



d. 286  
AINFO



***Eimeria ninakohlyakimovae* YAKIMOFF &  
RASTEGAIIEFF, 1930 EMEND. LEVINE, 1961:  
BIOLOGIA, ULTRAESTRUTURA E ASPECTOS CLÍNICOS  
DA INFECÇÃO EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE  
INFECTADOS.**

***Luiz da Silva Vieira***

1996

T  
07/96  
VIE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



***Eimeria ninakohlyakimovae* YAKIMOFF &**

**RASTEGAIIEFF, 1930 EMEND. LEVINE, 1961: BIOLOGIA,  
ULTRAESTRUTURA E ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO  
EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.**

***Luiz da Silva Vieira***

**Orientador: Prof. José Divino Lima**

À Biblioteca  
do CNP Caprinos  
com os caprinos  
do autor  
Sobraf-CE, Julho/96  
Luiz Vieira

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências

BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS  
JULHO/ 96



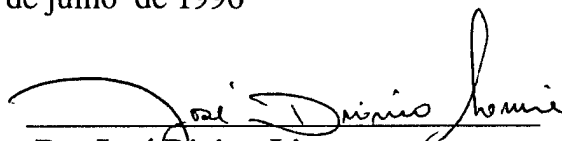
## ATA DE DEFESA DE TESE

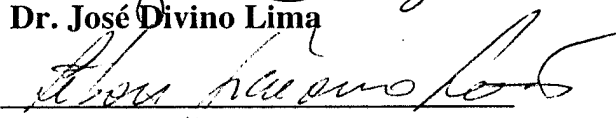
Ao primeiro dia do mês de julho de mil novecentos e noventa e seis , às 14:00 (quatorze) horas, na sala de Seminários do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, teve lugar a Defesa de Tese de **Luiz da Silva Vieira** , para obtenção do grau de Doutor em Ciências. A Tese, intitulada "*Eimeria ninakohyakimovae* Yakimoff & Rastegaieff, 1930 Emend. Levine, 1961: Biologia, ultraestrutura e aspectos clínicos da infecção em caprinos experimentalmente infectados", foi examinada pelos Doutores José Divino Lima (Orientador ), Zelson Giacomo Loss, José Roberto Carneiro, Ricardo Wagner de Almeida Vitor e Múcio Flávio Barbosa Ribeiro . Dando início aos trabalhos o Orientador solicitou ao candidato a exposição de sua Tese. Em seguida, houve arguição por todos os examinadores, que se reuniram para decidir sobre o resultado final.

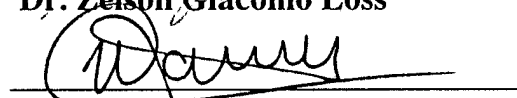
O candidato foi considerado APROVADO

Belo Horizonte, 01 de julho de 1996

A Comissão:

  
Dr. José Divino Lima

  
Dr. Zelson Giacomo Loss

  
Dr. José Roberto Carneiro

  
Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

  
Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

À Deus, por tudo que existe no Universo,

Aos meus filhos

Luise, Lucas e Laise, razão de persistir com honestidade em tudo que pretendo alcançar,

À minha esposa

Fátima, pelo estímulo, compreensão e companheirismo constante,

Aos meus pais

Roque *In memórian* e Terêsa, pelo exemplo, dedicação e amor na minha formação moral e profissional,

Aos meus irmãos

Zé *In memórian*, Lena e Lurdinha, pelo apoio e incentivo,

Dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, pela oportunidade proporcionada para realização do curso de doutorado e pelas facilidades fornecidas para execução deste Trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão de suporte financeiro, para execução deste Trabalho.

Ao Professor Dr. José Divino Lima, pela orientação, convívio e estímulo que proporcionaram a execução deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram, incentivaram ou apoiaram na realização deste trabalho, sabem o quanto sou grato...

**OBRIGADO.**

## **ABREVIATURAS USADAS**

<b>AP:</b>	Anel polar posterior
<b>CED:</b>	Corpos elétron-densos
<b>CO:</b>	Conóide
<b>CR:</b>	Corpo residual
<b>CT:</b>	Cromatina
<b>DAI:</b>	Dias após a infecção
<b>F:</b>	Flagelos
<b>GP:</b>	Grânulos de polissacarídeos
<b>H&amp;E:</b>	Hematoxilina - eosina
<b>M:</b>	Microgamonte
<b>MA:</b>	Macrogameta
<b>MC:</b>	Macrogamonte
<b>ME:</b>	Meronte
<b>MG:</b>	Microgameta
<b>MH:</b>	Mitocondria da célula hospedeira
<b>MI:</b>	Micronemas

<b>MN:</b>	Migração de núcleos
<b>MP:</b>	Microporo
<b>MT:</b>	Meronte imaturo
<b>MZ:</b>	Merozoíto
<b>NG:</b>	Núcleo do microgameta
<b>NH:</b>	Núcleo da célula hospedeira
<b>NM:</b>	Núcleo do microgamonte
<b>NP:</b>	Núcleo do parasito
<b>NU:</b>	Nucléolo
<b>O:</b>	Oocisto
<b>OOPG:</b>	Oocistos por grama de fezes
<b>R:</b>	Roptria
<b>T:</b>	Trofozoíto
<b>V:</b>	Vacuolo elétron-lúcido
<b>VP:</b>	Vacuolo parasitóforo
<b>WFBI:</b>	Corpos formadores de parede tipo I
<b>WFBII:</b>	Corpos formadores de parede tipo II

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
<b>PRANCHA I:</b> Primeira geração merogônica de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , no íleo de cabritos experimentalmente infectados.	<b>41</b>
<b>PRANCHA II:</b> Merontes primários maduros e merozoítos de primeira geração de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , no íleo de cabritos experimentalmente infectados.	<b>42</b>
<b>PRANCHA III:</b> Segunda geração merogônica de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais das criptas do ceco e do cólon de cabritos experimentalmente infectados.	<b>43</b>
<b>PRANCHA IV:</b> Gametogênese e formação de oocistos de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais das criptas do ceco e do cólon de cabritos experimentalmente infectados.	<b>44</b>
<b>PRANCHA V:</b> Ultraestrutura da segunda geração merogônica de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais das criptas do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>45</b>



<b>PRANCHA VI:</b>	Ultraestrutura de diferentes estágios de merogonia secundária de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>46</b>
<b>PRANCHA VII:</b>	Ultraestrutura de merozoítos de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>47</b>
<b>PRANCHA VIII:</b>	Ultraestrutura de merozoítos de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>48</b>
<b>PRANCHA IX,</b>	Ultraestrutura de microgamontes de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>49</b>
<b>PRANCHA X:</b>	Ultraestrutura de microgamontes de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em diferentes estágios de desenvolvimento nas células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>50</b>

<b>PRANCHA XI:</b>	Formação de microgametas de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado	<b>51</b>
<b>PRANCHA XII:</b>	Formação de microgametas de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>52</b>
<b>PRANCHAS XIII:</b>	Ultraestrutura de microgametas de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>53</b>
<b>PRANCHA XIV:</b>	Ultraestrutura de microgametas de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>54</b>
<b>PRANCHAS XV:</b>	Ultraestrutura de macrogamontes de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>55</b>
<b>PRANCHA XVI:</b>	Formação de macrogametas de <i>E. ninakohlyakimovae</i> , em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.	<b>56</b>

**PRANCHA XVII:** Formação da parede do oocisto de *E. ninakohlyakimovae*, em células epiteliais do ceco e do cólon de cabrito experimentalmente infectado.

**57**

## RESUMO

O desenvolvimento endógeno, ultraestrutura, curso e aspectos clínicos da infecção por *E. ninakohlyakimovae* foram estudados em 49 cabritos com idade entre uma e três semanas, inoculados experimentalmente com  $5,0 \times 10^4$ ;  $1,5 \times 10^5$ ;  $2,0 \times 10^5$  e  $9,0 \times 10^5$  oocistos esporulados / kg. Em 25 cabritos sacrificados a intervalos de 24 ou 48 horas do 2º até o 18º dia após a inoculação (DAI), observaram-se à microscopia óptica em cortes corados por HE, duas gerações merogônicas, gametogênese e formação de oocistos. Os merontes primários desenvolveram-se no íleo, localizando-se nas células endoteliais dos vasos quilíferos das vilosidades, na lâmina própria e nos vasos linfáticos da submucosa. Merontes maduros, com  $165,5 \times 123,6 \mu\text{m}$ , foram observados a partir de 10 DAI. A segunda geração merogônica desenvolveu-se no epitélio das críptas do ceco e do cólon; e os merontes maduros, com  $16,8 \times 11,6 \mu\text{m}$ , foram encontrados a partir de 12 DAI. A gametogênese ocorreu no epitélio do ceco e do cólon; microgamontes maduros, com  $16,1 \times 13,0 \mu\text{m}$ , contendo vários microgametas, macrogametas, com  $14,7 \times 12,5 \mu\text{m}$ , e oocistos imaturos, com  $18,3 \times 13,3 \mu\text{m}$ , foram observados a partir de 13 DAI.

O curso da infecção foi determinado em 18 cabritos examinados diariamente até 24 DAI. O período prepatente foi de 14,7 (13-17) dias e o patente de 6,8 (4-10) dias. A esporulação dos oocistos a 30°C e aeração constante foi de dois a

três dias. Os cabritos inoculados com  $2,0 \times 10^5$  oocistos / kg, a partir do 13° DAI, apresentaram fezes diarréicas (com odor fétido, de coloração marrom escura e presença de sangue e muco), falta de apetite, desidratação, pêlos arrepiados e debilidade orgânica generalizada. Um animal deste grupo morreu no 16° DAI. Num período de 24 dias, animais infectados com  $1,5 \times 10^5$  oocistos esporulados / kg ganharam 1,8 kg em média; e o grupo não infectado ganhou 2,1 kg no mesmo período. Os cabritos inoculados com  $5,0 \times 10^4$  e  $9,0 \times 10^5$  oocistos / kg, apresentaram apenas diarréia de coloração amarelo-amarronzada. As lesões macroscópicas observadas no cabrito que morreu com 16 DAI e, nos necropsiados a partir de 15 DAI, consistiram de espessamento da mucosa do ceco e do cólon, edema, hemorragia e hiperemia. Histologicamente, observaram-se descamação do epitélio das criptas, com hemorragia, edema e necrose. No intestino delgado, não foram verificadas alterações micro ou macroscópica.

A ultraestrutura de estágios endógenos de *E. ninakohlyakimovae* foi estudada em um cabrito inoculado com  $2,0 \times 10^5$  oocistos/kg, necropsiado com 15 DAI. Os merozoítos são formados na superfície dos merontes multinucleados. Os merozoítos livres no vacúolo parasitóforo apresentam membrana dupla, conóide, um par de roptrias, micronemas, microporo, anel polar anterior e posterior, corpos densos, grânulos de polissacarídeos e núcleo com nucléolo central e cromatina periférica. Os microgamontes contêm vários núcleos localizados na periferia. Os microgametas são constituídos por um corpo, núcleo, três flagelos e mitocôndria. Os macrogamontes possuem um núcleo central volumoso, com nucléolo proeminente. Os macrogametas

contêm núcleo, grânulos formadores de parede tipo I (WFB I), tipo II (WFB II) e grânulos de polissacarídeos. Os oocistos apresentam parede dupla e esporonte com grânulos de polissacarídeos.

## CONTEÚDO

	Páginas
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
2.1. Geral	5
2.2. Específicos	5
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>6</b>
3.1. Taxonomia e morfologia de oocistos esporulados de <i>Eimeria ninakohlyakimovae</i>	6
3.2. Prevalência de <i>E. ninakohlyakimovae</i> .	7
3.3. Biologia dos coccídios de caprinos	9
3.3.1. <i>E. ninakohlyakimovae</i> .	10
3.3.2. <i>Eimeria arloingi</i>	11
3.3.3. <i>Eimeria alijevi</i>	12
3.3.4. <i>Eimeria christensenii</i>	12
3.3.5. <i>Eimeria caprina</i>	13
3.3.6. <i>Eimeria apsheronica</i>	13
3.4. Manifestações clínicas e patologia dos eimeriídeos de caprinos	13

	<b>Páginas</b>
3.4.1. <i>E. ninakohlyakimovae</i>	14
3.4.2. <i>E. arloingi</i>	14
3.4.3. <i>E. alijevi</i>	15
3.4.4. <i>E. christenseni</i>	15
3.4.5. <i>E. caprina</i>	16
3.4.6. <i>E. apsheronica</i>	16
3.5. Ultraestrutura de coccídios	16
3.5.1. Ultraestrutura de merontes e merozoítos	17
3.5.2. Ultraestrutura da microgametogênese	19
3.5.3. Ultraestrutura da macrogametogênese e formação de oocistos	20
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
4.1. Locais de execução	21
4.2. Obtenção de oocistos de <i>E. ninakohlyakimovae</i>	22
4.3. Obtenção do inóculo de <i>E. ninakohlyakimovae</i>	22
4.4. Animais utilizados para infecção experimental	24
4.5. Inoculação dos animais experimentais	25
4.6. Necrópsia e colheita de material	26
4.7. Coccidiose experimental	27
4.8. Processamento de material para microscopia óptica	27



	<b>Páginas</b>
4.9. Processamento de material para microscopia eletrônica	<b>28</b>
4.9.1. Fixação	<b>28</b>
4.9.2. Pós-fixação	<b>28</b>
4.9.3. Desidratação	<b>29</b>
4.9.4. Infiltração e inclusão	<b>29</b>
4.9.5. Ultramicrotomia	<b>30</b>
4.9.6. Contrastação	<b>31</b>
4.9.7. Processamento fotográfico para documentação	<b>31</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
5.1. Desenvolvimento endógeno de <i>E. ninakohlyakimovae</i>	<b>32</b>
5.2. Curso da infecção por <i>E. ninakohlyakimovae</i>	<b>34</b>
5.3. Achados de necrópsia	<b>36</b>
5.4. Alterações histológicas	<b>36</b>
5.5. Ultraestrutura	<b>37</b>
5.5.1. Desenvolvimento de merozoítos e ultraestrutura de merontes secundários	<b>37</b>
5.5.2. Ultraestrutura de merozoítos	<b>38</b>
5.5.3. Ultraestrutura de microgamontes e formação de microgametas	<b>38</b>
5.5.4. Ultraestrutura de microgametas	<b>39</b>
5.5.5. Desenvolvimento e ultraestrutura de macrogametas e oocistos	<b>40</b>

	<b>Páginas</b>
<b>6. PRANCHAS</b>	<b>41</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
7.1. Desenvolvimento endógeno de <i>E. ninakohlyakimovae</i>	<b>58</b>
7.2. Curso da infecção	<b>59</b>
7.3. Período de esporulação	<b>61</b>
7.4. Lesões	<b>61</b>
7.5. Dose infectante	<b>61</b>
7.6. Contaminação por <i>Cryptosporidium</i>	<b>62</b>
7.7. Ultraestrutura	<b>63</b>
7.7.1. Ultraestrutura de merontes e merozoítos	<b>63</b>
7.7.2. Microgametogênese e microgametas	<b>64</b>
7.7.3. Macrogametogênese e oocistos	<b>64</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>68</b>
<b>10. APÊNDICES</b>	<b>86</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1. INTRODUÇÃO**

O rebanho caprino brasileiro é estimado em 11.894.587 cabeças, das quais 10.677.129 (89,8%) estão no Nordeste (Fundação IBGE, 1992), onde são tradicionalmente criados em sistema extensivo, para a produção de carne, principalmente para a subsistência das populações de baixa renda.

Os caprinos fornecem alimentos de alto valor proteico (carne e leite) e ainda complementam a renda familiar do produtor, através da venda de animais vivos, peles e esterco, tornando-se a caprinocultura numa atividade de relevante importância sócio-econômica em todo o país, especialmente no Nordeste.

Além da importância social, a exploração caprina vem despertando interesse em outras regiões, principalmente no Centro Sul e Sul, prioritariamente para a produção de leite e derivados. Nessas regiões, e mesmo no Nordeste, os caprinos estão gradativamente sendo introduzidos em sistemas de criações semi-intensivo e intensivo, associados ao melhoramento genético do rebanho, através da introdução de raças importadas com aptidão para a produção de leite.

O advento da caprinocultura leiteira e conseqüentemente as mudanças no sistema de criação, aumentaram a incidência e a gravidade dos problemas sanitários que afetam a caprinocultura, limitando a produção e a produtividade do rebanho caprino, exigindo a busca de medidas de controle urgentes e mais eficazes. Neste contexto, a eimeriose, ocupa um lugar de destaque.

A eimeriose, causada por protozoários coccídicos homoxenos do gênero *Eimeria*, ocorre principalmente em animais jovens e é caracterizada por alterações intestinais, diminuição do apetite, redução no desenvolvimento corporal e morte (LIMA, 1991a). Em condições naturais, a parasitose pode ser adquirida logo após o nascimento, e são freqüentes os casos de eimeriose em cabritos de um a três meses de idade, sendo comum encontrar até 50% dos animais nesta faixa etária com sintomas da doença (LLOYD & SOULSBY, 1978). Os animais mais velhos, que tiveram a parasitose quando jovens, desenvolvem imunidade contra as espécies que os infectaram, porém continuam eliminando oocistos, constituindo-se nas principais fontes de infecção, principalmente para os jovens, que são os mais susceptíveis (LIMA 1980).

A mortalidade, geralmente, é baixa, ficando em torno de 10% dos animais infectados (LIMA, 1980). Porém, em animais jovens, em determinadas circunstâncias, a mortalidade pode ser mais de 20% (SIVADAS et al., 1965). LIMA (1979), observou em Illinois, Estados Unidos, que a eimeriose era a segunda causa de mortalidade em cabritos com menos de seis meses de idade, perdendo apenas para os problemas respiratórios multifatoriais.

A coccidiose caprina é responsável por elevadas perdas econômicas decorrentes da mortalidade e do desempenho insatisfatório dos animais (LIMA, 1991a). De acordo com FITZGERALD (1980), a queda na produtividade representa, às vezes, maior prejuízo econômico do que a própria mortalidade.

É uma parasitose de distribuição mundial, atingindo caprinos submetidos aos mais diferentes sistemas de exploração. O número de espécies e a prevalência de cada uma, variam com a região, mas os eimerídeos têm sido encontrados em todas as áreas estudadas. As infecções são geralmente mistas e, nos

casos clínicos, é comum a presença de mais de uma espécie de *Eimeria* (LIMA, 1991a;b).

As espécies de eimerídeos de caprinos são identificadas de acordo com as suas características morfológicas, observadas nos oocistos esporulados, visto que a biologia desses protozoários é desconhecida para a maioria das espécies. A maior parte dos conhecimentos existentes sobre o desenvolvimento endógeno dos coccídios de caprinos é obtida de achados em animais necropsiados em laboratório de diagnóstico, geralmente portadores de infecções mistas, adquiridas naturalmente (LIMA, 1979).

A *Eimeria ninakohlyakimovae* YAKIMOFF & RASTEGAIIEFF, 1930 emend. LEVINE, 1961, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada com prevalências bastante elevadas em todos os países estudados (OSMAN et al. 1972; LIMA, 1979; MAGI et al., 1986; CHHABRA & PANDEY, 1991; SONG et al., 1991). Tem sido freqüentemente associada com coccidiose em caprinos, sendo considerada patogênica para animais de todas as faixas etárias (AUMONT et al., 1984). Entretanto, a sua biologia ainda não está completamente elucidada. As informações existentes na literatura são escassas, incompletas e, algumas vezes, questionáveis, devido a identificação duvidosa do parasito observado nas infecções naturais ou, raramente, nas experimentais (BALOZET 1932a; b; c; SAYIN, 1964; LEVINE & IVENS, 1970; QADIR, 1980; NORTON, 1986).

O conhecimento da biologia de determinado parasito é de fundamental importância para o desenvolvimento de programas de controle da doença e, conseqüentemente, para o aumento da produtividade do rebanho. Neste sentido, o presente trabalho foi proposto, para estudar a biologia e a ultraestrutura

dos estágios de desenvolvimento endógeno de *E. ninakohlyakimovae*, em cabritos experimentalmente infectados, através de microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

## **2. OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Estudar o ciclo endógeno de *E. ninakohlyakimovae*, em caprinos jovens experimentalmente infectados, através de microscopias óptica e eletrônica de transmissão.

### **2.2. Específicos**

- Localizar, caracterizar e descrever os diferentes estágios endógenos de *E. ninakohlyakimovae*, em cabritos infectados experimentalmente, em microscópio óptico.
- Descrever a ultraestrutura de estágios endógenos de *E. ninakohlyakimovae*, utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar os aspectos clínicos da doença causada por *E. ninakohlyakimovae*, em infecção experimental.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 - Taxonomia e morfologia de oocistos esporulados de *Eimeria ninakohlyakimovae*

*Eimeria ninakohlyakimovae* , um dos agentes etiológicos da eimeriose caprina, foi descrita pela primeira vez por YAKIMOFF & RASTEGAIEFF (1930), na Rússia. É um protozoário homoxeno, intracelular obrigatório do trato intestinal de caprinos, pertencente ao Filo Apicomplexa, LEVINE, 1970 por possuir um complexo apical; à classe Conoidasida LEVINE, 1988 por apresentar conóide no complexo apical; à subclasse Coccidia LEUCKART, 1879 por possuir gamontes e gametas pequenos, intracelulares e cujo ciclo evolutivo pode ser constituído de merogonia, gametogonia e esporogonia; à ordem Eucoccidiida LÉGER & DUBOSQ, 1910 por apresentar merogonia; à subordem Eimeriina LÉGER, 1911 por possuir gametas que evoluem separadamente sem sizígia e microgamontes que produzem grande número de microgametas; e à família Eimeriidae MINCHIN, 1903 por evoluir no interior das células hospedeiras e não apresentar organelas de adesão ou tubo vaginal.

