movimentação e manteve-se a forma original dos estágios intracelulares de *C. ohioensis*.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Formas de *C. ohioensis* foram observadas nos órgão após a digestão péptica, sendo recuperadas do intestino delgado e grosso, placa de Peyer, linfonodos mesentéricos e baço dos animais que foram inoculados (Tabela 1). Embora não sendo observado o parasita no fígado, estes foram detectados nos hospedeiros intermediários, infectados com *C. rivolta* (BRÖSIGKE, 1981 e BRÖSIGKE, et alii 1982) e *C. felis* (COSTA & LOPES, 1994 e FREIRE & LOPES, 1996.). A recuperação de *C. ohioensis* no baço, desde o 1º DAI (Tabela 1), reforça a hipótese de uma via hematogênica de disseminação do parasita (FREIRE & LOPES, 1996). Não foram observados hipnozoítas de *C. ohioensis* no estômago, coração e pulmão dos camundongos do grupo Infectado. FREIRE & LOPES (1996), observaram hipnozoítas de *C. felis* no rins, pulmão e coração, referindo-se a presença do coccídio, nestes órgãos, a uma distribuição acidental e não a uma via normal de acesso parasitário.

Cystoisospora ohioensis foi recuperada no intestino delgado e grosso no 1º DAI, na placa de Peyer até o 14º DAI, no linfonodos mesentéricos e baço em todos os momentos do experimento; entretanto, no 35º DAI observou-se baixa con-

TABELA 1: Número de hipnozoítas quantificados em vísceras de camundongos inoculados com 10^5 oocistos esporulados de *Cystoisospora ohioensis*.

Dias após inoculação	Número de Hipozoíta/Vísceras ^a					Total
	I. delgado	I. grosso	P. Peyer	L. mesentérico	Baço	
1	102 (17,62) ^b	147 (25,39)	135 (23,31)	86 (14,85)	109 (18,83)	579 (100)
3	0	0	50 (7,17)	506 (72,60)	141 (20,23)	697 (100)
5	0	0	28 (25,00)	44 (39,29)	40 (35,71)	112 (100)
9	0	0	9 (4,89)	60 (32,60)	115 (62,51)	184 (100)
14	0	0	0	38 (18,45)	168 (81,55)	206 (100)
21	0	0	0	60 (23,90)	191 (76,10)	251 (100)
28	0	0	0	35 (12,96)	235 (87,04)	270 (100)
35	0	0	0	5 (4,42)	108 (95,58)	113 (100)

^aOs resultados são a média obtida de cinco animais para cada dia de experimento.

^bNúmero entre parênteses representam o percentual de hipnozoítas em cada dia de avaliação.

siderável no número absoluto de parasitas no isolamento dos linfonodos mesentéricos e baço, concomitantemente ocorreu baixa relativa destes no isolamento nos linfonodos mesentéricos (4,42%) e aumento relativo no baço (95,58%). A diminuição do número relativo na recuperação de hipnozoíta da placa de Peyer e linfonodos mesentéricos e aumento no baço podem estar relacionados, a migração do parasita pela via linfática e a diminuição absoluta no total de hipnozoítas recuperados ao longo do experimento, indicou que havia uma eliminação parcial do parasita nos órgãos durante a evolução do ciclo no hospedeiro vertebrado. Quanto ao baço, órgão onde foi observado um aumento progressivo, tanto do número absoluto quanto do relativo de parasitas recuperados, indica ser este, o órgão alvo de *C. ohioensis* no camundongo no presente trabalho. BRÖSIGKE (1981), observou que havia uma grande predileção de *C. rivolta* pelos linfonodos mesentéricos no 2°, 4°, 84°, 168° DAI, sendo observado no fígado no 3° e no 7° DAI. FREIRE & LOPES (1996), observaram esta relação de *C. felis* pelo baço e fígado, além de considerável recuperação de hipnozoíta na placa de Peyer e linfonodos mesentéricos, o que sugere a *C. rivolta* ser mais linfotrópica que *C. felis*. A análise da dinâmica de *C. ohioensis* indicou a possibilidade de ser usada a via hematogênica, devido ao rápido acesso do parasita ao baço entre o 1° e 3° DAI, observado pelo aumento do número de hipnozoítas recuperados (Tabela 1) e uma via linfática mais lenta de migração, observada pelo aumento do número de hipnozoítas recuperados a partir do 9° DAI (Tabela 1). Estes resultados indicam

ser a distribuição do *C. ohioensis* mais linfotrópica, semelhante ao observado por BÖSIGKE (1981) em *C. rivolta*.

As medidas médias do diâmetro maior (DM) dos hipnozoítas no 1° DAI não variaram ($p^3 0,05$), quando recuperados do intestino delgado, intestino grosso e placa de Peyer. Nota-se um aumento do DM ($p \leq 0,05$) dos hipnozoítas recuperados nos linfonodos mesentéricos e baço em relação aos recuperados em outros órgãos, tendo inclusive os hipnozoítas recuperados no baço o DM maior ($p \leq 0,05$), que os recuperados nos linfonodos mesentéricos (Tabela 2). No entanto, o diâmetro menor (dm) dos hipnozoítas recuperados no intestino delgado e baço foram semelhantes ($p^3 0,05$) no 1° DAI. Para este mesmo tempo o dm dos hipnozoítas recuperados nos linfonodos mesentéricos foi maior ($p \leq 0,05$), que ao recuperados no baço e intestino delgado (Tabela 2). Estas variações acarretaram em diferença no índice morfométrico (IM) dos hipnozoítas recuperados no baço ($p \leq 0,05$) em relação a outros órgãos (Tabela 2). Analisando os resultados das medidas dos hipnozoítas recuperados no 1° DAI, pode-se dizer que os recuperados no intestino delgado, intestino grosso, placa de Peyer e linfonodos mesentéricos tiveram formatos elipsoidal e semelhantes à forma de banana (Figura 3). Este formato foi também descritos para hipnozoítas de *C. felis* recuperados nos linfonodos mesentéricos de camundongos por FREIRE & LOPES (1996) e nos linfonodos mesentéricos e baço de coelhos por COSTA & LOPES (1994). No entanto, os hipnozoítas recuperados se caracterizaram pelo formato elipsoidal, em formatos comparados aos de uma banana, bas-

TABELA 2: Medidas dos diâmetro maior (DM), diâmetro menor (dm) e índice morfométrico (IM) dos hipnozoítas em vísceras de camundongos inoculados com 10^5 oocistos esporulados de *Cystoisospora ohioensis*.

DAI	Medidas ^a	Intestino delgado	Intestino grosso	Placa de Peyer	Linfonodo mesentérico	Baço
1	DM	6,29±0,92 (KX) ^b	6,62±0,84 (XY)	6,78±1,53 (KY)	9,46±1,45 (W)	11,33±1,76 (Z)
	dm	1,74±0,74 (KX)	2,04±1,00 (XWZ)	2,35±0,72 (KY)	3,06±0,64 (WY)	1,97±0,47 (KZ)
	IM	3,98±1,26 (KXY)	3,95±1,80 (XWZ)	3,21±1,50 (YW)	3,23±0,87 (WY)	6,06±1,70 (Z)
5	DM			6,26±0,81 (YW)	6,61±0,73 (W)	11,55±1,55 (Z)
	dm	-	-	2,62±0,57 (YW)	2,83±0,37 (W)	2,05±0,46 (Z)
	IM			2,50±0,64 (YW)	2,37±0,45 (W)	5,93±1,63 (Z)
14	DM				7,24±1,08*	11,87±1,06
	dm	-	-	-	2,64±0,33	2,37±0,40
	IM				2,77±0,50*	5,14±0,97
28	DM				7,20±0,92*	11,57±0,80
	dm	-	-	-	2,45±0,27	2,59±0,60
	IM				2,97±0,45*	4,47±0,93
35	DM				6,10±0,56*	11,69±1,59
	dm	-	-	-	2,78±0,58	3,42±1,32
	IM				2,29±0,61*	3,91±1,09

DAI = Dias após inoculação.

^aOs resultados são as médias obtida de dez medidas para cada dia de experimento.

^bMédias com mesma letra entre parêntese na linha não diferem significativamente ($p \geq 0,05$) ao Teste de Tukey.