Os oocistos esporulados do protozoário possuem quatro esporocistos, com dois esporozoítos em cada um deles. São de forma elipsoidal, subesférico ou

ligeiramente ovóide, normalmente achatados na região da micrópila, com parede lisa, constituída por duas camadas, a externa com 0,8 (0,7 a 1,0)  $\mu\text{m}$  de espessura e coloração ligeiramente amarelada ou incolor; a interna com 0,5 (0,4 a 0,6)  $\mu\text{m}$  de espessura e tem coloração marrom amarelada ou marrom escuro. Micrópila presente, com diâmetro de 4,0(3,0 a 6,0)  $\mu\text{m}$  e ausência de capuz micropilar. Medem 23,6(19,5 a 28,1) x 18,6(16,5x20,7)  $\mu\text{m}$ , com índice morfométrico (proporção comprimento/largura) de 1,3 (1,1 a 1,5) e presença de um ou mais grânulos polares. Os esporocistos são de forma ovóide alongada e medem 12,3(9,8 a 14,6) x 6,5 (5,5 a 8,5)  $\mu\text{m}$ , com índice morfométrico 1,9 (1,3 a 2,4). Corpo de “Stieda” presente, e presença de resíduo. Os esporozoítos são alongados, estão situados longitudinalmente nos esporocistos e contêm dois glóbulos claros, um pequeno e um grande (LIMA, 1979).

### **3.2. Prevalência de *Eimeria ninakohlyakimovae***

*E. ninakohlyakimovae* foi encontrada em 34% de 41 caprinos na Tunísia por BALOZET (1932a); SVANBAEV (1957), encontrou-a em 31% de 48 caprinos na Rússia; MERDIVENCI (1959), em 36% de um rebanho caprino na Turquia; SHAH & JOSHI (1963), em 12% de 300 caprinos na Índia; WIESENHUTTER (1965), em 60% de 413 caprinos na Síria; SAYIN (1966), em 25% de 900 caprinos da raça Angorá na Turquia; JHA & SUBRAMANIAN (1966), em 53% de 243 caprinos na Índia; CHEVALIER (1966) em 12% de 40 caprinos na Alemanha; VASSILIADÈS (1969), diagnosticou-a em caprinos do Senegal; TSAGLIS (1970); observou-a em caprinos na Grécia; OSMAN et al.; (1972), encontraram-na em 81% de um rebanho caprino da Somália; MISRA &

MOHAPATRA (1972), em 25% de 100 caprinos na Índia; ERMATOVA (1978), encontrou-a em um rebanho caprino da Rússia; LLOYD & SOULSBY (1978), observaram-na em caprinos dos Estados Unidos; LIMA (1979), em 33% de 318 caprinos dos Estados Unidos; KORKIN et al.,(1979), em 74% de um rebanho caprino na Rússia; OPOKU-PARE & CHINEME (1979), encontraram-na em caprinos na Nigéria; MUSSAEV & MAMEDOVA (1981), em 25% de 143 caprinos da Rússia; KSIHIRSSAGAR (1981), diagnosticou-a em caprinos na Índia; VERCRUYSSSE (1982), em 56% de 577 caprinos no Senegal; LIMA et al., (1983), determinaram-na em caprinos de Minas Gerais; SANTANA & PEREIRA (1984); observaram-na em caprinos de Pernambuco; PIRES & LOPES (1985); em 39% de um rebanho caprino no Rio de Janeiro; VUJIC & ILIC (1985), observaram-na em caprinos da Iugoslávia; CHAPLIN et al., (1985), diagnosticaram-na em caprinos no Rio Grande do Sul; NORTON (1986), em 48% de 422 caprinos na Inglaterra; HAYAT et al., (1986), encontraram-na em caprinos no Paquistão; SAYIN et al., (1986), em 22,3% de 353 caprinos na Turquia; BAHIRATHAN et al.,(1986), em 20% de um rebanho caprino dos Estados Unidos; MACHADO et al., (1987), diagnosticaram-na em caprinos de Minas Gerais; GUILLOU & LE GILLOU (1987), encontraram-na em caprinos na França; VIHAN et al.,(1988), em 17,56% de 205 caprinos na Índia; FAYE-GRANDJEAN (1988), observaram-na em caprinos na França; O'CALLAGHAN (1989), em 51% de 497 caprinos na Austrália; WANG & SU (1989), em 35,4% de 147 caprinos na China; GULER et al.,(1990), em 44,2% de 147 caprinos na Turquia; ALVARADO et al.,(1990), detectaram-na em caprinos da Costa Rica; RALKOVIC-JANJE & JOVANOVIC-BUNTA (1990), encontraram-na em caprinos da Iugoslávia; ISKAKOV (1990), observaram-na em caprinos da Rússia; SONG et al., (1991), em 76,3% de 565

caprinos na China; WARUIRU et al (1991), em 64,7% de 1910 caprinos do Kenya; CHHABRA & PANDEY (1991), em 99% de 2.607 caprinos jovens e adultos do Zimbabwe, sendo a segunda espécie mais prevalente neste levantamento; CHARTIER((1991), encontrou-a em caprinos da França; REBOUÇAS et al., (1992), observaram-na em caprinos de São Paulo; GITHIGIA et al., (1992), em 23% dos caprinos adultos e 24,3% dos jovens, de um rebanho de 159 animais do Quênia; CARDOSO et al., (1993), em 18,8% de 53 caprinos do Rio Grande do Sul; KANYARI (1993), em 35,2% de um rebanho caprino do Quênia; THAKUR et al., (1993), relataram-na em caprinos da Ásia; WOJI et al.,(1994), em 11% de um rebanho caprino da Nigéria e CAVALCANTE & LOPES (1995), em 15,9% de um rebanho caprino do Ceará.

### **3.3. Biologia dos eimeriídeos de caprinos**

O ciclo evolutivo das espécies do gênero *Eimeria* se completa em três fases distintas de desenvolvimento. Uma fase, a esporogônica, ocorre fora do hospedeiro, no meio ambiente e corresponde à esporulação dos oocistos eliminados com as fezes. As outras duas, a merogônica e a gametogônica, ocorrem nos tecidos do hospedeiro, iniciam-se após a ingestão de oocistos esporulados e terminam com a produção de novos oocistos que são expulsos junto com as fezes (LIMA, 1980).

A duração do ciclo, o número de gerações merogônicas, morfologia dos estágios endógenos e histotropismo variam com a espécie de *Eimeria*. O ciclo evolutivo completo é desconhecido para a maioria dos eimeriídeos de caprinos. Informações isoladas sobre a presença de estágios endógenos, em animais natural ou experimentalmente infectados e cuja identidade é atribuída, quase sempre, às

espécies correspondente aos oocistos presentes na fezes, representam a grande parte do conhecimento sobre o ciclo evolutivo desse parasitos (LIMA, 1991a). Este fato se deve ao pequeno número de infecções experimentais realizadas com estes animais (LIMA, 1980).

### 3.3.1. *Eimeria ninakohlyakimovae*

BALUZET (1932b;c), na Tunísia, descreveu a presença de merontes, microgamontes e macrogametas de *E. ninakohlyakimovae*, nas células epiteliais das glândulas de Lieberkühn do duodeno, em um caprino infectado experimentalmente e necropsiado no 39º dia após a inoculação (DAI). Os merontes e microgamontes mediram respectivamente, 15 a 35 µm e 45 µm de diâmetro. O período prepatente foi de 10 a 13 dias e, a esporulação dos oocistos ocorreu entre três e quatro dias. Posteriormente, SAYIN (1964), observou na Turquia, merontes, gamontes, macro e microgametas e oocistos de *E. ninakohlyakimovae*, em um caprino da raça Angorá, naturalmente infectado. Todos os estágios localizavam-se nas células epiteliais do íleo, ceco e cólon. Os merontes mediram 37 (31 a 43) x 26,5 (22 a 31) µm e os microgamontes e macrogametas mediram, respectivamente, 22,5 (20 a 25) x 16,5 (15 a 18) µm. e 13,5 (9 a 18) x 10 (7 a 13) µm. O período de esporulação dos oocistos foi de três a quatro dias. KHAN et al., (1973), observaram no Paquistão esporozoítos e merontes em células epiteliais e nos vasos quilíferos das vilosidades do intestino delgado e no ceco de um caprino naturalmente infectado com *E. ninakohlyakimovae*. NORTON (1986), na Inglaterra, inoculou um caprino com 5.000 oocistos esporulados de *E. ninakohlyakimovae* e observou merontes secundários, gamontes, microgamontes, macrogametas e oocistos nas

células epiteliais das criptas do ceco e do cólon no 17º DAI. O período prepatente foi de 17 dias. YABIN et al., (1991), na China, encontraram oocistos de coccídios na bile e estruturas similares aos merontes no ducto biliar de caprinos infectados naturalmente e experimentalmente com eimerídeos. Os merontes mediram 200 x 147 µm e os oocistos mediram 21,3 x 18,3 µm e eram semelhantes, segundo os autores, aos de *E. ninakohlyakimovae*.

### **3.3.2. *Eimeria arloingi***

DEIANA & DELITALA (1953), descreveram o desenvolvimento de *E. arloingi*, no intestino delgado de caprinos. GILL & KATIVAR (1961), encontraram estágios sexuais de *E. arloingi*, no íleo de caprinos naturalmente infectados, durante um surto de coccidiose aguda na Índia. SAYIN (1965), descreveu na Turquia, formas endógenas de *E. arloingi*, constituídas por merontes, micro e macrogametas e oocistos em um caprino de raça Angorá, naturalmente infectado. SHARMA (1966), descreveu os estágios sexuais de *E. arloingi* em caprinos portadores de infecção natural. Posteriormente SAYIN et al., (1978; 1979; 1980), estudaram o ciclo biológico completo de *E. arloingi* em cabritos experimentalmente infectados. O ciclo endógeno, foi constituído por duas gerações merogônicas, gametogênese e formação de oocistos. Os merontes primários foram encontrados nas células endoteliais dos vasos quilíferos das vilosidades intestinais e nas placas de Peyer do intestino delgado, e nos linfonodos mesentéricos. A segunda geração merogônica, gametogênese e oocistos desenvolveram-se nas células epiteliais das vilosidades e criptas do intestino delgado.



### 3.3.3. *Eimeria alijevi*

PANDE et al., (1964), na Índia, descreveram a presença de merontes de tamanho pequeno, gametócitos e oocistos de *Eimeria alijevi*, nas criptas do cólon de um cabrito naturalmente infectado. SAYIN (1966), descreveu na Turquia, a presença de merontes, gamontes e oocistos de *E. alijevi* em caprinos infectados experimentalmente. Os merontes estavam localizados nas células epiteliais das vilosidades do intestino delgado e os microgamontes, macrogametas e oocistos desenvolveram nas células epiteliais do íleo, ceco e cólon. Os merontes primários maduros mediram 180 x 260 µm e os secundários, 15 a 18 x 9 a 12 µm. Os microgamontes e macrogametas mediram respectivamente, 14 a 18 x 9 a 14 e 22 a 25 x 15 a 20 µm.

### 3.3.4. *Eimeria christenseni*

LIMA (1979, 1981), descreveu em Illinóis - Estados Unidos, o ciclo evolutivo de *Eimeria christenseni*, em caprinos infectados experimentalmente. Os merontes primários desenvolveram-se nas células endoteliais dos vasos quilíferos do intestino delgado e nos linfonodos mesentéricos e, os secundários, nas células epiteliais das glândulas de Liberkuhn e nas vilosidades do jejuno, íleo e nos linfonodos mesentéricos. Os estágios sexuais e oocistos localizavam-se nas células epiteliais das vilosidades e criptas do jejuno e íleo.

### **3.3.5. *Eimeria caprina***

NORTON (1986), na Inglaterra infectou um caprino experimentalmente com oocistos esporulados de *E. caprina* e observou gamontes e oocistos na mucosa do ceco, cólon e reto no 20° DAI.

### **3.3.6. *Eimeria apsheronica***

KANYARI (1990), descreveu na Austrália o ciclo evolutivo de *Eimeria apsheronica* em caprinos experimentalmente infectados. A primeira geração merogônica foi encontrada na base das vilosidades do intestino delgado, nos linfonodos mesentéricos e, ocasionalmente no intestino grosso. Os merontes secundários, microgamontes, macrogametas e oocistos desenvolveram-se no epitélio das vilosidades do duodeno ao ceco. Os merontes primários, secundários, macrogametas, microgamontes, e oocistos maduros, mediram respectivamente 125 x 82; 26,2 x 18,9; 24,7 x 18,5; 30,2 x 21,7 e 26,6 x 19,3  $\mu\text{m}$ .

## **3.4. Manifestações clínicas e patologia dos eimerídeos de caprinos**

Os efeitos patogênicos dos coccídios de caprinos são desconhecidos para a maioria das espécies descritas. Nos casos naturais de eimeriose, é difícil atribuir a uma determinada espécie, os efeitos patogênicos observados, porque geralmente essas infecções são causadas por mais de uma espécie de *Eimeria* e o quadro clínico apresentado resulta da interação dos efeitos causados pelas várias espécies presentes na infecção (LIMA, 1980).

### 3.4.1. *Eimeria ninakohlyakimovae*

*E. ninakohlyakimovae* é considerada patogênica para caprinos jovens e adultos (AUMONT et al., 1984; YVORE et al., 1985). BALOZET (1932 b;c), descreveu um caso de diarréia muco sanguinolenta, seguido de morte em um animal adulto, naturalmente infectado com *E. ninakohlyakimovae* e reproduziu a doença experimentalmente em dois cabritos recém-nascidos. Diarréia mucosa foi observada 22 DAI, transformando-se a seguir em sanguinolenta, que persistiu até o 39º DAI. SAYIN (1964), encontrou nódulos brancos, enterite e descamação epitelial no intestino delgado, ceco e cólon de um cabrito naturalmente infectado, que apresentava diarréia e oocistos de *E. ninakohlyakimovae* nas fezes. NORTON (1986), na Inglaterra, observou diarréia e apatia em um caprino infectado experimentalmente com 5000 oocistos esporulados de *E. ninakohlyakimovae*. No exame pós-morte realizado no 17º DAI, as paredes do ceco estavam espessas com petéquias hemorrágicas e o cólon ligeiramente congesto. YABIN et al., (1991), observaram várias alterações histológicas no fígado e na vesícula biliar de caprinos, atribuídas a *E. ninakohlyakimovae*.

### 3.4.2. *Eimeria arloingi*

*Eimeria arloingi* é o eimeriídeo de caprinos, que recebeu mais atenção até agora, com estudos referentes a sua patogenia. DEIANA & DELITALA (1953), relataram alterações macro e microscópicas, causadas pelos estágios sexuais de *E. arloingi*. GILL & KATIVAR (1961), observaram lesões no íleo de caprinos naturalmente infectados, provocadas por *E. arloingi*. (SAYIN 1965), na Turquia,

encontrou nódulos brancos no intestino delgado de caprinos naturalmente infectados, atribuídos a *E. arloingi*. SHARMA (1966), na Índia, descreveu lesões no intestino delgado de caprinos, com infecção natural por *E. arloingi*. As alterações observadas, consistiram de destruição de células epiteliais, hipertrofia da mucosa intestinal, congestão e infiltrado inflamatório, constituído por células mononucleares. SAYIN et al., (1978; 1979, 1980), observaram diarreia severa, morte e alterações macroscópicas e histológicas em caprinos infectados experimentalmente com *E. arloingi*.

#### **3.4.3. *Eimeria alijevi***

*E. alijevi* é aparentemente patogênica para caprinos (LIMA, 1980). SAYIN (1966), observou diarreia e morte em caprinos inoculados experimentalmente com  $2,5 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^6$  oocistos esporulados de *E. alijevi*.

#### **3.4.4. *Eimeria christenseni***

*E. christenseni* é provavelmente a espécie mais patogênica para caprinos jovens (LIMA, 1980). Infecções experimentais em cabritos de duas a quatro semanas de idade provocaram sinais de coccidiose, que variavam de diarreia discreta (doses de  $10^5$  oocistos) a diarreia aquosa e fétida, com descamação da mucosa intestinal (doses de  $5,0 \times 10^5$  oocistos) e mesmo morte (doses de  $10^7$  oocistos). No exame pós morte, foram observadas alterações macroscópicas e; no exame histológico, ocorreu infiltrado inflamatório, constituído por linfócitos e células plasmáticas, necrose epitelial e edema (LIMA, 1979; 1980; 1981).

### **3.4.5. *Eimeria caprina***

NORTON (1986), observou diarreia, com fezes pútridas e alterações macro e microscópicas no intestino grosso de um caprino infectado experimentalmente com *E. caprina*.

### **3.4.6. *Eimeria apsheronica***

KANYARI (1990), descreveu alterações macroscópicas e histológicas nos intestinos delgado e grosso causadas por *E. apsheronica*, em caprinos infectados experimentalmente. As alterações macroscópicas observadas consistiram de hemorragia, congestão, edema e lesões ulcerativas. Histologicamente, observou-se distúrbios circulatórios, destruição de células epiteliais e, uma reação inflamatória generalizada, constituída por eosinófilos, células plasmáticas, linfócitos, neutrófilos e macrófagos.

## **3.5. Ultraestrutura de coccídios**

Embora o estudo ultraestrutural das espécies de *Eimeria* dos animais domésticos tenha recebido considerável atenção (SCHOLTYSECK, 1973; CHOBOTAR & SCHOLTYSECK, 1982), os coccídios de ruminantes, especialmente os de caprinos, foram pouco contemplados com estudos dessa natureza.

### 3.5.1. Ultraestrutura de merontes e merozoítos

*Eimeria bovis* foi um dos primeiros coccídios de mamíferos a ser estudado através de microscopia eletrônica (SHEFFIELD & HAMMOND, 1966). Nesse trabalho, foi relatada a ultraestrutura dos merozoítos, obtidos de raspados de mucosa intestinal de bovinos infectados experimentalmente. Os merozoítos foram observados livres no vacúolo parasitóforo, apresentavam formato fusiforme e mediam 13,5 x 1,8 µm. Estavam envolvidos por uma membrana dupla e possuíam 22 fibrilas subpeliculares, anel polar, conóide, roptrias, mitocôndrias, aparelho de Golgi e vários ribossomos. No ano seguinte, SHEFFIELD & HAMMOND (1967), descreveram a ultraestrutura de merontes primários e da formação de merozoítos de *E. bovis*, em animais infectados experimentalmente. Posteriormente, DUBREMETZ & ELSNER (1979), descreveram a ultraestrutura da primeira geração merogônica de *E. bovis*, em cultura de células de rins e traquéia de embrião bovino e concluíram que o mecanismo de formação de merozoítos “*in vitro*”, é semelhante ao que ocorre “*in vivo*”. SPEER (1988), caracterizou através de estudo ultraestrutural, dois tipos de merozoítos de primeira geração de *E. bovis*, um de tamanho grande (13,2 x 15 µm) e outro de tamanho pequeno (5,9 x 0,9 µm), em bovinos infectados experimentalmente com várias espécies de *Eimeria*, sendo que *E. bovis* representava 94% do inóculo.

SAMPSON & HAMMOND (1972), descreveram a ultraestrutura de merontes e a formação de merozoítos de *Eimeria alabamensis*, parasita de bovinos, em cultura de células. Os merozoítos foram formados no interior dos merontes por endomerogonia.

A ultraestrutura de merontes e a produção de merozoítos de *Eimeria praecox*, foram descritas por LEE & MILLARD (1971a), em células epiteliais do duodeno de frangos de corte. Foram observadas três gerações merogônicas e os merozoítos foram formados na superfície dos merontes, por ectomerogonia.

FERNANDO (1974), relatou a ultraestrutura de merontes e merozoítos de *Eimeria acervulina* em frangos de corte. Os merozoítos foram formados externamente na superfície dos merontes multinucleados. MICHAEL (1975), descreveu a ultraestrutura de trofozoítos e de merontes de *E. acervulina*, em células caliciformes do duodeno de frangos e comparou com os estágios correspondentes que desenvolveram em outros tipos de células. Os merozoítos foram formados externamente por um alongamento de uma protuberância em forma de cone, que surgiu próximo aos núcleos periféricos.

DUBREMETZ (1973; 1975), relatou a ultraestrutura da mitose na merogonia de *Eimeria necatrix* em frangos. Os núcleos sofreram sete a oito divisões sucessivas e os merozoítos foram formados na periferia do meronte.

COY et al., (1989), descreveram a ultraestrutura de merontes e merozoítos de *Eimeria mitis* e *Eimeria mivati* em frangos infectados experimentalmente e compararam os componentes estruturais dos merozoítos das duas espécies. Os merontes de *E. mitis* formaram seis a sete merozoítos e os de *E. mivati*, originaram 20 merozoítos.

KELLEY & HAMMOND (1973), relataram os aspectos ultraestruturais da divisão nuclear de merontes primários e do desenvolvimento de merozoítos de *E. ninakohlyakimovae* em cultura de células de traquéia e de tireóide de ovinos. Os merozoítos foram formados externamente por ectomerogonia. Embora estes autores, tenham descrito a ultraestrutura de estágios

endógenos de *E. ninakohlyakimovae*, sabe-se, baseado em experimentos de infecção cruzada (LIMA, 1979; NORTON, 1986), que a ultraestrutura da espécie descrita por KELLEY & HAMMOND (1973), foi *Eimeria ovinoidalis*, visto que *E. ninakohlyakimovae*, parasita apenas caprinos (LIMA, 1979; NORTON, 1986).