*Médias nas linhas diferem significativamente ($P \leq 0,05$) ao Teste t de Student.

tão e raquete (Figura 3), dependendo do órgão e do tempo em que foi recuperado. Os hipnozoítas recuperados no baço tiveram aparência semelhante a um bastão com comprimento maior e largura menor em relação aos observados em outros órgãos. Este comportamento é também assinalado no 5º DAI, onde os hipnozoítas recuperados no baço tiveram suas medidas maiores ($p \leq 0,05$), em relação as dos recuperados na placa de Peyer e linfonodos mesentéricos (Tabelas 2). Quanto a estes resultados e o progressivo aumento do comprimento dos hipnozoítas recuperados nos intestinos, placa de Peyer, linfonodos mesentéricos e baço (Tabela 2) respectivamente, não foram encontrados dados na literatura consultada.

As dimensões reportadas por DUBEY & MEHLHORN (1978), para hipnozoítas de *C. ohioensis* mensuradas em cortes histológicos de linfonodos mesentéricos de camundongos experimentalmente infectados, quando comparadas aos deste experimento, foram menores no 1º DAI (5,8 x 2,1 mm). Ao contrário, BRÖSIGKE (1981) observou menores dimensões dos hipnozoítas de *C. rivolta*, recuperados em linfonodos mesentéricos de camundongos, através de digestão triptica, quando estes estavam desprovidos de vacúolo parasitífero. Estas diferenças podem estar relacionadas ao estado em que se encontra o hipnozoíta quando fixado, visto que, a movi-

mentação do parasita, observada a fresco após o processo de digestão, acarreta aumento do comprimento e diminuição da largura e vice e versa.

Uma diminuição do DM dos hipnozoítas recuperados nos linfonodos mesentéricos ao longo do experimento foi observado, levando-se em consideração que no 1º DAI o DM foi maior ($p \leq 0,05$) em relação ao outros dias em que se isolou o parasita e, concomitantemente, não foram observados diferenças ($p \geq 0,05$) nas medidas do dm dos hipnozoítas isolados, neste mesmo órgão, o que determinou uma diferença ($p \leq 0,05$) na comparação do IM no 1º DAI, em relação ao 5º e 35º DAI (Figura 1). A diferença das medidas do IM dos hipnozoítas recuperados no baço ao longo do experimento ocorreu entre o 35º DAI, em relação ao 1º e 5º DAI, devido a diferenças do dm ($p \leq 0,05$) no 35º DAI (Tabela 2), em relação ao 1º, 5º e 14º DAI e não as medidas do DM que foram semelhantes ($p \geq 0,05$) ao longo do experimento (Figura 2). Portanto, a diminuição do IM dos hipnozoítas recuperados nos linfonodos mesentéricos ocorreu devido a diminuição do DM dos hipnozoítas e nos recuperados no baço ocorreu devido a um aumento do dm, determinado provavelmente por uma tendência do hipnozoíta modificar sua forma ao longo da infecção. Diferenças nas dimensões dos hipnozoítas ao longo do período de infecção, fo-

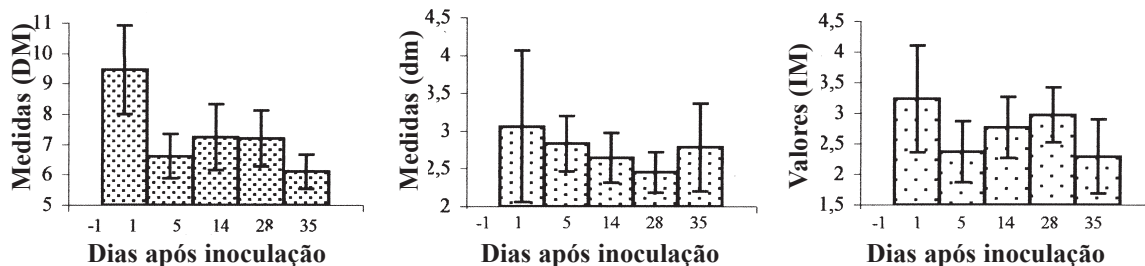


Fig. 1: Médias de dez medidas em micrômetro do diâmetro maior (DM), diâmetro menor (dm) e do respectivo índice morfométrico (IM), de hipnozoítas recuperados do linfonodo mesentérico de camundongos inoculados com 100.000 oocistos esporulados de *Cystoisospora ohioensis*.