DUBEY (1986), descreveu a ultraestrutura de merontes e merozoítos de um coccídio semelhante a *Eimeria*, encontrado na vesícula biliar de um caprino naturalmente infectado. Este é o primeiro e único relato existente sobre a ultraestrutura de eimerídeos de caprinos.

GREGORY et al., (1987), observaram em ovinos experimentalmente infectados, a ultraestrutura de merontes maduros de *E. ovina*.

### **3.5.2. Ultraestrutura da microgametogênese**

O primeiro estudo sobre a ultraestrutura da microgametogênese de eimerídeos de mamíferos foi feito por SCHOLTYSECK (1962), com *Eimeria perforans*, parasita do intestino de coelhos. SCHOLTYSECK et. al., (1972), descreveram a ultraestrutura da microgametogênese de *E. perforans* em coelhos, *Eimeria falciformis* em camundongos, *Eimeria tenella* em frangos e *Eimeria auburnensis* em bovinos. BALL et al.(1988), descreveram os aspectos ultraestruturais da microgametogênese de *Eimeria stiedae* em coelhos infectados experimentalmente e BALL & PITTILO (1988), observaram a ultraestrutura da microgametogênese de *E. ovina*, em ovinos infectados experimentalmente.



### 3.5.3. Ultraestrutura da macrogametogênese e formação de oocistos

SCHOLTYSECK et al., (1971) fizeram um estudo comparativo da ultraestrutura de macrogametas de duas espécies de *Eimeria* de coelho (*E. perforans* e *E. stiedae*), duas espécies de bovinos (*E. bovis* e *E. auburnensis*), duas de frangos (*E. tenella* e *E. maxima*) e uma de camundongos (*E. falciformis*).

A ultraestrutura da macrogametogênese de *E. acervulina*, parasita de frangos, foi inicialmente descrita por LEE & MILLARD (1971a). Posteriormente MICHAEL (1975), descreveu a ultraestrutura do desenvolvimento de macrogamontes dessa espécie em células caliciformes e comparou com os mesmos estágios que desenvolveram em células epiteliais. PITTILO & BALL (1984), relataram a ultraestrutura da macrogametogênese e da formação de parede dos oocistos de *E. acervulina*, em frangos infectados experimentalmente.

WHEAT et al., (1976), estudaram a ultraestrutura da macrogametogênese de *Eimeria mivati* em frangos inoculados experimentalmente.

MEHLHORN (1972), descreveu os aspectos ultraestruturais da macrogametogênese de *E. maxima*. PITTILO & BALL (1979), estudaram o desenvolvimento dos macrogametas dessa espécie em frangos infectados experimentalmente, necropsiados de 138 a 147 horas após a inoculação. Posteriormente, ELWASILA (1984), descreveu a ultraestrutura do processo de formação da parede do oocisto de *E. maxima* em frangos experimentalmente infectados.

PITTILO et al., (1988), descreveram a macrogametogênese e a formação da parede do oocisto de *E. ovina*, em ovinos inoculados experimentalmente.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Locais de Execução**

Para o desenvolvimento deste estudo, o experimento de campo foi realizado em três locais: **1.** Na Granja Diniz Lima, localizada no município de Esmeraldas - MG, distando 45 km de Belo Horizonte, no período de agosto de 1993 a maio de 1994; **2.** Nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, localizada no município de Belo Horizonte - MG, no período de junho de 1994 a fevereiro de 1995; **3.** Nas dependências do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos - CNPC, Unidade de Pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, localizada no município de Sobral - CE, distando 240 km de Fortaleza, no período de março a agosto de 1995.

O processamento do material e o estudo das lâminas em microscópio óptico foram realizadas no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFMG e no Laboratório de Anatomia Patológica do CNPC/EMBRAPA. O processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão, a observação das telas de cobre contendo os cortes ultrafinos e as eletromicrografias foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica do ICB/UFMG.

#### **4.2. Obtenção de oocistos de *E. ninakohlyakimovae***

Os oocistos de *E. ninakohlyakimovae* que foram utilizados neste experimento, foram obtidos de caprinos naturalmente infectados com várias espécies de *Eimeria*. Foram colhidas fezes diretamente da ampola retal, em uma amostragem de aproximadamente 10% do rebanho em animais de oito propriedades produtoras de caprinos dos municípios de Belo Horizonte (uma propriedade), Contagem (uma), Betim (três), Florestal (uma), Ouro Preto (uma) e Mariana (uma), estado de Minas Gerais e em animais do rebanho experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, no município de Sobral, estado do Ceará.

As amostras fecais foram examinadas individualmente por flutuação em solução de Sheather, para verificar a presença de oocistos de *E. ninakohlyakimovae*. As amostras positivas para o eimeriídeo procurado foram maceradas, diluídas em uma solução de bicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a 2,5% e coadas em peneira para retirada do material fibroso. A suspensão final foi distribuída em finas camadas em placas de Petri e incubadas por cinco dias, a temperatura ambiente, para esporulação dos oocistos.

#### **4.3. Obtenção do inóculo de *Eimeria ninakohlyakimovae***

Após a esporulação, foram selecionadas as amostras que continham maior concentração de oocistos de *E. ninakohlyakimovae* e foi preparado um “pool”, visando concentrar as formas infectantes dessa espécie. Este material foi utilizado para infectar cabritos livres de infecção por *Eimeria*, para multiplicação dos oocistos e obtenção da cultura pura.

Foram realizadas infecções seriadas em 23 animais livres de infecção por eimerídeos, com inóculo contendo várias espécies de *Eimeria*, incluindo a *E. ninakohlyakimovae*. Em cada inoculação experimental eram mantidos dois ou três cabritos infectados. Os animais foram acompanhados através de exames parasitológicos diários, antes e após a infecção, por um período de no mínimo 30 dias.

Os oocistos de *E. ninakohlyakimovae* foram sendo selecionados no decorrer das várias infecções experimentais, utilizando-se as características morfológicas e o período prepatente das espécies de *Eimeria* de caprinos, conforme descritos por (LIMA, 1979; DEB et al., 1982 e NORTON, 1986), para separar *E. ninakohlyakimovae* (Tabela 1).

**Tabela 1 - Tamanho médio de oocistos, esporocistos e período prepatente das espécies de *Eimeria* mais frequentes em caprinos.**

Espécies	Oocisto ( $\mu\text{m}$ )	Esporocisto ( $\mu\text{m}$ )	Período Prepatente (Dias)	Capuz Micropilar
<i>Eimeria arloingi</i>	28,2 x 19,8	14,0 x 7,3	14 - 17	+
<i>Eimeria christenseni</i>	37,8 x 25,3	15,3 x 9,3	14 - 23	+
<i>Eimeria hirci</i>	20,7 x 16,2	10,1 x 6,5	13 - 16	+
<i>Eimeria apsheronica</i>	31,3 x 23,1	15,8 x 8,7	14 - 18	-
<i>Eimeria jolchijevi</i>	30,6 x 22,4	14,7 x 8,0	14 - 17	+
<i>Eimeria ninakohlyakimovae</i>	23,6 x 18,6	12,3 x 6,5	9 - 17	-
<i>Eimeria alijevi</i>	17,4 x 14,9	9,4 x 5,1	7 - 10	-
<i>Eimeria caprina</i>	31,8 x 23,1	15,3 x 8,5	17 - 20	-
<i>Eimeria caprovina</i>	29,7 x 23,7	14,3 x 8,3	14 - 20	-

Fonte: LIMA (1979), DEB et al., (1982), NORTON (1986).

Após o isolamento, os oocistos de *E. ninakohlyakimovae* foram multiplicados em cabritos livres de infecções naturais por coccídios, com idade entre uma e três semanas. Estes animais foram inoculados por via oral com aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  oocistos/kg. Todos os animais infectados foram acompanhados através de exames parasitológicos de fezes após a infecção.

Os oocistos obtidos dos cabritos infectados foram esporulados em solução de bicromato de potássio a 2,5% e armazenados a 4°C, até serem utilizados. O período de esporulação foi determinado a 30°C e aeração constante fornecida por uma bomba de aquário. Os oocistos foram examinados a intervalos de 24 horas e, a duração do período de esporulação foi considerada até o momento após o qual, não ocorria aumento no percentual de esporulação durante dois dias consecutivos. As características estruturais dos oocistos esporulados e dos esporocistos de *E. ninakohlyakimovae* foram determinadas, quando 200 exemplares de ambos foram medidos em microscópio óptico da marca Olympus, equipado com ocular micrométrica, usando objetiva de imersão (100x).

#### **4.4. Animais utilizados para infecção experimental**

Foram utilizados 49 caprinos mestiços, de ambos os sexos, livres de infecção por eimerídeos, com idade entre uma e três semanas. Nove animais foram procedentes dos municípios de Betim, Caeté, Contagem, Pitangui e Sete Lagoas, estado de Minas Gerais e os demais (34), foram obtidos do rebanho do CNPC/EMBRAPA, em Sobral - CE.

Os cabritos foram separados das mães imediatamente após o nascimento, antes de mamar o colostro ou no máximo com dois dias de nascidos e alojados individualmente em compartimentos de alvenaria (60 cm x 60 cm x 90 cm), situados a um metro acima do nível do solo, sobre estrado de madeira forrado com papel, ou em gaiolas de madeira (2,0m x 0,50m), a 50 cm acima do nível do solo, com piso de tela de arame. As gaiolas foram mantidas em galpão de alvenaria com teto coberto de telhas de cerâmica e piso de cimento com 15m x 10m. O acesso era restrito a apenas duas pessoas que alimentavam os cabritos e procediam a limpeza das instalações. Diariamente as gaiolas e o piso do galpão eram lavados com água sobre pressão, desinfetados com hipoclorito de sódio a 2,5% e semanalmente utilizava-se lança-chamas (vassoura de fogo). O mesmo procedimento de limpeza e desinfecção foram realizados no piso e compartimentos de alvenaria e nos estrados de madeira.

A alimentação dos cabritos consistia de colostro artificial (70% de leite bovino pasteurizado tipo C, 30% de soro ovino e um ovo de galinha), durante os dois primeiros dias de vida e a partir daí, de leite bovino pasteurizado ou em pó reconstituído, administrado duas vezes por dia, fornecido em mamadeiras individuais. A quantidade de leite oferecida em cada mamada correspondia a 10% do peso corporal do animal.

#### **4.5. Inoculação dos animais experimentais**

Vinte e cinco cabritos, com idade entre uma e três semanas, livres de coccídios, foram inoculados por via oral com diferentes doses : cinco com 5,0 x

$10^4$ ; dez com  $1,5 \times 10^5$ ; quatro com  $2,0 \times 10^5$  e seis com  $9,0 \times 10^5$  oocistos esporulados de *E. ninakohlyakimovae*, por quilo de peso corporal.

Antes da inoculação, os oocistos foram lavados através de três ou mais centrifugações durante 10 minutos a 1.000 g. Após cada centrifugação, o sobrenadante era descartado, adicionava-se água ao sedimento e ressuspensava o material para ser centrifugado novamente. Este procedimento era repetido até a solução que continha os oocistos, apresentar coloração clara.

Após a retirada do bicromato de potássio, o número de oocistos esporulados por mililitro, foi determinado, utilizando-se a técnica descrita por WHITLOCK (1948). O número de oocistos/ml, foi estimado através do cálculo da média das contagens de 10 repetições na câmara de McMaster.

#### **4.6. Necrópsia e colheita de material**

Todos os cabritos infectados foram necropsiados a partir do segundo dia após a infecção (DAI), a intervalos de 24 ou 48 horas, até o 18° DAI. Foram necropsiados um ou dois animais de cada vez. Os cabritos foram sacrificados através de injeção, por via endovenosa, de uma solução saturada de sulfato de magnésio na dose de 1 ml/kg.

Foi feito o exame macroscópico de todos os animais necropsiados e, imediatamente após a morte, o abdomen foi aberto e foram colhidos fragmentos do fígado, vesícula biliar, coração, pulmões, baço, pâncreas, rins, linfonodos mesentéricos, intestino delgado (uma amostra a cada 20 cm), ceco, cólon e reto. Estas amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada (pH 7,2) a 10% e posteriormente processadas para estudo em microscópio óptico. Um animal não





infectado, foi sacrificado no final do experimento, necropsiado e processado para microscopia óptica, pelo mesmo processo descrito para os animais infectados.

#### **4.7. Coccidiose experimental**

Dezoito cabritos, livres de coccídios, foram infectados por via oral com diferentes doses : um com  $5,0 \times 10^4$ ; sete com  $1,5 \times 10^5$ ; oito com  $2,0 \times 10^5$  e dois com  $9,0 \times 10^5$  oocistos esporulados de *E. ninakohlyakimovae*/kg de peso corporal e mantidos por períodos de até 24 DAI, para determinar o curso da infecção e os sinais clínicos.

Seis cabritos não infectados foram mantidos simultaneamente ao grupo inoculado com  $1,5 \times 10^5$  oocistos/kg. Todos os animais foram observados diariamente, através de exames parasitológicos de fezes e pesados semanalmente por um período de três semanas, quando finalizou o experimento. A avaliação clínica consistia da tomada de temperatura retal, observação do comportamento animal, consistência das fezes e apetite.

#### **4.8. Processamento de material para Microscopia Óptica**

Os tecidos colhidos e fixados foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizado em xilol, embebido e incluído em parafina e seccionado com cinco a sete  $\mu\text{m}$  de espessura. O material foi corado pela técnica de hematoxilina - eosina e examinado em microscópio óptico da marca Olympus, modelo CBS.



## **4.9. Processamento de material para Microscopia Eletrônica**

### **4.9.1. Fixação**

Fragments de tecido do intestino delgado, ceco e cólon de um cabrito infectado com  $2,0 \times 10^5$  oocistos de *E. ninakohlyakimovae*/kg, e necropsiado 15 DAI, foram colhidos imediatamente após a necropsia, em pequenas porções de aproximadamente 3mm de largura e fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As amostras foram mantidas a 4°C, durante 60 minutos, quando os fragmentos foram recortados em aproximadamente um milímetro cúbico e a solução fixadora foi renovada. O material permaneceu no glutaraldeído por seis horas.

Após a fixação, os fragmentos foram lavados três vezes em solução tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) a 4°C. Os fragmentos permaneceram no tampão, à temperatura de 4°C, até a etapa da pós-fixação.

### **4.9.2. Pós - fixação**

Os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ) a 2,0% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), durante duas horas, a temperatura de 4°C. Terminada a pós-fixação, o material foi lavado rapidamente em tampão fosfato por duas vezes e, imediatamente submetido a desidratação.



#### 4.9.3. Desidratação

O material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool (50 a 100%) conforme o esquema abaixo:

<b>Álcool 50%</b>	<b>10 minutos</b>	
<b>Álcool 70%</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(duas trocas)</b>
<b>Álcool 95%</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(duas trocas)</b>
<b>Álcool 100%</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(três trocas)</b>
<b>Álcool 100% P.A.</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(duas trocas)</b>
<b>Acetona 100% P.A.</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(duas trocas)</b>

#### 4.9.4. Infiltração e inclusão

As peças foram infiltradas over-night com resina Epon 812 (Polysciences) e acetona, na proporção de uma parte da mistura da resina para uma parte de acetona. A resina foi constituída por :

<b>Epon 812</b>	<b>15,4</b>	<b>gramas</b>
<b>DDSA (Anidrido dodecinil-succínico)</b>	<b>6,4</b>	<b>gramas</b>
<b>NMA (Anidrido metil-nádico)</b>	<b>10,1</b>	<b>gramas</b>





O material foi transferido para a resina plena acrescida de 0,6 ml do acelerador Tridimetilaminometilfenol (DMP-30), onde permaneceu por uma hora, a temperatura ambiente. Finalmente, foi feita a inclusão individual em cápsulas de plástico, devidamente identificadas, utilizando-se a resina mais o DMP-30, nas proporções, já descritas. As peças foram orientadas para a extremidade da cápsula e colocadas em estufa a 40°C por uma hora e em seguida a 60°C, durante 24 horas para a polimerização e endurecimento da resina.

#### **4.9.5. Ultramicrotomia**

O bloco foi preparado para a obtenção dos cortes, através da retirada do excesso de resina e a formação de uma pirâmide truncada com margens superior e inferior paralelas e margens laterais inclinadas, configurando um trapézio, com o espécime exposto. Inicialmente, foram realizados os cortes semifinos no ultramicrótomo, utilizando-se navalha de vidro. Estes foram corados a quente com azul de toluidina a 1%, em borato de sódio a 0,5% (TRUMP et. al., 1961), até as bordas do corante adquirir coloração dourada, correspondendo a um período de aproximadamente dois minutos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água e colocadas para secar. Os cortes foram examinados em microscópio óptico, selecionada a área da mucosa contendo formas endógenas de *E. ninakohlyakimovae* e preparada a pirâmide, para obtenção dos cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos foram obtidos em navalha de diamante, com espessura variando de 60 a 90 nanômetros. Os cortes foram colocados em telas de cobre de 300 meshes, onde foram contrastados.





#### **4.9.6. Contrastação**

Os cortes foram submetidos a dupla coloração, utilizando-se solução aquosa de acetato de uranila a 2%, por 30 minutos (WATSON, 1958) e, em seguida, solução de citrato de chumbo de REYNOLDS (1963), por cinco minutos, em atmosfera de hidróxido de sódio.

#### **4.9.7. Processamento fotográfico para documentação**

As observações ultraestruturais foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo Zeiss, EM - 10, operado a 50 kilovolts, onde foram processadas as eletromicrografias. Foi utilizado filme Cronalar HS - 7 - Dupon (Chapas de 8,2 x 10 cm).

A revelação foi feita por três a quatro minutos, utilizando-se revelador Kodak D - 19, diluído em água na proporção de duas partes de H<sub>2</sub>O para uma do revelador e na temperatura de 21°C. Os negativos foram fixados em fixador F<sub>5</sub> da Kodak, durante 15 minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente por 30 minutos e colocados a temperatura ambiente para secar.

Após a revelação, foram processadas as cópias dos negativos, utilizando-se papel de ampliação resinado, marca Kodabromide F<sub>3</sub>. A ampliação utilizada foi de 1,5 vezes o tamanho do negativo. A revelação das cópias foi feita com revelador Dektol, diluído em água, na proporção de duas partes de água para uma do revelador, durante um minuto. Em seguida, as cópias foram lavadas em água por 60 segundos e fixadas em fixador F<sub>5</sub> por 15 minutos. Após a fixação, foi feita a lavagem em água corrente por 15 minutos e aspergol por mais 10 minutos.



## **5. RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Desenvolvimento endógeno de *Eimeria ninakohlyakimovae*

Foram observadas duas gerações merogônicas, gametogênese e formação de oocistos em 21 animais entre 25 necropsiados. Os merontes primários foram detectados no íleo, a partir do 7º DAI, localizando-se nas células endoteliais dos vasos quilíferos das vilosidades, na lâmina própria e, com menor frequência, nos vasos linfáticos da submucosa. Um meronte foi encontrado no cólon 11 DAI. Um meronte, detectado 7 DAI mediu 58,2 x 48,9 µm e continha 42 núcleos bem definidos, com resíduo de 4,5 x 3,3 µm e estava envolvido por uma cápsula, com 4,1 µm de espessura (**Figura 1**).

No 8º DAI, os merontes mediram 64,0 (31,2-78,0) x 56,3 (22,9-72,8) µm e possuem paredes mais delgadas com espessura média de 3,41 µm (**Figura 2**). No 9º DAI, os merontes mediram 86,1 (72,9-116,8) x 71,5 (46,8-108,4) µm e continham vários núcleos, na maioria das vezes concentrados no centro, distribuídos aleatoriamente ou formando compartimentos dentro do meronte (**Figura 3**). A espessura média da parede foi de 3,37 µm. No 10º DAI, os merontes imaturos mediram 127,3 (55,1-208,5) x 95,7 (50-129,3) µm com núcleos, na maioria das vezes formando vários compartimentos no interior do meronte e com



parede delgada (3,23  $\mu\text{m}$ ) que, às vezes, era muito fina, tornando-se quase imperceptível (**Figura 4**). Os merontes primários maduros foram observados a partir do 10° DAI, medindo 165,5 (125,1-300,2) x 123,6 (62,6-196,0)  $\mu\text{m}$  e contendo grande número de merozoítos dispostos um ao lado do outro ocupando todo meronte (**Figura 5, 6 e 7**). Corpo residual foi observado algumas vezes. Os merozoítos foram encontrados livres na luz do íleo, após o rompimento de merontes maduros (**Figura 8**).

A segunda geração merogônica foi observada nas células epiteliais de revestimento das criptas do ceco e do cólon. Os trofozoítos e os merontes imaturos de segunda geração, foram observados a partir do 11° DAI (**Figuras 9 e 10**) e os merontes secundários maduros a partir do 12° DAI (**Figuras 11 e 12**). Localizavam-se geralmente acima do núcleo da célula hospedeira e infecções múltiplas com criptas totalmente parasitadas foram observadas com frequência. Os merontes secundários maduros mediram 16,8 (10,3 - 24,6) x 11,6 (7,4 - 15,6)  $\mu\text{m}$  e continham 10 a 32 merozoítos ( $X = 24$ ). Os merozoítos mediram 6,9 (5,3-7,8) x 1,8 (1,6-2,1)  $\mu\text{m}$  e estavam localizados um ao lado do outro, ocupando todo o interior do meronte (**Figuras 11 e 12**).

A gametogênese e a formação de oocistos também ocorreram no epitélio das criptas do ceco e do cólon, onde os gamontes, microgametas, macrogametas e oocistos jovens, localizavam-se abaixo do núcleo da célula hospedeira e, foram observados a partir do 13° DAI. Células infectadas com mais de um gamonte foram frequentes.

Os microgamontes apresentaram vários núcleos distribuídos na periferia e, quando maduros, mediram 16,1 (10,3-18,5) x 13,0 (9,2-16,4)  $\mu\text{m}$  e continham vários microgametas distribuídos aleatoriamente no seu interior (**Figura**





13), apresentando às vezes, corpo residual. A maioria dos microgamontes (77%) foi encontrada no ceco.

Os macrogamontes apresentaram núcleo central grande e nucléolo bem definido (**Figura 14**). Os macrogametas apresentavam vários grânulos eosinofílicos distribuídos aleatoriamente no citoplasma ou organizados na periferia do parasito, medindo 14,7 (11,5-17,2) x 12,5 (9,0-15,6)  $\mu\text{m}$  e, 86% se localizavam no cólon (**Figura 15**).

Os oocistos imaturos mediram 18,3 (16,4-23,8) x 13,3 (9,4-18,4)  $\mu\text{m}$  e apresentam parede nítida com esporonte bastante desenvolvido (**Figura 16**).

No fígado, vesícula biliar, coração, pulmões, baço, pâncreas, rins e linfonodos mesentéricos, não foram observadas formas endógenas de *E. ninakohlyakimovae* bem como lesões de coccidiose a ela atribuída.

Nos cabritos sacrificados no 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> DAI e, no que morreu no 16<sup>o</sup>DAI, foram observadas formas endógenas de *Cryptosporidium*, nos intestinos delgado e grosso.

## 5.2 Curso da infecção por *E. ninakohlyakimovae*

O período prepatente em 18 cabritos foi de  $14,7 \pm 1,0$  (13-17) dias e o patente de  $6,8 \pm 1,6$  (4-10) dias. O período de esporulação foi de 2 a 3 dias. Morte causada por *E. ninakohlyakimovae* ocorreu em apenas um cabrito infectado com  $2,0 \times 10^5$  oocistos esporulados / kg, no 16<sup>o</sup> DAI. O animal apresentou diarreia de coloração escura no 13<sup>o</sup> DAI, simultaneamente com o aparecimento de oocistos de *E. ninakohlyakimovae* nas fezes. O pico da eliminação de oocistos foi observado do 15<sup>o</sup> para o 16<sup>o</sup> DAI, com 242.700 oocistos por grama de fezes (OOPG),



coincidindo com a morte do animal. Nesse período, o cabrito eliminou 200 ml de fezes totalmente líquidas e sanguinolentas, com coloração vermelho vivo e muco. Antes da morte, o animal apresentou apatia, perda total de apetite e desidratação intensa.

Os outros cabritos infectados com as quatro diferentes doses de oocistos apresentaram sinais clínicos de eimeriose, mas nenhum morreu. Os sintomas mais severos, foram observados nos animais infectados com  $2,0 \times 10^5$  oocistos esporulados / kg, e consistiram de fezes diarréicas, de odor fétido e coloração marrom escuro, com presença de sangue não metabolizado e muco, falta de apetite, desidratação, pêlos arrepiados e sem brilho e debilidade orgânica generalizada. A diarréia durou aproximadamente uma semana, e a falta de apetite, tinha uma duração de dois a três dias.

Nos cabritos infectados com  $5,0 \times 10^4$ ;  $1,5 \times 10^5$  e  $9,0 \times 10^5$  oocistos / kg, os sinais clínicos de eimeriose foram moderados e consistiram apenas de uma discreta diarréia de coloração amarelo-amarronzada e odor fétido. Presença de muco e sangue nas fezes foram observados apenas no grupo inoculado com  $1,5 \times 10^5$  oocistos /kg. Nestes animais, o ganho médio de peso, acompanhado por um período de 24 dias, foi de 1,8 kg e, no grupo controle, no mesmo período, com os animais mantidos sob as mesmas condições, foi de 2,1 kg.

Na maioria dos animais inoculados, o início da sintomatologia clínica de eimeriose coincidiu com o aparecimento de oocistos nas fezes, ou em raros casos, surgiu um ou dois dias após. O número máximo de OOPG eliminados pelos animais infectados ocorreu entre o segundo e o terceiro dia de patencia. Em apenas dois animais, este pico aconteceu no quarto dia de patencia. Os animais inoculados com  $9,0 \times 10^5$  oocistos por /kg, eliminaram menos oocistos, por um período menor e



foram os que apresentaram sintomas de eimeriose mais discretos, que os infectados com as doses menores.

### **5.3. Achados de Necrópsia**

Nos cabritos necropsiados do segundo ao 13º DAI, não foi observada alteração macroscópica. Nos animais sacrificados a partir do 15º DAI, verificou-se espessamento, edema, hemorragia petequiral e hiperemia da mucosa do ceco e do cólon. Os linfonodos mesentéricos, principalmente o íleo-cecal, estavam aumentados de volume. Não foram observadas alterações no intestino delgado.

### **5.4. Alterações Histológicas**

Como ocorreu na macroscopia, não foi encontrada alteração histológica nos cabritos sacrificados até o 13º DAI. Os cabritos necropsiados a partir do 15º DAI apresentaram descamação do epitélio das criptas do ceco e do cólon. As lesões mais intensas ocorreram no cabrito necropsiado no 15º DAI e no que morreu no 16º DAI. Nestes, as lesões consistiram de uma destruição quase total das criptas, com hemorragia, hiperemia, edema e necrose. Existem regiões que a descamação de epitélio foi tão intensa que a estrutura das criptas estava totalmente destruída. Nestas áreas, foram observados aglomerados de parasito, principalmente microgamontes e macrogametas, localizados na luz das criptas. No intestino delgado não ocorreu alteração.



O infiltrado inflamatório foi discreto e consistiu de raros plasmócitos, linfócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, localizado na submucosa e com menor intensidade no epitélio das criptas do ceco e do cólon.

## **5.5. Ultraestrutura**

### **5.5.1. Desenvolvimento de merozoítos e ultraestrutura de merontes secundários**

Os merontes secundários foram observados nas células epiteliais de revestimentos das criptas do ceco e do cólon. Localizavam-se acima do núcleo da célula hospedeira, no interior de um vacúolo parasitóforo, delimitados por uma membrana. Inicialmente, foram observados os trofozoítos, contendo um ou dois núcleos com cromatina periférica e vacúolos elétron-lúcidos (**Figuras 17 e 18**).

O desenvolvimento dos merozoítos inicia-se com a divisão dos núcleos e estes desenvolvem-se a partir de um alongamento do citoplasma, onde observa-se a formação do complexo apical e a migração do núcleo em direção à porção projetada (**Figura 19**). Simultaneamente, forma-se a membrana plasmática do parasito. Nesse estágio, a região anterior do merozoíto está livre, e a posterior, ligada ao meronte. Por último, a extremidade posterior do merozoíto é liberada do meronte (**Figura 20**). O corpo residual do meronte contém grânulos de polissacarídeos.





### **5.5.2. Ultraestrutura de merozoítos**

Os merozoítos foram encontrados livres no interior de vacúolos parasitóforos, envolvidos por dupla membrana (**Figura 21**). Contêm um núcleo com nucléolo e cromatina periférica (**Figura 22**). O complexo apical é constituído pelo conóide, um par de roptrias e vários micronemas (**Figuras 23 e 24**). O ducto das roptrias se dirige para a extremidade anterior e se estende até o conóide e, a região posterior, mais larga e com formato de fundo de saco, se prolonga no sentido caudal, até aproximadamente, a metade do merozoíto (**Figura 24**). O anel polar anterior não foi verificado, mas o posterior foi observado com nitidez. O microporo se localiza acima do núcleo, na região anterior (**Figura 25**). Dois a quatro corpos eletrón-densos, esféricos, estão localizados geralmente na região anterior (**Figura 25**). Grânulos de polissacarídeos distribuídos por todo o parasito, foram observados com frequência (**Figura 24**).

### **5.5.3 Ultraestrutura de microgamontes e formação de microgametas**

Os microgamontes, no interior de vacúolos parasitóforos, desenvolvem-se abaixo do núcleo das células epiteliais das criptas do ceco e do cólon (**Figura 26**). Apresentam forma arredondada ou ligeiramente oval e estão envolvidos por uma membrana. Os microgamontes imaturos contêm de um a 19 núcleos, distribuídos no citoplasma ou localizados na periferia do parasito, com núcleo central e cromatina periférica (**Figuras 27, 28 e 29**). Mitocondrias da célula hospedeira foram observadas com frequência, formando aglomerados em volta do vacuolo parasitóforo (**Figura 28**). Grânulos de polissacarídeos são observados a



partir dos estágios iniciais de desenvolvimento. A divisão nuclear ocorre simultaneamente com o desenvolvimento do parasito. Os microgametas desenvolvem-se em duas fases. Inicialmente ocorre a divisão nuclear e em seguida se diferenciam. Após a divisão nuclear, os núcleos migram para a periferia do parasito e a cromatina concentra-se na metade do núcleo (**Figura 30**). O núcleo apresenta duas regiões. Uma elétron-densa migra em direção à membrana do parasito e, a outra menos densa, permanece ligada ao microgamonte (**Figuras 31 e 32**). Após a maturação, a porção posterior do microgameta, é liberada do microgamonte. O corpo residual do microgamonte contém grânulos de polissacarídeos (**Figura 33**).

#### **5.5.4 Ultraestrutura de Microgametas**

Os microgametas estão livres em vacúolos parasitóforos ou em volta do corpo residual (**Figuras 33 e 34**). Apresentam forma alongada ou ligeiramente curva; e em cortes transversais são arredondados. São constituídos por um corpo, associado a uma mitocôndria alongada e um núcleo eletron-denso, envolvido por duas membranas (**Figura 35**). Possuem três flagelos, que se originam na extremidade anterior e são maiores que o comprimento do microgameta (**Figura 36**). Em cortes transversais de flagelos dos microgametas, foram observados nove pares de microtubulos localizados na periferia e, um par central (**Figura 37**).



### 5.5.5. Desenvolvimento e ultraestrutura de macrogametas e oocistos

Os merozoítos secundários, quando penetram na célula epitelial, poderão originar micro ou macrogamontes (**Figura 38**).

Os macrogamontes desenvolvem-se abaixo do núcleo das células epiteliais das criptas do ceco e do cólon. Tem formato ovóide e estão no interior de um vacúolo parasitóforo, envolvidos aparentemente por apenas uma membrana. Possuem núcleo grande, situado no centro do parasito, com nucléolo proeminente (**Figura 39**). Os corpos formadores de parede tipo II (WFB II) são os primeiros a serem formados, contendo estrutura pouco elétron-densa, com aspecto esponjoso e, estão geralmente próximos a organelas parecidos com retículo endoplasmático rugoso, envolvidos por uma pequena área elétron-lúcida (**Figura 40**). Os grânulos formadores de parede tipo I (WFB I) foram observados somente nos estágios mais adiantados. São elétron-densos, esféricos e menores que os WFB II (**Figura 41**).

Nos macrogametas os WFB I, em fileira, estão distribuídos na periferia do parasito e os WFB II se concentram na parte central (**Figura 41**). Grânulos de polissacarídeos e canalículos eletron-lúcidos, são numerosos nesse estágio.

Os oocistos jovens, são envolvidos por uma parede dupla e contém um esporonte com grânulos de polissacarídeos, de tamanho maior, mais numerosos e mais eletron-lúcidos, que nos macrogametas (**Figuras 42 e 43**).



## **6. PRANCHAS**





**PRANCHA I**

## PRANCHA I

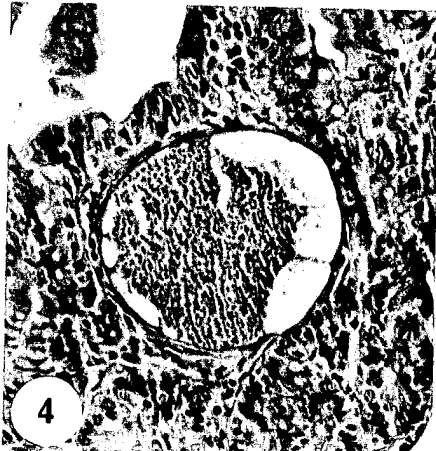
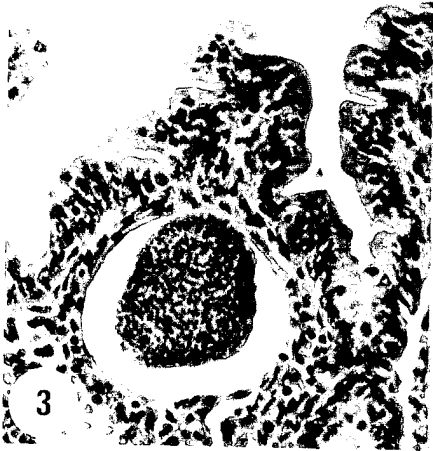
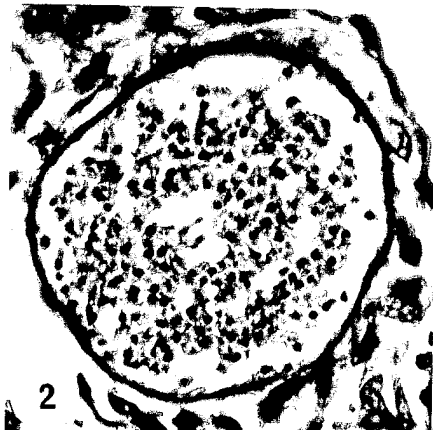
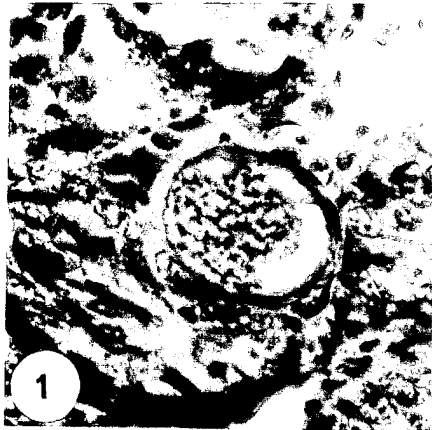
**Figuras 1 - 4.** Primeira geração merogônica de *E. ninakohlyakimovae*, no íleo de cabritos experimentalmente infectados, H&E.

1. Meronte imaturo, 7 DAI (430x)

2. Meronte imaturo, 8 DAI (650x)

3. Meronte imaturo, 9 DAI (260x)

4. Meronte imaturo, 10 DAI (260x)



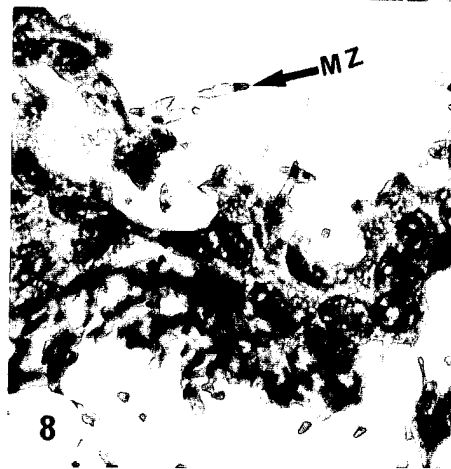
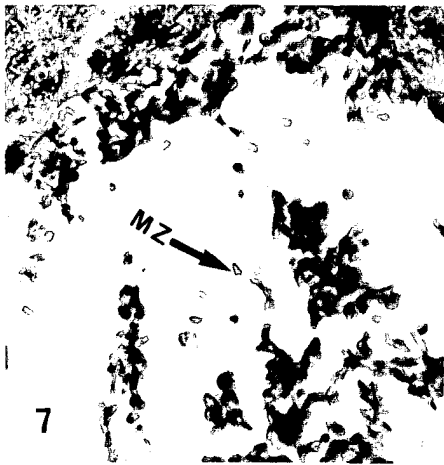
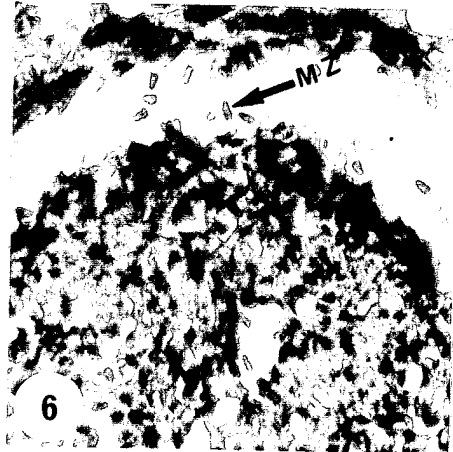
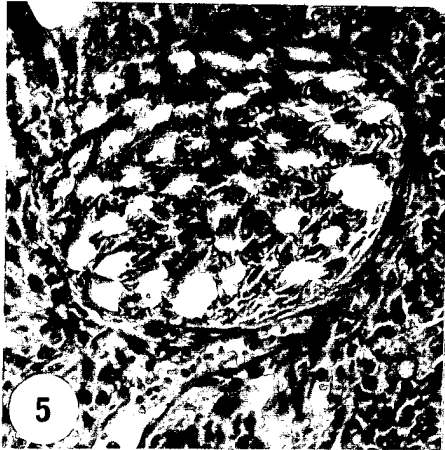


**PRANCHA II**

## PRANCHA II

**Figuras 5 - 8.** Merontes primários maduros e merozoítos de primeira geração de *E. ninakohlyakimovae*, no ileo de cabritos experimentalmente infectados, H&E.

5. Meronte maduro, 10 DAI (350x)
6. Meronte maduro com merozoítos (MZ), 11 DAI (825x)
7. Merozoítos livres no meronte, 11 DAI (850x)
8. Merozoítos livres na luz do ileo, 11 DAI (850x)







**PRANCHA III**

### **PRANCHA III**

**Figuras 9 - 12.** Segunda geração merogônica de *E. ninakohlyakimovae* em células epiteliais das criptas do ceco e cólon de cabritos experimentalmente infectados, H&E (825x).

**9.** Trofozoitos (A) e meronte imaturo (B); núcleo da célula hospedeira (NH), 11 DAI

**10.** Meronte imaturo (MT); NH, 12 DAI

**11.** Meronte maduro; merozoítos (MZ), 12 DAI

**12.** Meronte maduro com merozoítos (MZ); NH, 12 DAI

10<sup>4</sup>; dez com 1,5 x 10<sup>5</sup>; quatro com 2,0 x 10<sup>5</sup> e seis com 9,0 x 10<sup>5</sup> oocistos esporulados de *E. ninakohlyakimovae*, por quilo de peso corporal.

Antes da inoculação, os oocistos foram lavados através de três ou mais centrifugações durante 10 minutos a 1.000 g. Após cada centrifugação, o sobrenadante era descartado, adicionava-se água ao sedimento e ressuspensava o material para ser centrifugado novamente. Este procedimento era repetido até a solução que continha os oocistos, apresentar coloração clara.

Após a retirada do bicromato de potássio, o número de oocistos esporulados por mililitro, foi determinado, utilizando-se a técnica descrita por WHITLOCK (1948). O número de oocistos/ml, foi estimado através do cálculo da média das contagens de 10 repetições na câmara de McMaster.

#### **4.6. Necrópsia e colheita de material**

Todos os cabritos infectados foram necropsiados a partir do segundo dia após a infecção (DAI), a intervalos de 24 ou 48 horas, até o 18º DAI. Foram necropsiados um ou dois animais de cada vez. Os cabritos foram sacrificados através de injeção, por via endovenosa, de uma solução saturada de sulfato de magnésio na dose de 1 ml/kg.

Foi feito o exame macroscópico de todos os animais necropsiados e, imediatamente após a morte, o abdomen foi aberto e foram colhidos fragmentos do fígado, vesícula biliar, coração, pulmões, baço, pâncreas, rins, linfonodos mesentéricos, intestino delgado (uma amostra a cada 20 cm), ceco, cólon e reto. Estas amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada (pH 7,2) a 10% e posteriormente processadas para estudo em microscópio óptico. Um animal não

infectado, foi sacrificado no final do experimento, necropsiado e processado para microscopia óptica, pelo mesmo processo descrito para os animais infectados.

#### **4.7. Coccidiose experimental**

Dezoito cabritos, livres de coccídios, foram infectados por via oral com diferentes doses : um com  $5,0 \times 10^4$ ; sete com  $1,5 \times 10^5$ ; oito com  $2,0 \times 10^5$  e dois com  $9,0 \times 10^5$  oocistos esporulados de *E. ninakohlyakimovae*/kg de peso corporal e mantidos por períodos de até 24 DAI, para determinar o curso da infecção e os sinais clínicos.

Seis cabritos não infectados foram mantidos simultaneamente ao grupo inoculado com  $1,5 \times 10^5$  oocistos/kg. Todos os animais foram observados diariamente, através de exames parasitológicos de fezes e pesados semanalmente por um período de três semanas, quando finalizou o experimento. A avaliação clínica consistia da tomada de temperatura retal, observação do comportamento animal, consistência das fezes e apetite.

#### **4.8. Processamento de material para Microscopia Óptica**

Os tecidos colhidos e fixados foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizado em xilol, embebido e incluído em parafina e seccionado com cinco a sete  $\mu\text{m}$  de espessura. O material foi corado pela técnica de hematoxilina - eosina e examinado em microscópio óptico da marca Olympus, modelo CBS.

## **4.9. Processamento de material para Microscopia Eletrônica**

### **4.9.1. Fixação**

Fragments de tecido do intestino delgado, ceco e cólon de um cabrito infectado com  $2,0 \times 10^5$  oocistos de *E. ninakohlyakimovae*/kg, e necropsiado 15 DAI, foram colhidos imediatamente após a necropsia, em pequenas porções de aproximadamente 3mm de largura e fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As amostras foram mantidas a 4°C, durante 60 minutos, quando os fragmentos foram recortados em aproximadamente um milímetro cúbico e a solução fixadora foi renovada. O material permaneceu no glutaraldeído por seis horas.