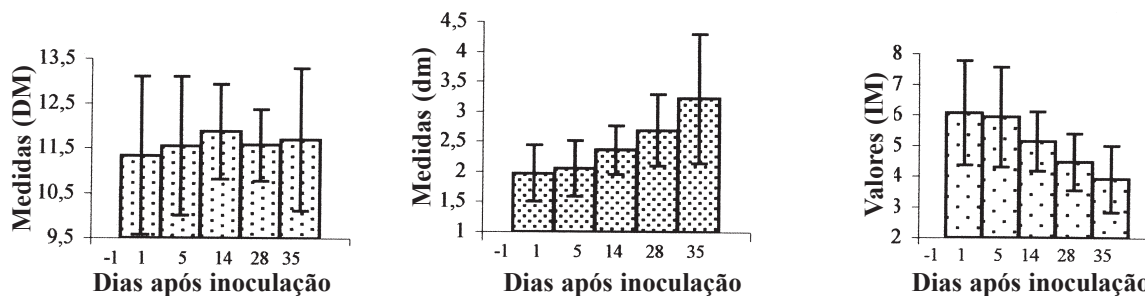


Fig. 2: Médias de dez medidas em micrômetro do diâmetro maior (DM), diâmetro menor (dm) e do respectivo índice morfométrico (IM), de hipnozoítas recuperados do baço de camundongos inoculados com 100.000 oocistos esporulados de *Cystoisospora ohioensis*.

ram também observadas por BRÖSIGKE (1981), COSTA & LOPES (1994) e FREIRE & LOPES (1996), em hipnozoítas de *C. rivolta* e *C. felis*, respectivamente.

Comparando-se as dimensões dos hipnozoítas de *C. ohioensis* ao longo do período, deste experimento, contrários aos resultados de DUBEY & MEHLHORN (1878), por observarem um aumento das dimensões dos hipnozoítas mensurados em cortes histológicos. O aumento das dimensões dos hipnozoítas nos cortes histológicos pode estar relacionado a presença do vacúolo parasitífero, como descrito por BRÖSIGKE (1981).

O aumento das medidas do dm dos parasitas do baço, ao longo da infecção, fez com que não ocorressem mais diferenças ($p > 0,05$) no 14º, 28º e 35º DAI, em relação aos linfonodos mesentéricos (Tabela 2). Embora, diminuindo as medidas médias do DM dos linfonodos mesentéricos ao longo da infecção, estes permaneceram maiores ($p \leq 0,05$), no 14º, 28º e 35º DAI, em relação aos do baço (Tabela 2), conseqüentemente o IM dos hipnozoítas recuperados nos linfonodos mesentéricos e baços permaneceram diferentes ($p \leq 0,05$), ao longo da infecção experimental (Tabela 2).

Não foram observados formas do parasita nos camundongos do grupo Controle.

SUMÁRIO

Foram estudadas isolamentos, caracterização morfológica e verificação da distribuição das formas sistêmicas de

Cystoisospora ohioensis no organismo de camundongos. Para tanto, foram usados 80 camundongos albinos divididos em dois grupos. Cada grupo contendo 40 camundongos distribuídos em oito gaiolas com cinco animais cada. Em um dos grupos, os camundongos foram inoculados por via oral, com 10^5 oocistos esporulados de *C. ohioensis*. O outro grupo foi inoculado também por via oral, com solução salina 0,9% de mesmo volume utilizado como veículo para os infectados, sendo utilizados como controle. Ambos os grupos receberam ração e água *ad libitum*. Nos dias 1, 3, 5, 9, 14, 21, 28 e 35 após inoculação (DAI) cinco animais de cada grupo foram sacrificados, necropsiados e seus órgãos triturados e digeridos artificialmente em pepsina ácida. Dos camundongos infectados foram recuperados hipnozoítas no 1º DAI nos intestinos delgado e grosso, sendo suas medidas de $6,29 \pm 0,92$ por $1,74 \pm 0,74$ e $6,62 \pm 0,84$ por $2,04 \pm 1,00$ mm, respectivamente. Os das placas de Peyer foram observados até o 5º DAI, onde mediram $6,26 \pm 0,81$ por $2,62 \pm 0,57$ mm. Até o 35º DAI foram recuperados hipnozoítas dos linfonodos mesentéricos e baço, onde mediram $6,10 \pm 0,56$ por $2,78 \pm 0,58$ e $11,69 \pm 1,59$ por $3,42 \pm 1,32$ mm, respectivamente. Os hipnozoítas recuperados tiveram diferenças morfológicas de acordo com os órgãos onde foram encontrados, bem como, com o tempo de infecção. Nenhum parasita foi observado nos órgãos dos animais do grupo controle.