Após a fixação, os fragmentos foram lavados três vezes em solução tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) a 4°C. Os fragmentos permaneceram no tampão, à temperatura de 4°C, até a etapa da pós-fixação.

### **4.9.2. Pós - fixação**

Os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ) a 2,0% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), durante duas horas, a temperatura de 4°C. Terminada a pós-fixação, o material foi lavado rapidamente em tampão fosfato por duas vezes e, imediatamente submetido a desidratação.

### 4.9.3. Desidratação

O material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool (50 a 100%) conforme o esquema abaixo:

<b>Álcool 50%</b>	<b>10 minutos</b>	
<b>Álcool 70%</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(duas trocas)</b>
<b>Álcool 95%</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(duas trocas)</b>
<b>Álcool 100%</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(três trocas)</b>
<b>Álcool 100% P.A.</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(duas trocas)</b>
<b>Acetona 100% P.A.</b>	<b>15 minutos</b>	<b>(duas trocas)</b>

### 4.9.4. Infiltração e inclusão

As peças foram infiltradas over-night com resina Epon 812 (Polysciences) e acetona, na proporção de uma parte da mistura da resina para uma parte de acetona. A resina foi constituída por :

<b>Epon 812</b>	<b>15,4</b>	<b>gramas</b>
<b>DDSA (Anidro dodecinil-succínico)</b>	<b>6,4</b>	<b>gramas</b>
<b>NMA (Anidrido metil-nádico)</b>	<b>10,1</b>	<b>gramas</b>



O material foi transferido para a resina plena acrescida de 0,6 ml do acelerador Tridimetilaminometilfenol (DMP-30), onde permaneceu por uma hora, a temperatura ambiente. Finalmente, foi feita a inclusão individual em cápsulas de plástico, devidamente identificadas, utilizando-se a resina mais o DMP-30, nas proporções, já descritas. As peças foram orientadas para a extremidade da cápsula e colocadas em estufa a 40°C por uma hora e em seguida a 60°C, durante 24 horas para a polimerização e endurecimento da resina.

#### 4.9.5. Ultramicrotomia

O bloco foi preparado para a obtenção dos cortes, através da retirada do excesso de resina e a formação de uma pirâmide truncada com margens superior e inferior paralelas e margens laterais inclinadas, configurando um trapézio, com o espécime exposto. Inicialmente, foram realizados os cortes semifinos no ultramicrótomo, utilizando-se navalha de vidro. Estes foram corados a quente com azul de toluidina a 1%, em borato de sódio a 0,5% (TRUMP et. al., 1961), até as bordas do corante adquirir coloração dourada, correspondendo a um período de aproximadamente dois minutos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água e colocadas para secar. Os cortes foram examinados em microscópio óptico, selecionada a área da mucosa contendo formas endógenas de *E. ninakohlyakimovae* e preparada a pirâmide, para obtenção dos cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos foram obtidos em navalha de diamante, com espessura variando de 60 a 90 nanômetros. Os cortes foram colocados em telas de cobre de 300 meshes, onde foram contrastados.



#### **4.9.6. Contrastação**

Os cortes foram submetidos a dupla coloração, utilizando-se solução aquosa de acetato de uranila a 2%, por 30 minutos (WATSON, 1958) e, em seguida, solução de citrato de chumbo de REYNOLDS (1963), por cinco minutos, em atmosfera de hidróxido de sódio.

#### **4.9.7. Processamento fotográfico para documentação**

As observações ultraestruturais foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo Zeiss, EM - 10, operado a 50 kilovolts, onde foram processadas as eletromicrografias. Foi utilizado filme Cronalar HS - 7 - Dupon (Chapas de 8,2 x 10 cm).

A revelação foi feita por três a quatro minutos, utilizando-se revelador Kodak D - 19, diluído em água na proporção de duas partes de H<sub>2</sub>O para uma do revelador e na temperatura de 21°C. Os negativos foram fixados em fixador F<sub>5</sub> da Kodak, durante 15 minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente por 30 minutos e colocados a temperatura ambiente para secar.

Após a revelação, foram processadas as cópias dos negativos, utilizando-se papel de ampliação resinado, marca Kodabromide F<sub>3</sub>. A ampliação utilizada foi de 1,5 vezes o tamanho do negativo. A revelação das cópias foi feita com revelador Dektol, diluído em água, na proporção de duas partes de água para uma do revelador, durante um minuto. Em seguida, as cópias foram lavadas em água por 60 segundos e fixadas em fixador F<sub>5</sub> por 15 minutos. Após a fixação, foi feita a lavagem em água corrente por 15 minutos e aspergol por mais 10 minutos.

## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Desenvolvimento endógeno de *Eimeria ninakohlyakimovae*

Foram observadas duas gerações merogônicas, gametogênese e formação de oocistos em 21 animais entre 25 necropsiados. Os merontes primários foram detectados no íleo, a partir do 7º DAI, localizando-se nas células endoteliais dos vasos quilíferos das vilosidades, na lâmina própria e, com menor frequência, nos vasos linfáticos da submucosa. Um meronte foi encontrado no cólon 11 DAI. Um meronte, detectado 7 DAI mediu 58,2 x 48,9 µm e continha 42 núcleos bem definidos, com resíduo de 4,5 x 3,3 µm e estava envolvido por uma cápsula, com 4,1 µm de espessura (**Figura 1**).

No 8º DAI, os merontes mediram 64,0 (31,2-78,0) x 56,3 (22,9-72,8) µm e possuem paredes mais delgadas com espessura média de 3,41 µm (**Figura 2**). No 9º DAI, os merontes mediram 86,1 (72,9-116,8) x 71,5 (46,8-108,4) µm e continham vários núcleos, na maioria das vezes concentrados no centro, distribuídos aleatoriamente ou formando compartimentos dentro do meronte (**Figura 3**). A espessura média da parede foi de 3,37 µm. No 10º DAI, os merontes imaturos mediram 127,3 (55,1-208,5) x 95,7 (50-129,3) µm com núcleos, na maioria das vezes formando vários compartimentos no interior do meronte e com

parede delgada (3,23  $\mu\text{m}$ ) que, às vezes, era muito fina, tornando-se quase imperceptível (**Figura 4**). Os merontes primários maduros foram observados a partir do 10° DAI, medindo 165,5 (125,1-300,2) x 123,6 (62,6-196,0)  $\mu\text{m}$  e contendo grande número de merozoítos dispostos um ao lado do outro ocupando todo meronte (**Figura 5, 6 e 7**). Corpo residual foi observado algumas vezes. Os merozoítos foram encontrados livres na luz do íleo, após o rompimento de merontes maduros (**Figura 8**).

A segunda geração merogônica foi observada nas células epiteliais de revestimento das criptas do ceco e do cólon. Os trofozoítos e os merontes imaturos de segunda geração, foram observados a partir do 11° DAI (**Figuras 9 e 10**) e os merontes secundários maduros a partir do 12° DAI (**Figuras 11 e 12**). Localizavam-se geralmente acima do núcleo da célula hospedeira e infecções múltiplas com criptas totalmente parasitadas foram observadas com freqüência. Os merontes secundários maduros mediram 16,8 (10,3 - 24,6) x 11,6 (7,4 - 15,6)  $\mu\text{m}$  e continham 10 a 32 merozoítos ( $\bar{X} = 24$ ). Os merozoítos mediram 6,9 (5,3-7,8) x 1,8 (1,6-2,1)  $\mu\text{m}$  e estavam localizados um ao lado do outro, ocupando todo o interior do meronte (**Figuras 11 e 12**).

A gametogênese e a formação de oocistos também ocorreram no epitélio das criptas do ceco e do cólon, onde os gamontes, microgametas, macrogametas e oocistos jovens, localizavam-se abaixo do núcleo da célula hospedeira e, foram observados a partir do 13° DAI. Células infectadas com mais de um gamonte foram freqüentes.

Os microgamontes apresentaram vários núcleos distribuídos na periferia e, quando maduros, mediram 16,1 (10,3-18,5) x 13,0 (9,2-16,4)  $\mu\text{m}$  e continham vários microgametas distribuídos aleatoriamente no seu interior (**Figura**

13), apresentando às vezes, corpo residual. A maioria dos microgamontes (77%) foi encontrada no ceco.

Os macrogamontes apresentaram núcleo central grande e nucléolo bem definido (**Figura 14**). Os macrogametas apresentavam vários grânulos eosinofílicos distribuídos aleatoriamente no citoplasma ou organizados na periferia do parasito, medindo 14,7 (11,5-17,2) x 12,5 (9,0-15,6)  $\mu\text{m}$  e, 86% se localizavam no cólon (**Figura 15**).

Os oocistos imaturos mediram 18,3 (16,4-23,8) x 13,3 (9,4-18,4)  $\mu\text{m}$  e apresentam parede nítida com esporonte bastante desenvolvido (**Figura 16**).

No fígado, vesícula biliar, coração, pulmões, baço, pâncreas, rins e linfonodos mesentéricos, não foram observadas formas endógenas de *E. ninakohlyakimovae* bem como lesões de coccidiose a ela atribuída.

Nos cabritos sacrificados no 10° e 15° DAI e, no que morreu no 16°DAI, foram observadas formas endógenas de *Cryptosporidium*, nos intestinos delgado e grosso.

## 5.2 Curso da infecção por *E. ninakohlyakimovae*

O período prepatente em 18 cabritos foi de  $14,7 \pm 1,0$  (13-17) dias e o patente de  $6,8 \pm 1,6$  (4-10) dias. O período de esporulação foi de 2 a 3 dias. Morte causada por *E. ninakohlyakimovae* ocorreu em apenas um cabrito infectado com  $2,0 \times 10^5$  oocistos esporulados / kg, no 16° DAI. O animal apresentou diarreia de coloração escura no 13° DAI, simultaneamente com o aparecimento de oocistos de *E. ninakohlyakimovae* nas fezes. O pico da eliminação de oocistos foi observado do 15° para o 16° DAI, com 242.700 oocistos por grama de fezes (OOPG),

coincidindo com a morte do animal. Nesse período, o cabrito eliminou 200 ml de fezes totalmente líquidas e sanguinolentas, com coloração vermelho vivo e muco. Antes da morte, o animal apresentou apatia, perda total de apetite e desidratação intensa.

Os outros cabritos infectados com as quatro diferentes doses de oocistos apresentaram sinais clínicos de eimeriose, mas nenhum morreu. Os sintomas mais severos, foram observados nos animais infectados com  $2,0 \times 10^5$  oocistos esporulados / kg, e consistiram de fezes diarréicas, de odor fétido e coloração marrom escuro, com presença de sangue não metabolizado e muco, falta de apetite, desidratação, pêlos arrepiados e sem brilho e debilidade orgânica generalizada. A diarréia durou aproximadamente uma semana, e a falta de apetite, tinha uma duração de dois a três dias.

Nos cabritos infectados com  $5,0 \times 10^4$ ;  $1,5 \times 10^5$  e  $9,0 \times 10^5$  oocistos / kg, os sinais clínicos de eimeriose foram moderados e consistiram apenas de uma discreta diarréia de coloração amarelo-amarronzada e odor fétido. Presença de muco e sangue nas fezes foram observados apenas no grupo inoculado com  $1,5 \times 10^5$  oocistos /kg. Nestes animais, o ganho médio de peso, acompanhado por um período de 24 dias, foi de 1,8 kg e, no grupo controle, no mesmo período, com os animais mantidos sob as mesmas condições, foi de 2,1 kg.

Na maioria dos animais inoculados, o início da sintomatologia clínica de eimeriose coincidiu com o aparecimento de oocistos nas fezes, ou em raros casos, surgiu um ou dois dias após. O número máximo de OOPG eliminados pelos animais infectados ocorreu entre o segundo e o terceiro dia de patencia. Em apenas dois animais, este pico aconteceu no quarto dia de patencia. Os animais inoculados com  $9,0 \times 10^5$  oocistos por /kg, eliminaram menos oocistos, por um período menor e

foram os que apresentaram sintomas de eimeriose mais discretos, que os infectados com as doses menores.

### **5.3. Achados de Necrópsia**

Nos cabritos necropsiados do segundo ao 13º DAI, não foi observada alteração macroscópica. Nos animais sacrificados a partir do 15º DAI, verificou-se espessamento, edema, hemorragia petequiral e hiperemia da mucosa do ceco e do cólon. Os linfonodos mesentéricos, principalmente o íleo-cecal, estavam aumentados de volume. Não foram observadas alterações no intestino delgado.

### **5.4. Alterações Histológicas**

Como ocorreu na macroscopia, não foi encontrada alteração histológica nos cabritos sacrificados até o 13º DAI. Os cabritos necropsiados a partir do 15º DAI apresentaram descamação do epitélio das criptas do ceco e do cólon. As lesões mais intensas ocorreram no cabrito necropsiado no 15º DAI e no que morreu no 16º DAI. Nestes, as lesões consistiram de uma destruição quase total das criptas, com hemorragia, hiperemia, edema e necrose. Existem regiões que a descamação de epitélio foi tão intensa que a estrutura das criptas estava totalmente destruída. Nestas áreas, foram observados aglomerados de parasito, principalmente microgamontes e macrogametas, localizados na luz das criptas. No intestino delgado não ocorreu alteração.

O infiltrado inflamatório foi discreto e consistiu de raros plasmócitos, linfócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, localizado na submucosa e com menor intensidade no epitélio das criptas do ceco e do cólon.

## **5.5. Ultraestrutura**

### **5.5.1. Desenvolvimento de merozoítos e ultraestrutura de merontes secundários**

Os merontes secundários foram observados nas células epiteliais de revestimentos das criptas do ceco e do cólon. Localizavam-se acima do núcleo da célula hospedeira, no interior de um vacúolo parasitóforo, delimitados por uma membrana. Inicialmente, foram observados os trofozoítos, contendo um ou dois núcleos com cromatina periférica e vacúolos elétron-lúcidos (**Figuras 17 e 18**).

O desenvolvimento dos merozoítos inicia-se com a divisão dos núcleos e estes desenvolvem-se a partir de um alongamento do citoplasma, onde observa-se a formação do complexo apical e a migração do núcleo em direção à porção projetada (**Figura 19**). Simultaneamente, forma-se a membrana plasmática do parasito. Nesse estágio, a região anterior do merozoíto está livre, e a posterior, ligada ao meronte. Por último, a extremidade posterior do merozoíto é liberada do meronte (**Figura 20**). O corpo residual do meronte contém grânulos de polissacarídeos.



### **5.5.2. Ultraestrutura de merozoítos**

Os merozoítos foram encontrados livres no interior de vacúolos parasitóforos, envolvidos por dupla membrana (**Figura 21**). Contêm um núcleo com nucléolo e cromatina periférica (**Figura 22**). O complexo apical é constituído pelo conóide, um par de roptrias e vários micronemas (**Figuras 23 e 24**). O ducto das roptrias se dirige para a extremidade anterior e se estende até o conóide e, a região posterior, mais larga e com formato de fundo de saco, se prolonga no sentido caudal, até aproximadamente, a metade do merozoíto (**Figura 24**). O anel polar anterior não foi verificado, mas o posterior foi observado com nitidez. O microporo se localiza acima do núcleo, na região anterior (**Figura 25**). Dois a quatro corpos eletrón-densos, esféricos, estão localizados geralmente na região anterior (**Figura 25**). Grânulos de polissacarídeos distribuídos por todo o parasito, foram observados com frequência (**Figura 24**).

### **5.5.3 Ultraestrutura de microgamontes e formação de microgametas**

Os microgamontes, no interior de vacúolos parasitóforos, desenvolvem-se abaixo do núcleo das células epiteliais das criptas do ceco e do cólon (**Figura 26**). Apresentam forma arredondada ou ligeiramente oval e estão envolvidos por uma membrana. Os microgamontes imaturos contêm de um a 19 núcleos, distribuídos no citoplasma ou localizados na periferia do parasito, com núcleo central e cromatina periférica (**Figuras 27, 28 e 29**). Mitocondrias da célula hospedeira foram observadas com frequência, formando aglomerados em volta do vacuolo parasitóforo (**Figura 28**). Grânulos de polissacarídeos são observados a

partir dos estágios iniciais de desenvolvimento. A divisão nuclear ocorre simultaneamente com o desenvolvimento do parasito. Os microgametas desenvolvem-se em duas fases. Inicialmente ocorre a divisão nuclear e em seguida se diferenciam. Após a divisão nuclear, os núcleos migram para a periferia do parasito e a cromatina concentra-se na metade do núcleo (**Figura 30**). O núcleo apresenta duas regiões. Uma elétron-densa migra em direção à membrana do parasito e, a outra menos densa, permanece ligada ao microgamonte (**Figuras 31 e 32**). Após a maturação, a porção posterior do microgameta, é liberada do microgamonte. O corpo residual do microgamonte contém grânulos de polissacarídeos (**Figura 33**).

#### **5.5.4 Ultraestrutura de Microgametas**

Os microgametas estão livres em vacúolos parasitóforos ou em volta do corpo residual (**Figuras 33 e 34**). Apresentam forma alongada ou ligeiramente curva; e em cortes transversais são arredondados. São constituídos por um corpo, associado a uma mitocôndria alongada e um núcleo eletron-denso, envolvido por duas membranas (**Figura 35**). Possuem três flagelos, que se originam na extremidade anterior e são maiores que o comprimento do microgameta (**Figura 36**). Em cortes transversais de flagelos dos microgametas, foram observados nove pares de microtubulos localizados na periferia e, um par central (**Figura 37**).

### **5.5.5. Desenvolvimento e ultraestrutura de macrogametas e oocistos**

Os merozoítos secundários, quando penetram na célula epitelial, poderão originar micro ou macrogamontes (**Figura 38**).

Os macrogamontes desenvolvem-se abaixo do núcleo das células epiteliais das criptas do ceco e do cólon. Tem formato ovóide e estão no interior de um vacúolo parasitóforo, envolvidos aparentemente por apenas uma membrana. Possuem núcleo grande, situado no centro do parasito, com nucléolo proeminente (**Figura 39**). Os corpos formadores de parede tipo II (WFB II) são os primeiros a serem formados, contendo estrutura pouco elétron-densa, com aspecto esponjoso e, estão geralmente próximos a organelas parecidos com retículo endoplasmático rugoso, envolvidos por uma pequena área elétron-lúcida (**Figura 40**). Os grânulos formadores de parede tipo I (WFB I) foram observados somente nos estágios mais adiantados. São elétron-densos, esféricos e menores que os WFB II (**Figura 41**).

Nos macrogametas os WFB I, em fileira, estão distribuídos na periferia do parasito e os WFB II se concentram na parte central (**Figura 41**). Grânulos de polissacarídeos e canalículos eletron-lúcidos, são numerosos nesse estágio.

Os oocistos jovens, são envolvidos por uma parede dupla e contém um esporonte com grânulos de polissacarídeos, de tamanho maior, mais numerosos e mais eletron-lúcidos, que nos macrogametas (**Figuras 42 e 43**).

## **6. PRANCHAS**

**PRANCHA I**

## **PRANCHA I**

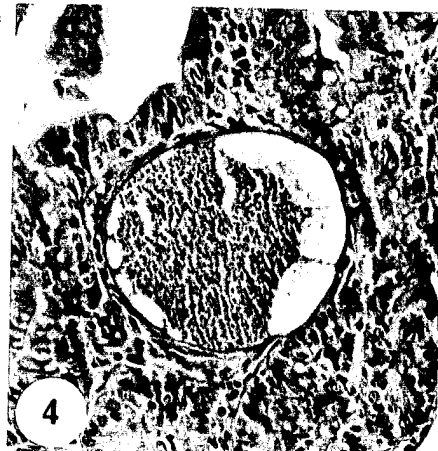
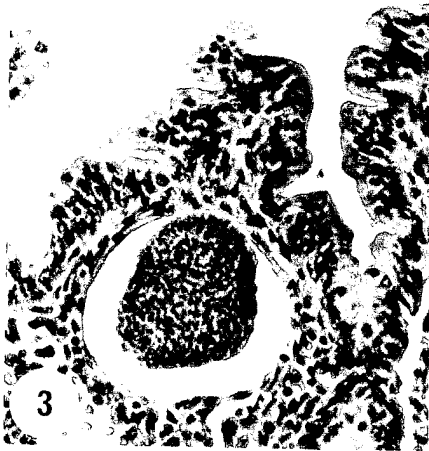
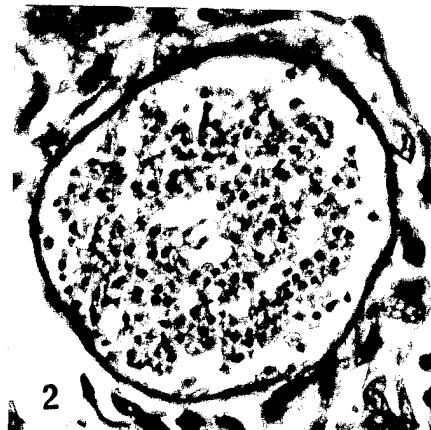
**Figuras 1 - 4.** Primeira geração merogônica de *E. ninakohlyakimovae*, no íleo de cabritos experimentalmente infectados, H&E.

1. Meronte imaturo, 7 DAI (430x)

2. Meronte imaturo, 8 DAI (650x)

3. Meronte imaturo, 9 DAI (260x)

4. Meronte imaturo, 10 DAI (260x)



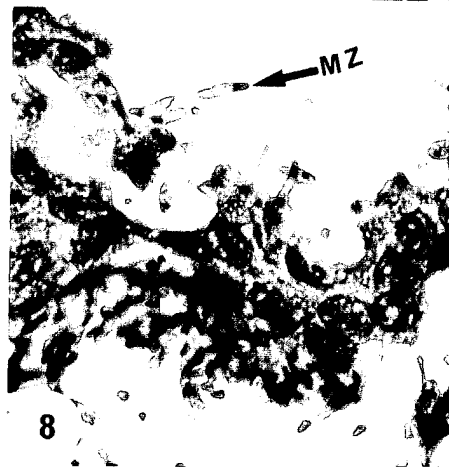
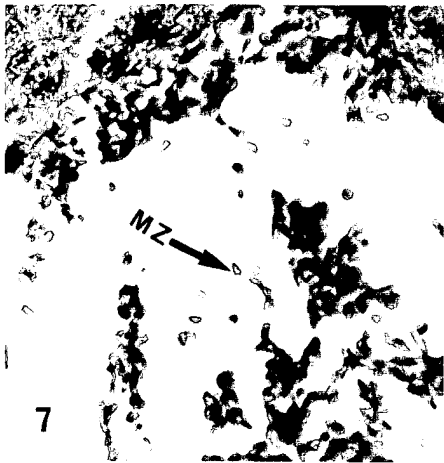
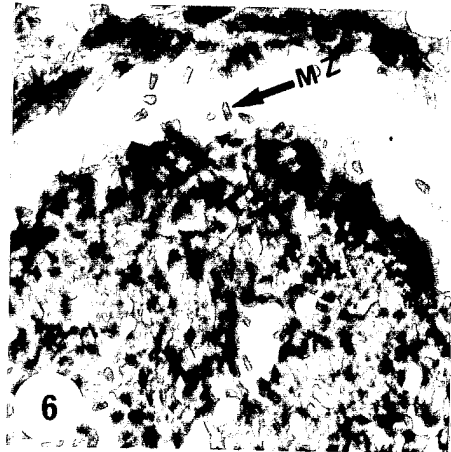
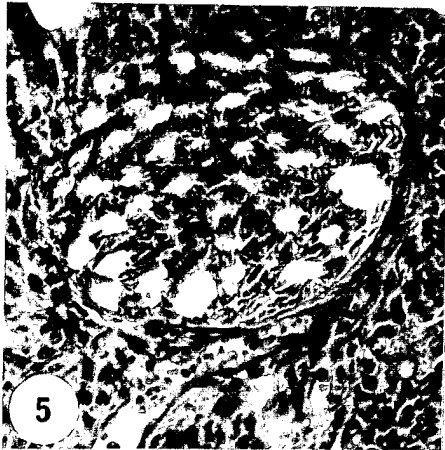
**PRANCHA II**



## PRANCHA II

**Figuras 5 - 8.** Merontes primários maduros e merozoítos de primeira geração de *E. ninakohlyakimovae*, no ileo de cabritos experimentalmente infectados, H&E.

5. Meronte maduro, 10 DAI (350x)
6. Meronte maduro com merozoítos (MZ), 11 DAI (825x)
7. Merozoítos livres no meronte, 11 DAI (850x)
8. Merozoítos livres na luz do ileo, 11 DAI (850x)



**PRANCHA III**

### **PRANCHA III**

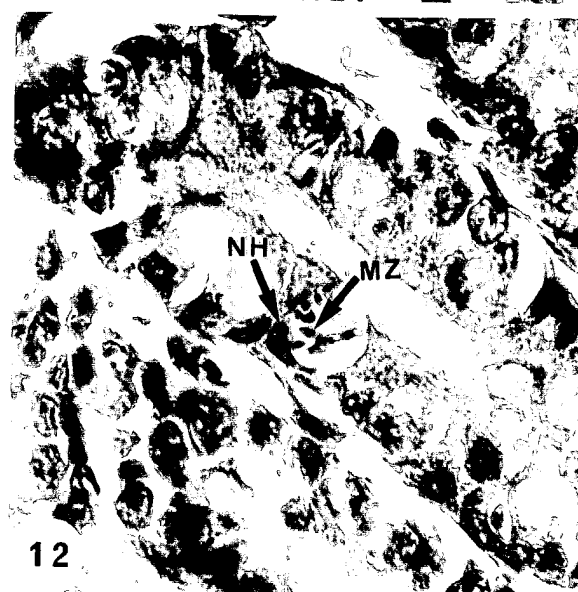
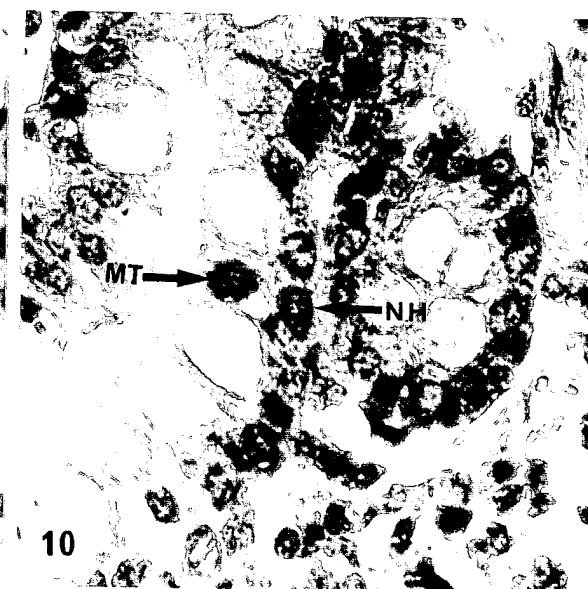
**Figuras 9 - 12.** Segunda geração merogônica de *E. ninakohlyakimovae* em células epiteliais das criptas do ceco e cólon de cabritos experimentalmente infectados, H&E (825x).

**9.** Trofozoitos (A) e meronte imaturo (B); núcleo da célula hospedeira (NH), 11 DAI

**10.** Meronte imaturo (MT); NH, 12 DAI

**11.** Meronte maduro; merozoítos (MZ), 12 DAI

**12.** Meronte maduro com merozoítos (MZ); NH, 12 DAI



**PRANCHA IV**

## PRANCHA IV

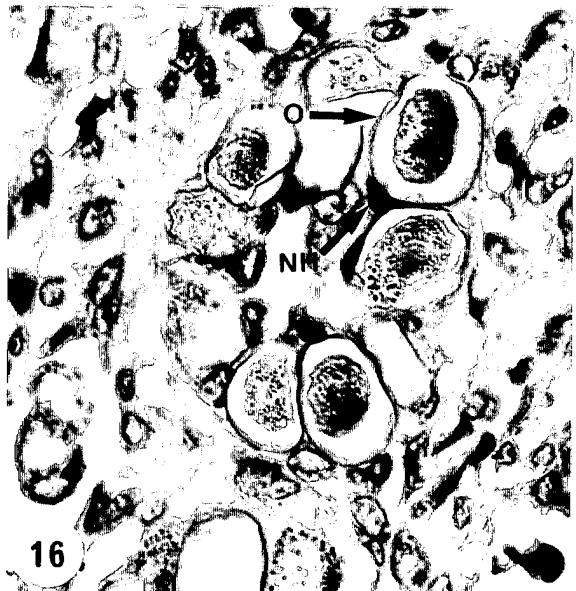
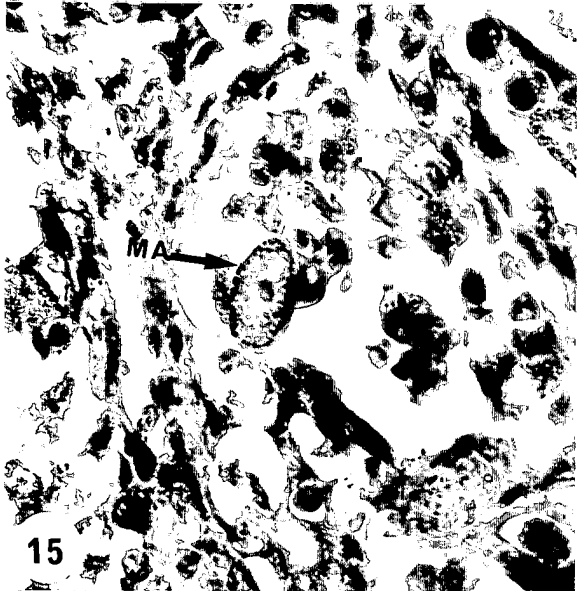
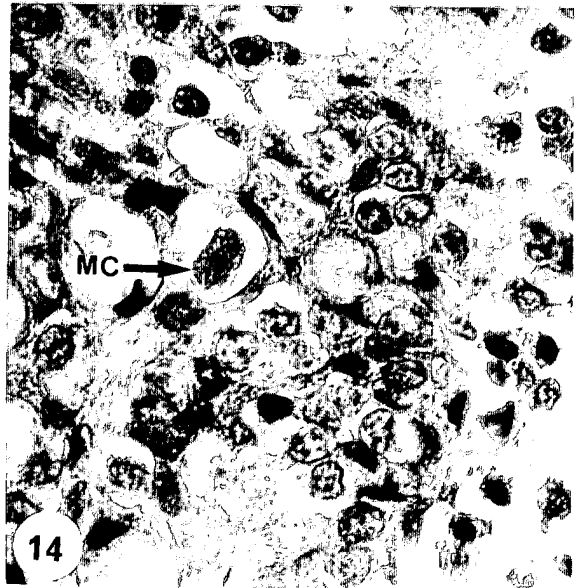
**Figuras 13 - 16.** Gametogênese e formação de oocistos de *E. ninakohlyakimovae*, em células epiteliais das criptas do ceco e cólon de cabritos experimentalmente infectados, H&E, 13 DAI (825x).

**13.** Microgamontes (A) e Microgametas (B); núcleo da célula hospedeira (NH).

**14.** Macrogamonte (MC);

**15.** Macrogameta (MA)

**16.** Oocistos imaturos (O); NH





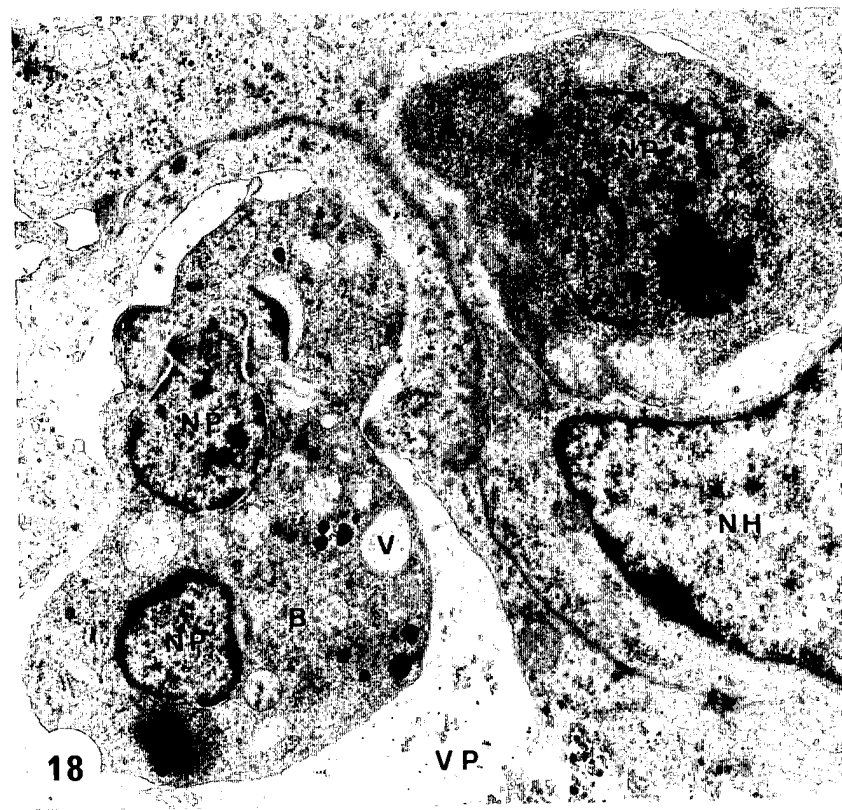
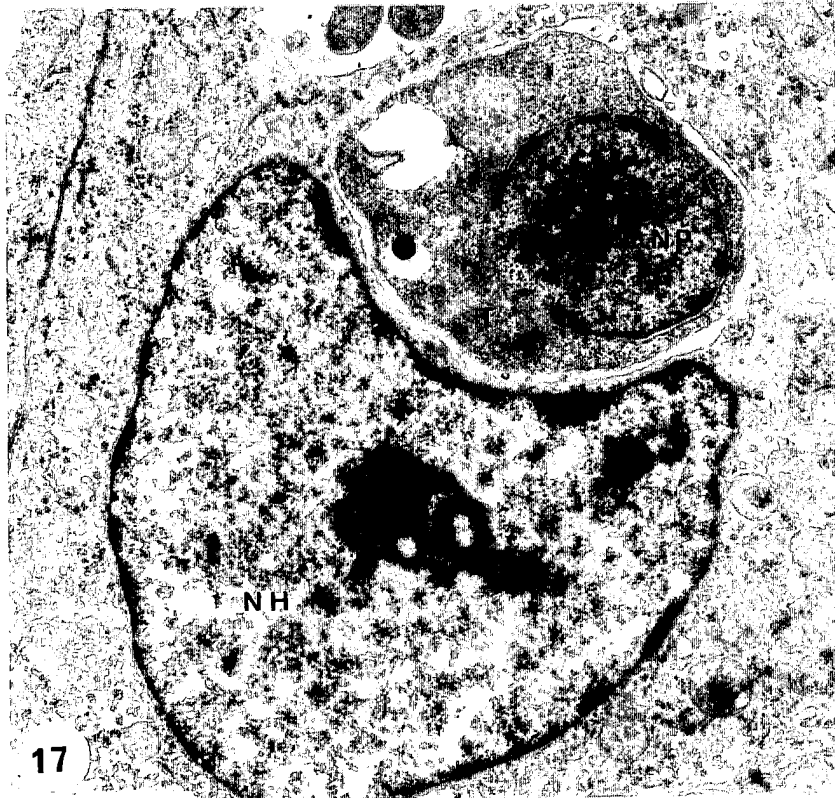
**PRANCHA V**

## **PRANCHA V**

**Figuras 17 - 18.** Ultraestrutura da segunda geração merogônica de *E. ninakohlyakimovae* em células epiteliais do ceco e cólon de cabrito experimentalmente infectado, 15 DAI.

**17.** Trofozoito (T); núcleo do parasito (NP) e núcleo da célula hospedeira (NH), 15.030x.

**18.** Trofozoito (A) e meronte binucleado (B); vacuolo parasitóforo (VP), vacuolo elétron - lúcido (V), NP; NH, 12.075x

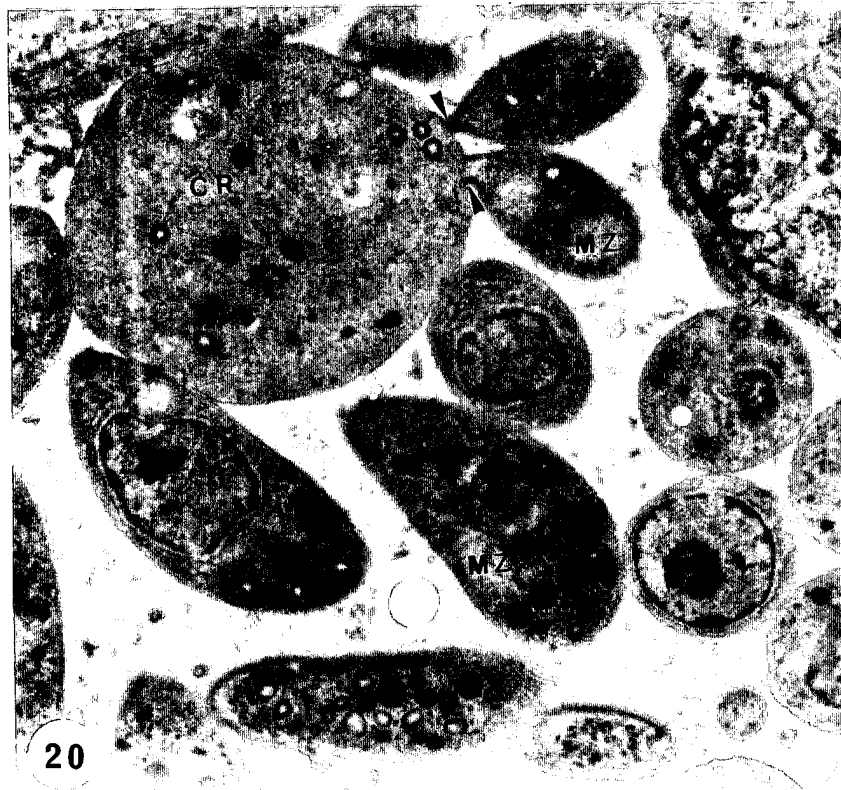
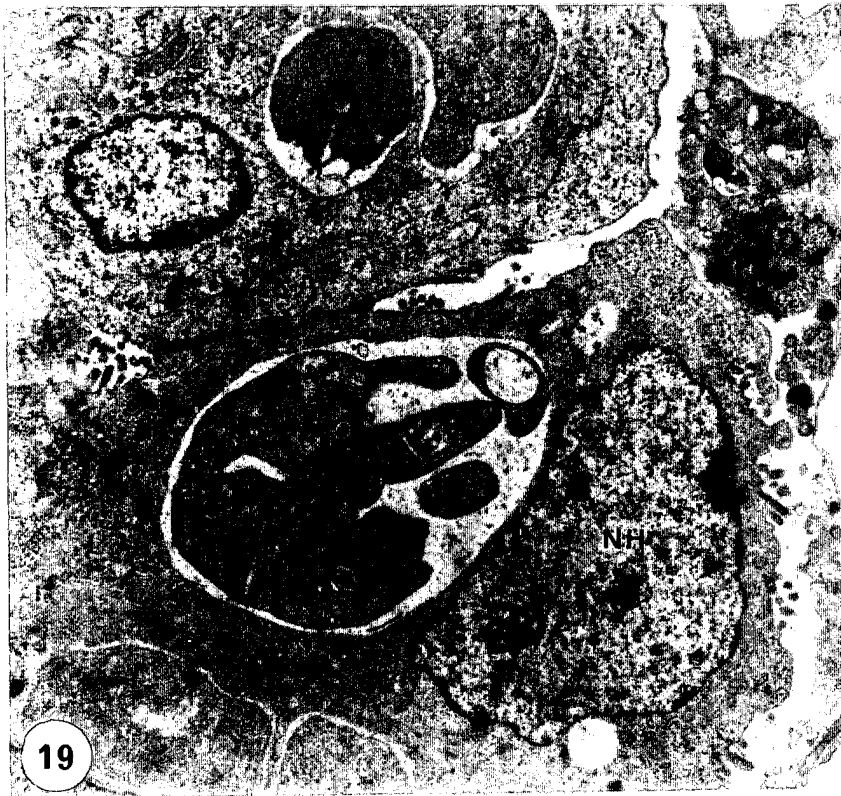


**PRANCHA VI**

## PRANCHA VI

**Figuras 19 e 20.** Ultraestrutura de diferentes estágios de merogônia secundária de *E. ninakohlyakimovae*, em células epiteliais do ceco e cólon de cabrito experimentalmente infectado, 15 DAI.

- 19.** Meronte (ME). Divisão e migração dos núcleos, alongamento da superfície do meronte e formação do complexo apical do merozoíto; núcleo da célula hospedeira (NH), 7.275x.
- 20.** Formação e liberação (setas) de merozoítos; Corpo residual - CR, 12.075x.



**PRANCHA VII**

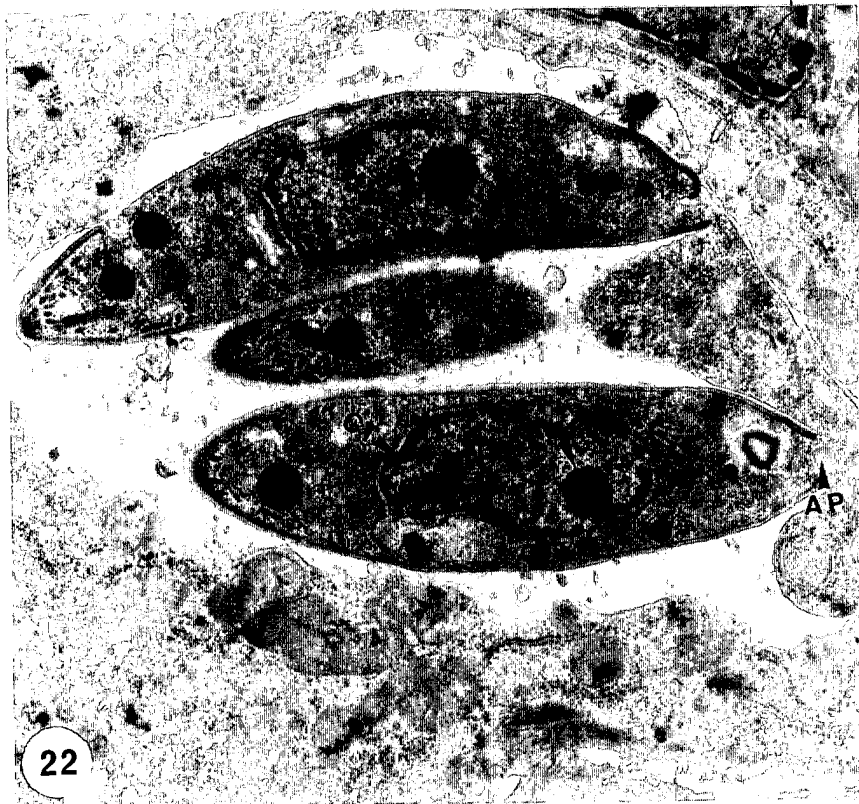
## **PRANCHA VII**

**Figuras 21 e 22.** Ultraestrutura de merozoítos de *E. ninakohlyakimovae* em células epiteliais do ceco e cólon de cabrito experimentalmente infectado, 15 DAI, 15.030x.