PALAVRAS-CHAVE: *Cystoisospora ohioensis*, hipnozoítas, camundongos albinos, digestão péptica.

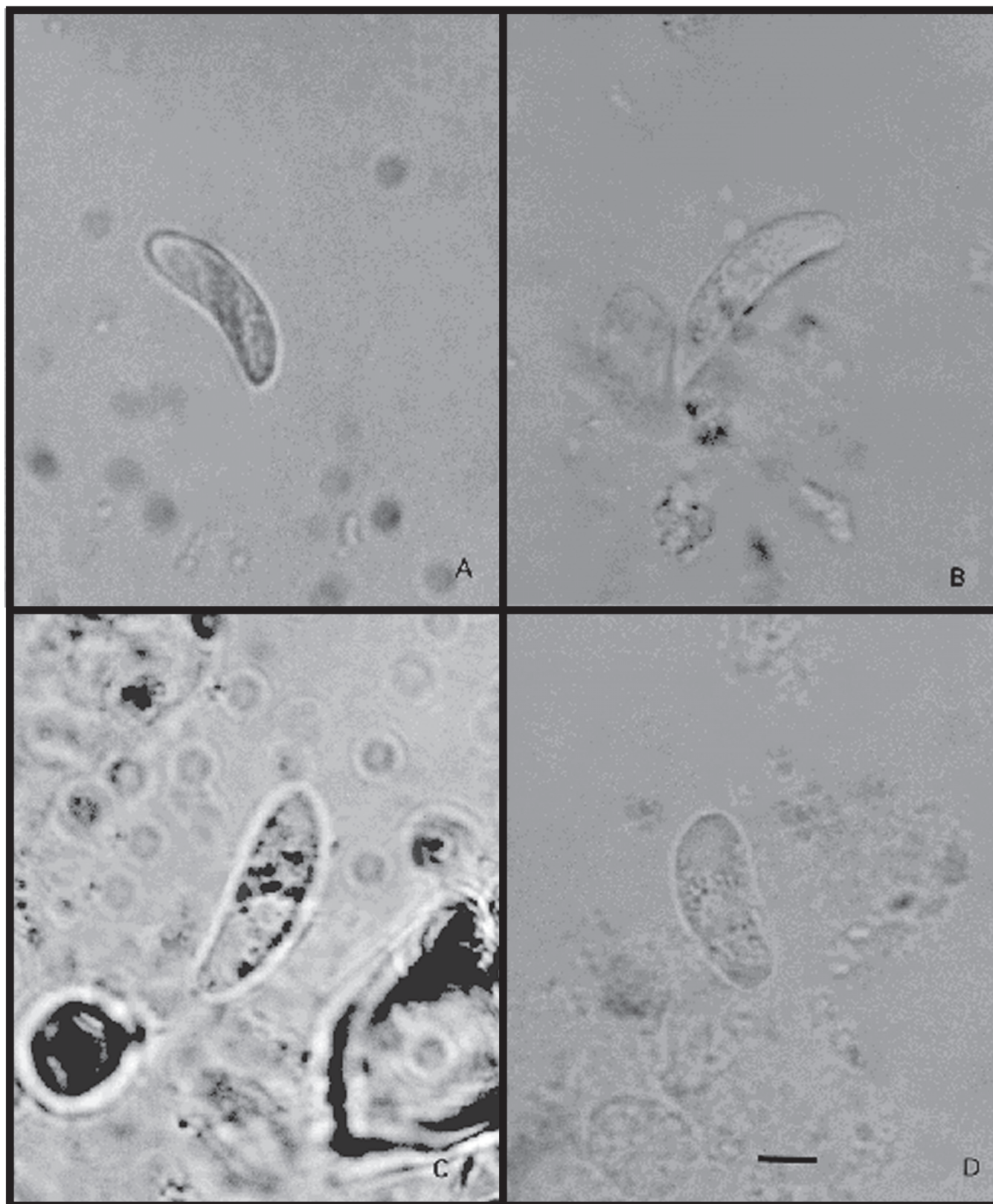


FIGURA 3: *Cystoisospora ohioensis* recuperados, através de digestão péptica, em órgãos de camundongos inoculados com 10^5 oocistos esporulados (— = 5 μ m): A) hipnozoíta, em forma de banana, com pouca granulação (amilopectina), núcleo não visível e recuperado na Placa de Peyer no 5º dia após inoculação DAI; B) hipnozoíta, em forma de bastão, granulado, com núcleo visível e recuperado de linfonodos mesentéricos no 5º DAI; C) hipnozoíta, em forma de bastão, com granulação, núcleo bastante visível e recuperado do baço no 14º DAI; D) hipnozoíta, em forma de raquete, granulado, com núcleo bem visível e recuperado no baço no 28º DAI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRÖSIGKE, S. (1981). *Untersuchungen an extraintestinalen entwicklungsstadien (Dormozoitien) von Cystoisospora rivolta der Katze in der Maus*. Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktor der Tierärztlichen, München, 37p
- BRÖSIGKE, S., HEINE, J. & BOCH, J. (1882). Der Nachweis extraintestinalen entwicklungsstadien (Dormozoitien) in extraintestinal mit *Cystoisospora rivolta* oozysten infizierten Mäusen. *Kleintier. Praxis.*, 27:25-34.
- COSTA, P.S. & LOPES, C.W.G. (1994). Hipnozoítas de *Cystoisospora felis* (Apicomplexa: Cystoisosporinae). *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, 1:35-36.
- DUBEY, J.P. (1977a). Taxonomy of *Sarcocystis* and other coccidia of cats and dogs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 170:778-782.
- DUBEY, J.P. (1977b). *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: Kreier, J. P., *Protozoa*. New York, Academic Press, 3:102-219.