**21.** Merozoítos (MZ) livres no vacuolo parasitóforo.

**22.** Merozoítos; núcleo (NP), Cromatina (CT), nucleolo (NU) e anel polar posterior (AP).





**PRANCHA VIII**

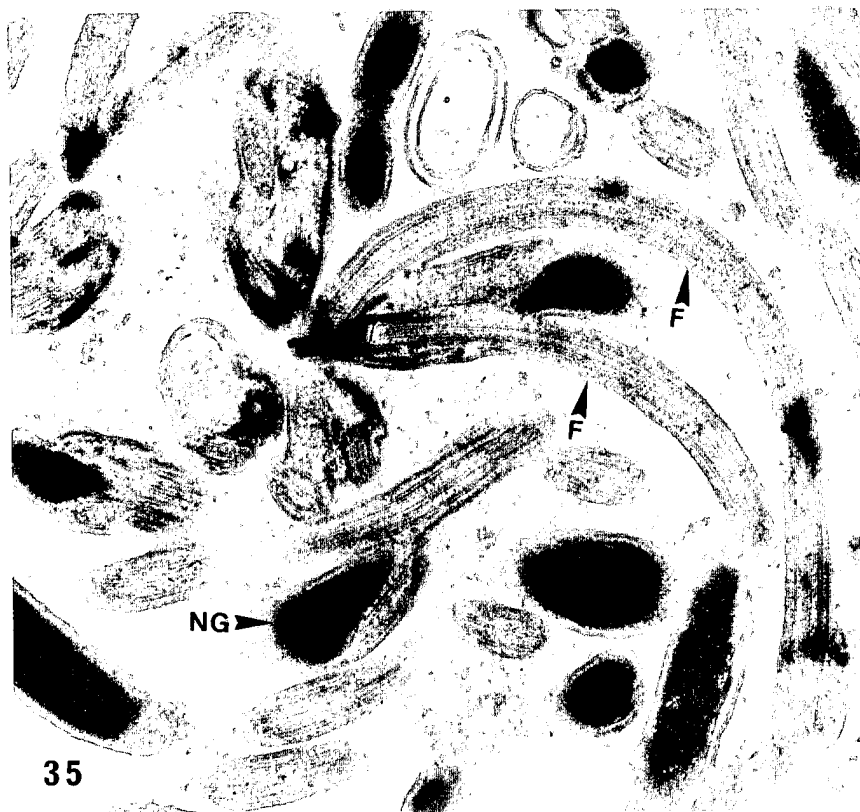
## PRANCHA VIII

**Figuras 23 a 25.** Ultraestrutura de merozoítos de *E. ninakohlyakimovae* em células epiteliais do ceco e cólon de cabrito experimentalmente infectado, 15 DAI.

**23.** Merozoíto; Conóide (CO), 15.030x

**24.** Merozoíto; Conóide (CO), Róptria (R) e granulos de polissacarídeos (GP), 37.800x.

**25.** Micronemas (MI), Microporo (MP) e corpos elétrondensos (CED), 47.550x.



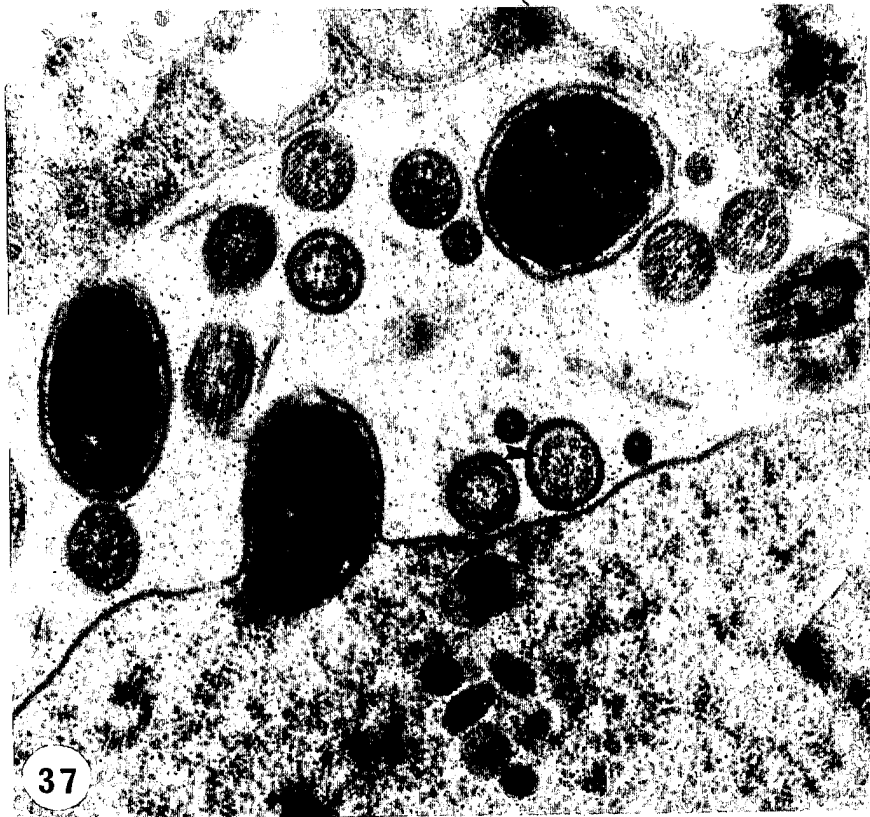
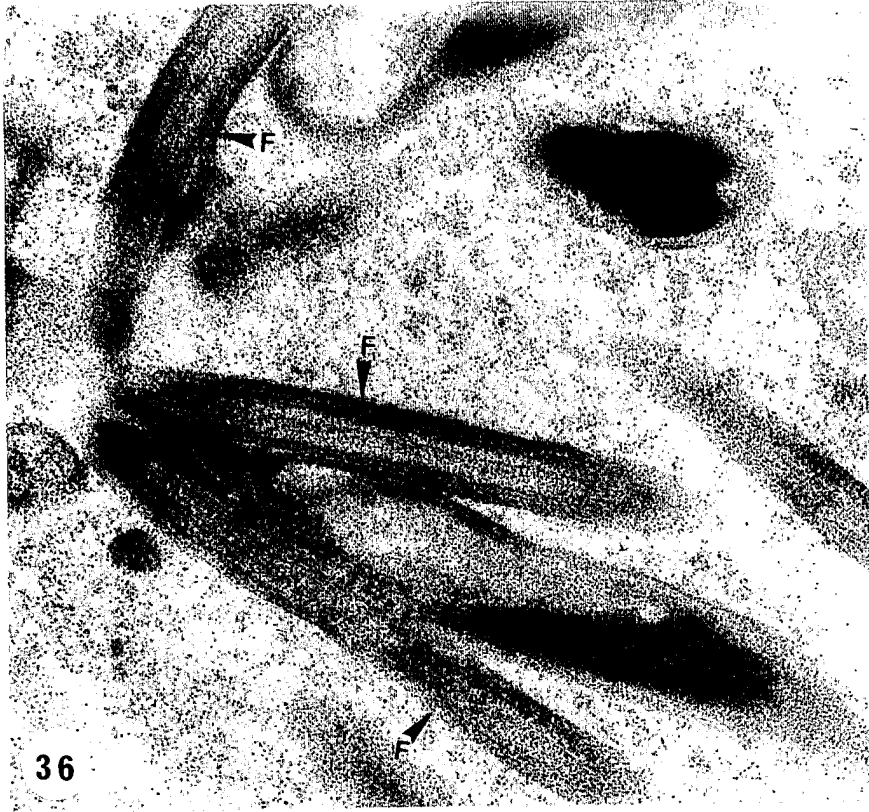
**PRANCHA XIV**

## PRANCHA XIV

**Figuras 36 e 37.** Ultraestrutura de microgametas de *E. ninakohlyakimovae*, em células epiteliais do ceco e cólon de cabrito experimentalmente infectado, 15 DAI.

**36.** Microgameta; flagelos (F), 24.300x.

**37.** Corte transversal de flagelos de microgametas  
(setas), 37.800x.



**PRANCHA XV**

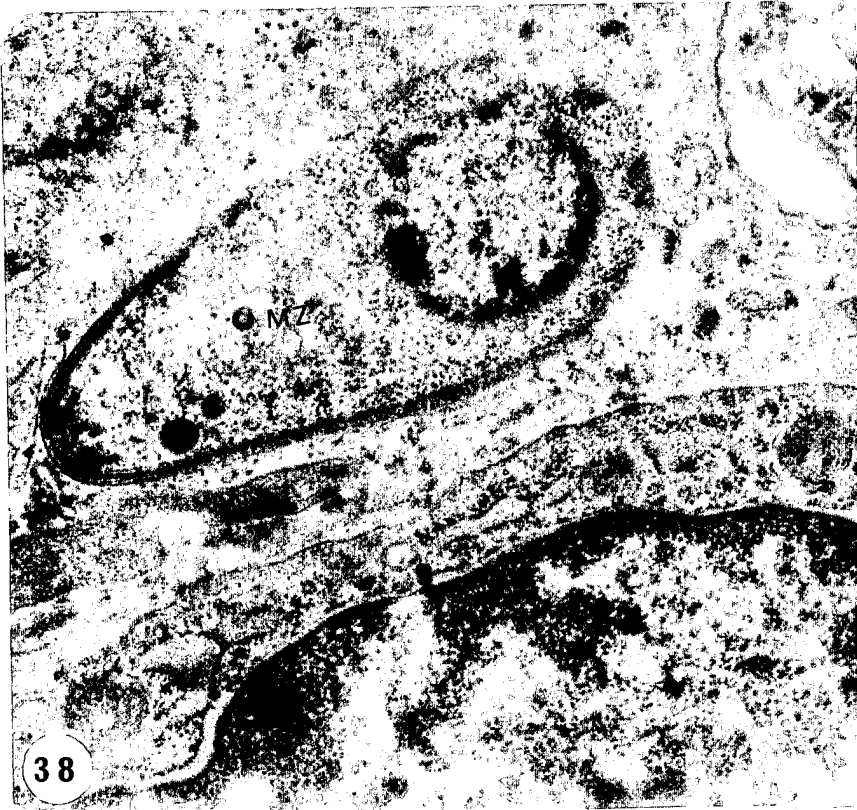


## **PRANCHA XV**

**Figuras 38 e 39.** Ultraestrutura de macrogamontes de *E. ninakohlyakimovae*, em células epiteliais do ceco e cólon de cabrito experimentalmente infectado, 15 DAI.

**38.** Merozoíto (MZ) no interior de célula epitelial, 30.060x.

**39.** Macrogamonte (MC); núcleo (NP), Vacuolo Parasitóforo (VP); Núcleo da Célula hospedeira (NH), 12.075x.



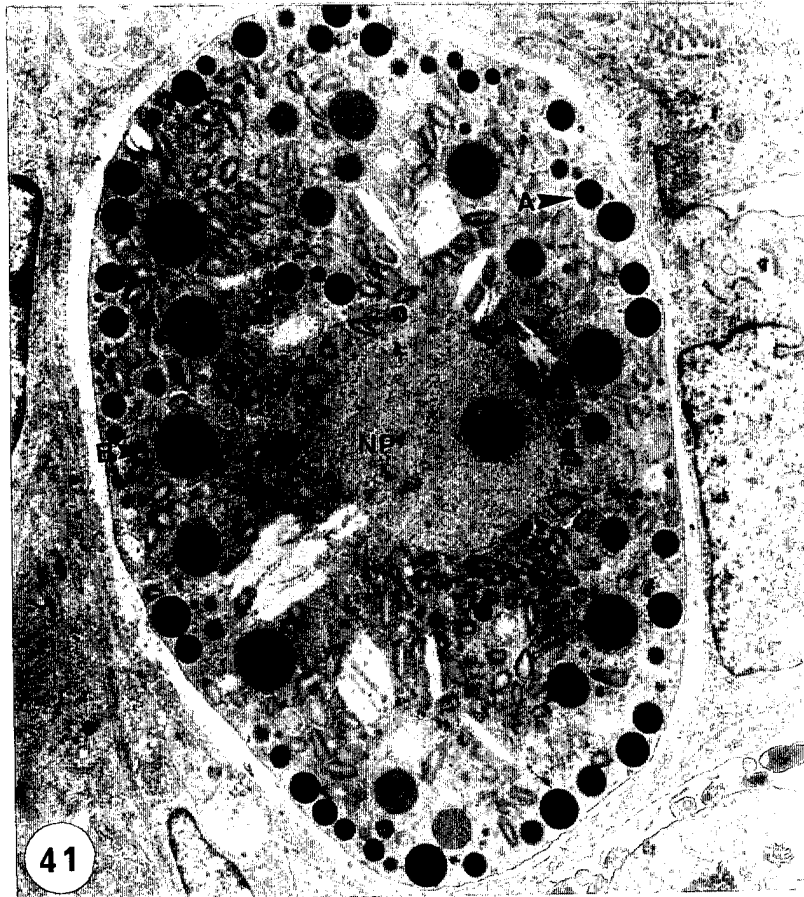
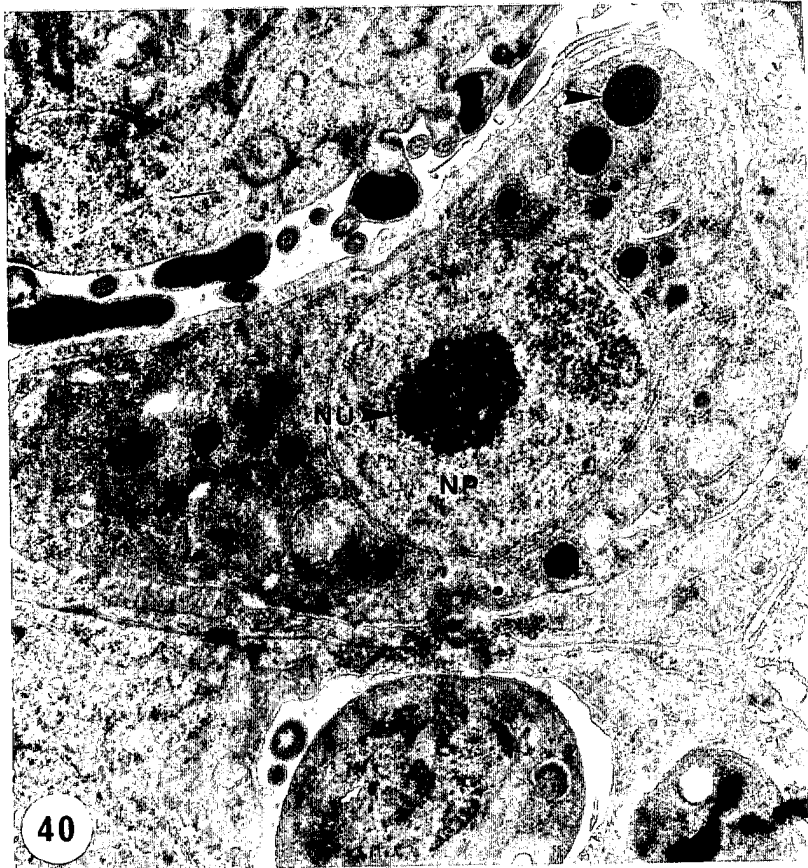
**PRANCHA XVI**

## PRANCHA XVI

**Figuras 40 e 41.** Formação de macrogametas de *E. ninakohlyakimovae* em células epiteliais do ceco e cólon de cabrito experimentalmente infectado, 15 DAI, 12.075x.

**40.** Macrogamonte; Corpos formadores de parede tipo II (Seta), núcleo (NP) e nucleolo (NU).

**41.** Macrogameta; Corpos formadores de parede tipo I (A), tipo II (B) e núcleo (NP).



**PRANCHA XVII**

## **PRANCHA XVII**

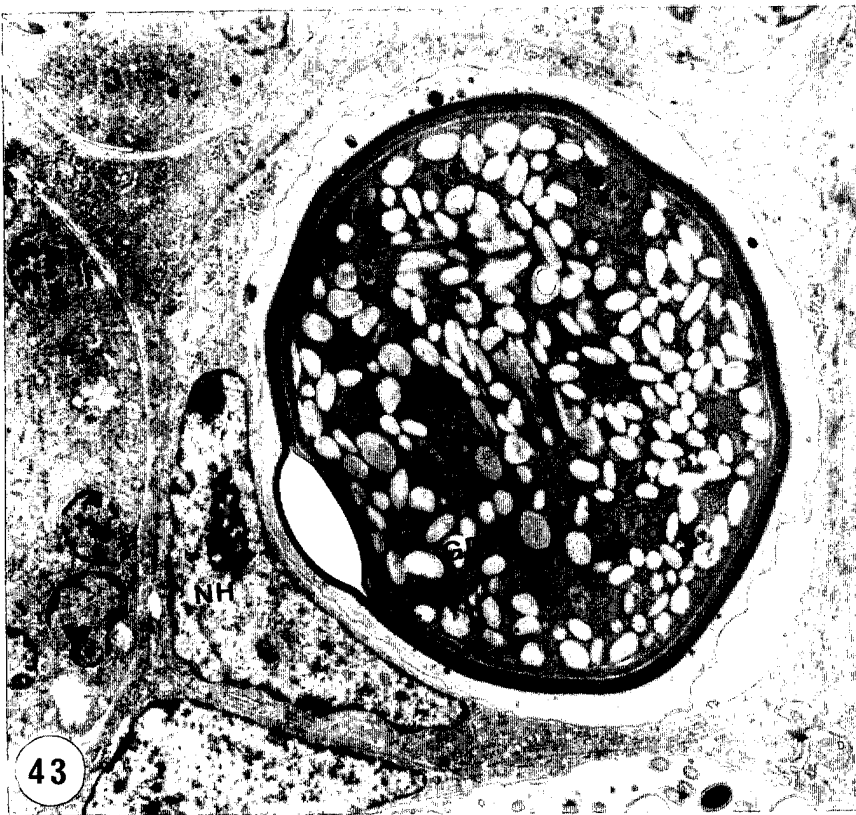
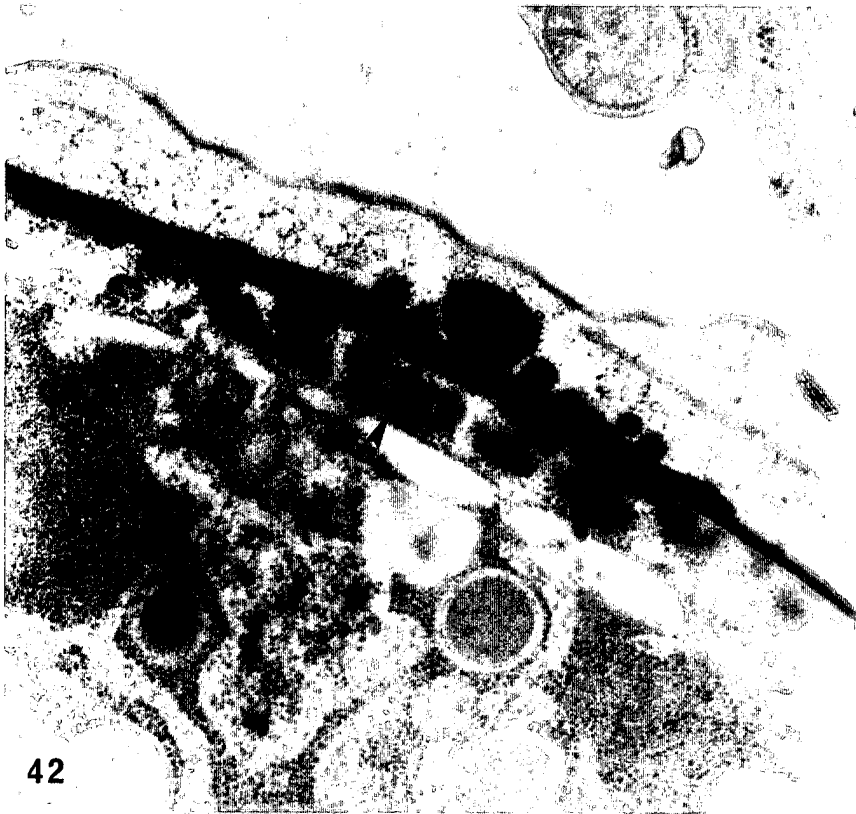
**Figuras 42 e 43.** Formação da parede do oocisto de *E. ninakohlyakimovae* em células epiteliais do ceco e cólon de cabrito experimentalmente infectado, 15 DAI.

**42.** Coalescência dos grânulos formadores de parede tipo II

(Seta), 37.800x.

**43.** Oocistos; grânulos de polissacarídeos (GP); núcleo da

célula hospedeira (NH), 7.275x.







**7. DISCUSSÃO**

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Desenvolvimento endógeno de *Eimeria ninakohlyakimovae*

O ciclo endógeno de *E. ninakohlyakimovae* é pouco conhecido, e algumas informações sobre ele devem ser consideradas com reservas. Os resultados apresentados por BALOZET (1932b;c) diferem dos encontrados neste trabalho e provêm de apenas um animal sacrificado 39 DAI. A localização, o período de desenvolvimento e as características morfológicas das formas endógenas diferem daquelas observadas para *E. ninakohlyakimovae* no presente estudo e, provavelmente, são de outra espécie de *Eimeria*. As observações de SAYIN (1964), também são questionáveis, por terem sido obtidas de infecção natural em apenas um animal e, segundo o próprio autor, as formas endógenas encontradas podem pertencer a outra espécie de *Eimeria*. Os resultados obtidos nesse experimento são comparáveis aos observados por NORTON (1986), mas as informações deste autor são restritas à localização e lesões provocadas por merontes secundários, gamontes e oocistos de *E. ninakohlyakimovae*, em um único cabrito infectado experimentalmente e sacrificado no 17º DAI.