- DUBEY, J.P. (1979). Life cycle of *Isospora rivolta* (Grassi, 1879) in cats and mice. *J. Protozool.*, 26:433-443.
- DUBEY, J.P. (1992). *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: Kreier, J. P., *Protozoa*. New York, Academic Press, 6:120-128.
- DUBEY, J.P. (1997). Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.*, 74:75-77.
- DUBEY, J.P. & FRENKEL, J.K. (1972). Extraintestinal stages of *Isospora felis* and *Isospora rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. *J. Protozool.*, 19:89-92.
- DUBEY, J.P. & MEHLHORN, H. (1978). Extraintestinal stages of *Isospora ohioensis* from dogs in mice, *J. Parasitol.*, 64:689-685.
- FAYER, R. & FRENKEL, J.K. (1979). Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidia: *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma*. *J. Parasitol.*, 65:756-762.
- FREIRE, R.B. & LOPES, C.W.G. (1995). Avaliação da digestão enzimática por pepsina e tripsina na obtenção de hipnozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Rev. Bras. Parasit. Vet.*, 4:21-23.
- FREIRE, R.B. & LOPES, C.W.G. (1996). Distribuição de hipnozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae) em camundongos albinos experimentalmente infectados. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 5:23-28.
- FRENKEL, J.K. (1977). *Besnoitia wallacei* in cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *J. Parasitol.* 63:611-628.
- FRENKEL, J.K. & DUBEY, J.P. (1972). Rodents as vector for feline coccidia, *Isospora felis* and *Isospora rivolta*. *J. Inf. Dis.*, 125:69-72.
- MARKUS, M. B. (1976). A term for extraintestinal stages of mammalian *Isospora* (Protozoa, Coccidia, Eimeriidae), *S. Afr. J. Sci.*, 72:219-220.
- MARKUS, M.B. (1978). Terminology for invasive stages of Protozoa of the subphylum Apicomplexa (Sporozoa). *S. J. Sci.*, 74:105-106