A fase inicial do desenvolvimento endógeno de *E. ninakohlyakimovae*, semelhante à de outras espécies de *Eimeria* de caprinos (SAYIN, et al. 1978; LIMA, 1981, KANYARI, 1990), ocorre nas células endoteliais do intestino delgado, mas diferente delas se restringe ao íleo, onde são

encontrados os merontes primários. As outras fases do ciclo se desenvolvem no intestino grosso.

O desenvolvimento dos merontes primários da maioria das espécies de *Eimeria* de caprinos é restrito ao intestino delgado. A presença no intestino grosso, relatada neste experimento, representa o segundo registro neste órgão e assemelha-se às observações de KANYARI (1990) para *E. apsheronica*.

Entre as espécies de *Eimeria* com ciclo conhecido, apenas *E. alijevi* (SAYIN, 1966) e *E. apsheronica* (KANYARI, 1990), apresentam desenvolvimento endógeno em regiões comuns às de *E. ninakohlyakimovae*. Porém nessas espécies, a merogonia secundária, gametogênese e formação de oocistos, diferentemente de *E. ninakohlyakimovae*, também ocorrem no intestino delgado. Além disso, o tamanho dos estágios endógenos de *E. ninakohlyakimovae* são diferentes, embora as características morfológicas sejam semelhantes às espécies mencionadas.

Os resultados do presente trabalho e, os obtidos por diferentes autores (SAYIN, 1978; LIMA, 1981; KANYARI, 1990), sugerem que o desenvolvimento endógeno das espécies de *Eimeria* de caprinos tenha o mesmo padrão com duas gerações merogônicas, sendo a primeira em células endoteliais dos vasos quilíferos das vilosidades do intestino delgado; e a segunda em células epiteliais do intestino delgado e/ou do intestino grosso.

## **7.2. Curso da infecção**

O período prepatente encontrado no presente trabalho é semelhante ao descrito por NORTON (1986), para *E. ninakohlyakimovae*. O período prepatente menor, observado por BALOZET (1932b) é questionável, devido a identificação

dos oocistos que utilizou em seus experimentos. O período patente observado neste experimento representa a primeira informação a respeito para *E. ninakohlyakimovae* e é semelhante aqueles observados para *Eimeria arloingi*, *Eimeria apsheronica*, *Eimeria caprovina* e *Eimeria jolchijevi*; menor que os de *Eimeria alijevi*, *Eimeria christenseni* e *Eimeria hirci*; e maior que o de *Eimeria caprina* (LIMA, 1980).

Os sinais clínicos de eimeriose em cabritos experimentalmente infectados com *E. ninakohlyakimovae*, observados no presente estudo, foram semelhantes aos descritos por NORTON (1986), para esta espécie e aos observados nos casos de infecção natural causados por outros eimeriídeos (GILL & KATIVAR, 1961; BHATIA & PANDE, 1967; LLOYD & SOULSBY, 1978). Entretanto, a maioria dos autores não mencionam as espécies de *Eimeria*. presentes e, provavelmente foram infecções mistas, provocadas por várias espécies de *Eimeria*.

Neste estudo, sinais clínicos de eimeriose, causados por *E. ninakohlyakimovae*, foram observados até na menor dose infectante administrada ( $5,0 \times 10^4$  oocistos / kg). Os cabritos infectados com  $2,0 \times 10^5$  oocistos / kg apresentaram os sintomas mais graves de eimeriose; e um chegou a morrer com 16 DAI. Estes resultados confirmam a patogenicidade desta espécie para caprinos, já constatada em estudos anteriores (BALOZET, 1932 b; c; SAYIN, 1964). A patogenia da infecção por *E. ninakohlyakimovae*, em caprinos, é comparável a da *Eimeria ovinoidalis* em ovinos. Ambas destroem as células indiferenciadas das criptas do ceco e do cólon, deixando a mucosa desprovida de epitélio (NORTON, 1986). Geralmente, as espécies de coccídios que se localizam no intestino grosso de ruminantes são mais prejudiciais aos hospedeiros, que as espécies que desenvolvem-se no intestino delgado (GREGORY, 1983).

### **7.3. Período de esporulação**

O período de esporulação encontrado no presente trabalho é comparável aos observados por SAYIN (1964); OPOKU-PARE & CHINEME, (1979) e DEB et al., (1982), para *E. ninakohlyakimovae*. O período de esporulação mais longo, observado por BALOZET (1932b;c), para *E. ninakohlyakimovae*, pode ser devido não apenas a temperatura ou a oxigenação, mas também a identificação incorreta do parasito.

### **7.4. Lesões**

As alterações macroscópicas e histológicas causadas por *E. ninakohlyakimovae*, observadas neste experimento, são comparáveis às observações de NORTON (1986), em um cabrito inoculado experimentalmente com 5.000 oocistos esporulados dessa espécie, necropsiado com 17 DAI.

As lesões observadas neste experimento foram localizadas apenas no intestino grosso, sugerindo que a merogonia primária de *E. ninakohlyakimovae* não causa alterações significantes no intestino delgado de caprinos, comparável ao que ocorre com *Eimeria christensenii* (LIMA, 1981), onde as principais lesões são associadas com a gametogonia e formação de oocistos.

### **7.5. Dose infectante**

O fato dos cabritos inoculados com  $9,0 \times 10^5$  oocistos / kg, não terem apresentado sintomatologia clínica proporcional a dose infectante e terem

eliminados poucos oocistos nas fezes, pode ser explicado por um efeito “crowding factor”, no qual o número de células epiteliais disponível, não seja suficiente para albergar todos os parasitos, quando altas doses de oocistos são administradas (KRASSNER, 1963). Este fato foi observado por KOUWENHOVEN (1970), que inoculou aves com 60.000 oocistos esporulados de *Eimeria acervulina* e, estas não apresentaram sintomatologia clínica condizente com a dose infectante. LOTZE & LEEK (1970), trabalhando com *Eimeria intricata* em ovinos, acreditam que a reação do hospedeiro a uma infecção maciça por estágios assexuais, resulte na inibição dos estágios sexuais.

#### **7.6. Contaminação por *Cryptosporidium***

Neste estudo, foi observado infecção natural por *Cryptosporidium*; e seus estágios endógenos foram observados em três cabritos sacrificados no 10° e 15° DAI e, no que morreu com 16 DAI. Apesar disso, as alterações macroscópicas e histológicas, observadas nos dois últimos, sugerem ser causadas por *E. ninakohlyakimovae*, e não por *Cryptosporidium*. Esta afirmativa prende-se ao fato de que os animais não apresentaram nenhuma alteração gastrointestinal até o aparecimento de oocistos de *E. ninakohlyakimovae*, nas fezes, visto que o período prepatente do *Cryptosporidium* é de apenas quatro a cinco dias. Além disso, o animal necropsiado no 10° DAI, ainda não estava eliminando oocistos de *E. ninakohlyakimovae* nas fezes, apresentava formas endógenas de *Cryptosporidium* e não apresentou diarreia, desde o nascimento até a necropsia.

Embora, as alterações histológicas causadas por *Eimeria* e por *Cryptosporidium* sejam bastante semelhantes, o aspecto das fezes é diferente. A

causada por *Eimeria* tem coloração marrom escuro, com presença de sangue e às vezes pedaços de mucosa (LIMA, 1980); e as fezes diarréicas, em decorrência de uma criptosporidiose, é de coloração amarelada a incolor, sem sangue aparente, bem mais líquidas que a provocada por *Eimeria* e, nos casos mais severos, são eliminadas em forma de jato (VIEIRA et. al., 1995).

## **7.7. Ultraestrutura**

### **7.7.1. Ultraestrutura de merontes e merozoítos**

O desenvolvimento ultraestrutural dos merontes secundários e a formação de merozoítos de *E. ninakohlyakimovae* são semelhantes a *Eimeria bovis* (SHEFFIELD & HAMMOND, 1967; DUBREMETZ & ELSNER, 1979), *Eimeria ovinoidalis* (KELLEY & HAMMOND, 1973) e *Eimeria praecox* (LEE & MILLARD, 1971a).

Os vacúolos eletrôn-lúcidos encontrados nos trofozoítos de *E. ninakohlyakimovae* são comparáveis aos de *Eimeria acervulina*, descritos por MICHAEL (1975), como vacúolo alimentar.

A ultraestrutura dos merozoítos de *E. ninakohlyakimovae*, observada no presente trabalho, é comparável a de outras espécies de *Eimeria* (SHEFFIELD & HAMMOND, 1966; KELLEY & HAMMOND, 1973; FERNANDO, 1974).

Os corpos densos observados na região anterior dos merozoítos de *E. ninakohlyakimovae* são comparáveis aos de *E. acervulina*, descritos por MICHAEL (1975), como grânulos de proteína.

### 7.7.2. Microgametogênese e microgametas

A microgametogênese de *E. ninakohlyakimovae*, caracterizada pela multiplicação dos núcleos e pela diferenciação dos microgametas, assemelha-se ao padrão geral relatado em outras espécies de *Eimeria* (SCHOLTYSECK et al., 1972; BALL et al., 1988).

A concentração de mitocôndrias da célula hospedeira observada nas proximidades dos microgamontes de *E. ninakohlyakimovae*, já foi descrita por COY et al. (1989), em volta do vacuolo parasitóforo de merontes e gamontes de *E. mivati* de frangos.

Os microgametas de *E. ninakohlyakimovae* apresentam as mesmas estruturas de microgametas de outras espécies de *Eimeria* (SCHOLTYSECK et al., 1972; BALL & PITTILO, 1988; BALL et al., 1988).

### 7.7.3. Macrogametogênese e oocistos

Os aspectos ultraestruturais no desenvolvimento de macrogametas e formação da parede dos oocistos de *E. ninakohlyakimovae*, no geral, apresentam a mesma seqüência descrita para outras espécies de *Eimeria* de mamíferos (SCHOLTYSECK et al., 1971) e aves (SCHOLTYSECK et al., 1971; MICHAEL, 1975; WHEAT et al., 1976; ELWASILA, 1984; PITTILO & BALL, 1984).

Os WFB I e WFB II, observados nos macrogametas de *E. ninakohlyakimovae*, são comuns à maioria das espécies de *Eimeria* (SCHOLTYSECK et al., 1971).



Os WFB II de de *E. ninakohlyakimovae* foram formados antes dos WFB I, semelhante ao que ocorre com outras espécies de *Eimeria* (LEE & MILLARD, 1971a; 1971b; SCHOLTYSECK et al., 1971), com exceção de *Eimeria truncata* (GAJADHAR & STOCKDALE, 1986), onde os WFB I, são formados antes dos WFB II.

O tamanho dos WFB I e WFB II varia nas diferentes espécies de *Eimeria*. Os WFB I de *E. ninakohlyakimovae* são menores que os WFB II, comparável aos de *E. bovis* e *E. auburnensis* (SCHOLTYSECK et al., 1966, 1971); mas diferem dos de *E. perforans*, *E. tenella* e *E. maxima* (SCHOLTYSECK et al., 1971; ELWASILA, 1984.).

## **8. CONCLUSÕES**

## 8. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados das infecções experimentais de caprinos, com *E. ninakohlyakimovae*, observadas aos microscópios óptico e eletrônico de transmissão e, nos sintomas clínicos apresentados pelos animais infectados, conclui-se que:

- 8.1. O ciclo endógeno é constituído por duas gerações merogônicas. A primeira desenvolve-se no íleo, localizando-se nas células endoteliais dos vasos quilíferos das vilosidades, na lâmina própria e, nos vasos linfáticos da submucosa e a segunda, ocorre nas células epiteliais das criptas do ceco e do cólon;
- 8.2. Os merontes primários imaturos são detectados a partir do 7<sup>o</sup> DAI, os maduros a partir do 10<sup>o</sup> DAI, os secundários imaturos a partir do 11<sup>o</sup> DAI e os maduros a partir do 12<sup>o</sup> DAI.
- 8.3. Os merozoítos secundários são formados na superfície de merontes multinucleados, apresentam dupla membrana, complexo apical, formado por conóide, roptrias, micronemas e microporo, núcleo com nucléolo e cromatina periférica e outras estruturas comuns a este estágio de desenvolvimento;

- 8.4.** O período prepatente é de 14,7 dias, o patente de 6,8 dias e a esporulação dos oocistos a 30°C é de dois a três dias;
- 8.5.** Os microgamontes maduros, macrogametas e oocistos jovens são observados abaixo do núcleo das células epiteliais das criptas do ceco e do cólon no 13º DAI.
- 8.6.** A formação de gametas e oocistos são as fases do ciclo endógeno mais patogênicas, responsáveis pela destruição de células epiteliais das criptas do ceco e do cólon, com hemorragia, hiperemia, edema e necrose;
- 8.7.** A sintomatologia clínica inicia-se simultaneamente com o aparecimento de oocistos nas fezes e, é caracterizada por diarreia, redução do apetite, desidratação, baixo ganho de peso e morte.

## **9. REFERÊNCIAS**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, R.; PITTY, B. & MORALES, S. Generos de helmintos gastrointestinales y especies de coccidios de ganado caprino de Costa Rica. *Ciênc. Vet. Hered.*, v.12, n.1, p. 25-28, 1990.
- AUMONT, G.; YVORÉ, P. & ESNAULT, A. Experimental coccidiosis in goats. 1. Experimental model effects of parasitism on the feeding behaviour and the growth of animals and intestinal lesions. *Ann. Rech. Vet.*, v.15, n.4, p.467-473, 1984.
- BAHIRATHAN, M.; WEILGAMA, D. J.; WIJESUNDERA, M. K. S. & DE-S-WIJESUNDERA, M. K. Intestinal coccidia (*Eimeria*) identified from goats and pigs in Sri Lanka. *Sri Lanka Vet. J.*, v.34, n.1-2, p.1-8, 1986.
- BALL, S. J. & PITTILO, R. M. Ultrastructural observations of microgametogenesis in *Eimeria bakuensis* (Syn. *E. ovina*) of sheep. *Parasitol. Res.*, v.74, n.5. 431-435, 1988.
- BALL, S. J.; HUTCHISON, W. M. & PITTILO, R. M. Ultrastructure of microgametogenesis of *Eimeria stiedai* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Acta Vet. Hung.*, v.36, n.3-4, p. 229-232, 1988.

- BALAZET, L. Les coccidies des petits ruminants de la Tunisie. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.25, p. 710-715, 1932a.
- BALAZET, L. Etude expérimentale d'*Eimeria nina-kohl-yakimovae*, W. L. Yakimoff et Rastegaieva, 1930. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.25, p.716-720, 1932b.
- BALAZET, L. Les coccidies du mouton et de la chèvre. Cycle évolutif de *E. nina-kohl-yakimovi* Yakimoff et Rastegaieva, 1930. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, v.21, n.1, p. 88-118, 1932c.
- BHATIA, B. B. & PANDE, B. P. Giant eimerian schizonts in mesenteric lymph nodes of a kid. *Ind. J. Microbiol.*, v.7, n.4, p. 161-164, 1967.
- CAVALCANTE, A. C. R. & LOPES, C. W. G. *Espécies do gênero Eimeria Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) parasitas de caprinos na microregião homogênea de Sobral - Ceará. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. IX. Campo Grande, M.S. Anais... Campo Grande. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 167, 1995.*
- CARDOSO, J. L. S.; OLIVEIRA, C. M. B. & OLIVEIRA, C. M. B. de. Fauna Parasitária de Caprino na grande Porto Alegre. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.2, n.1, p. 57-60, 1993.

- CHAPLIN, E. L.; BRANDÃO, F. C.; SILVA, N. R. S. & ARAUJO, F. A. P. Identificação de oocistos de *Eimeria* em cabras de Guaíba, RS. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.13, p.51-54, 1985.
- CHARTIER, C. Assessment of mean oocyst count in groups of kids: litter individual randomized and non-randomized faecal samplings. *Vet. Parasitol.*, v.40, n. 3-4, p. 187-195, 1991
- CHEVALIER, H. L. Über die Cocidienarten der ziegen in Deutschland. *Deut. Tierarztl. Wochenschr.*, v.73, p. 616-621, 1966.
- CHHABRA, R. C. & PANDEY, V. S. Coccidia of goats in Zimbabwe. *Vet. Parasitol.*, v.39, n.3-4, p. 199-205, 1991.
- CHOBOTAR, B. & SCHOLTYSECK, O. E. *Ultrastructure*. In: Long, P. L. (ed.) *The biology of the coccidia*. University Park Press, Baltimore, Maryland, p.101-165, 1982.
- COY, S. H. F.; EDGAR, S. A. & MORA, E. C. Ultrastructure of schizonts and merozoites of *Eimeria mitis* and *E. mivati* of the chicken. *Avian Diseases*, v.33, p.324-332, 1989.
- DEB. A. R.; ANSARI, M. Z.; SINHA, B. N. & SAHAI, B. N. Incidence and biology of eimerian species in goats at ranchi, Chotanagpur. *Ind. J. Anim. Hlth.*, v. 21, : p.33-38, 1982.





DEIANA, S. & DELITALA, G. La coccidiosi dei piccoli ruminanti. Nota II. Enterite iperplastica da *Eimeria arloingi* (Marotel, 1905) osservata nei caprini relievi anatomo ed istopatologici. *Riv. Parassitol.*, v.14, p. 201-212, 1953.

DUBEY, J. P. Coccidiosis in the gallbladder of a goat. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, v.53, n.2, p. 277-281, 1986.

DUBREMETZ, J. F. Etude ultrastructurale de la mitose schizogonique chez la coccidie *Eimeria necatrix* (Johnson, 1930). *J. Ultrastruc. Res.*, v. 42, p. 354-376, 1973.

DUBREMETZ, J. F. La genèse des mérozoïtes chez la Coccidie *Eimeria necatrix*. Etude ultrastructurale. *J. Protozool.*, v. 22, n. 1, p. 71-84, 1975.

DUBREMETZ, J. F. & ELSNER, Y. Y. Ultrastructural study of schizogony of *Eimeria bovis* in cell cultures. *J. Protozool.*, v. 26, n. 3, p. 367-376, 1979.

ELWASILA, M. Fine structure of the process of oocyst wall formation of *Eimeria maxima* (Apicomplexa: Eimeriina). *Acta Vet. Hung.*, v. 32, n. 3-4, p. 159-163, 1984.

ERMATOVA, D. U. Coccidia of sheep and goats in (Uzbekistan). *Veterinariya*, v. 3, p. 69-70, 1978.

FAYE-GRANDJEAN, I. Parasitoses gastro-intestinales du mouton et de la chèvre en Republica de Mauritània. *Schweizer Archiv. fur Tierheikunde*, v. 130, n. 1, p. 43, 1988.

FERNANDO, A. M. Fine structure of the schizonts and merozoites of *Eimeria acervulina* in the chicken. *J. Parasitol.*, v. 60, n. 1, p. 149-159, 1974.

FITZGERALD, P. R. The economic impact of coccidiosis in domestic animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v. 24, p. 121-143, 1980.

FUNDAÇÃO IBGE. *Anuário Estatístico do Brasil*, v. 52, p. 583, 1992.

GAJADHAR, A. A. & STOCKDALE, P. H. G. Ultrastructural studies of microgametogenesis and macrogametogenesis of *Eimeria truncata* of the lesser snow goose. *J. Protozool.*, v. 33, n.3, p. 345-351, 1986.

GILL, B. S. & KATIVAR, R. D An acute outbreak of coccidiosis (*Eimeria arloingi* Marotel, 1905) in kids of orai sheep breeding farm. *Ind. J. Vet. Sci.*, v. 31, n. 3, p. 212-216, 1961.

GITHIGIA, S. M.; MUNYUA, W. K & KANYARI, P. W. Prevalence of *Eimeria* species in goats from parts of Central Kenya. *Bul. Anim. Hlth. Prod. Afr.*, v. 40, n. 4, p. 283-285, 1992.

- GREGORY, M. W. *Host Reactions to Coccidia in the sheep and rabbit and their relevance to intestinal disease*. Ph. D. Thesis, University of London, 1983.
- GREGORY, M. W.; CATCHPOLE, J.; PITTILO, R. M. & NORTON, C. C. Ovine coccidiosis: observations on "oocyst patches" and polyps in natural - acquired infections. *Int. J. Parasitol.*, v. 17, n. 6, p. 1113-1121, 1987.
- GUILLOU, S. L. & LE GILLOU, S. Observations on atypical, acute coccidiosis in young goats. *Bull. Group. Tech. Vet.*, v. 3, p. 53-55, 1987.
- GULER, S.; DUMANLI, N.; OZER, E.; ERDOGMUS, Z. & KOROGLU, E. Studies on the incidence of *Eimeria* species found in lambs and kids in the Elazig region of Turkey. *Doga-Turk Veterinerlik-Ve Hayvancilik Dergisi*, v. 14, n. 2, p. 295-300, 1990.
- HAYAT, C. S.; IQBAL, Z. & MALIK, A. A. Prevalence of coccidiosis in sheep and goats at Faisalabad (Pakistan). *Pak. Vet. J.*, v. 6, p. 198-9, 1986.
- ISKAKOV, M. M. Coccidiosis in goats. *Veterinariya Moskva*, v. 3, p. 44-45, 1990.
- JHA, D. & SUBRAMANIAN. G. Incidence of *Eimeria* species in goats of Uttar Pradesh. *Ind. Vet. J.*, v. 43, p. 588-591, 1966.
- KANYARI, P. W. N. *Eimeria apsheronica* in the goat: Endogenous development and host cellular response. *Int. J. Parasitol.*, v. 20, n. 5, p. 625-630, 1990.

- KANYARI, P. W. N. The relationship between coccidial and helminth infections in sheep and goats in Kenya. *Vet. Parasitol.*, v. 51, n. 1-2, p. 137-141, 1993.
- KELLEY, G. L. & HAMMOND, D. M. Fine structural aspects of nuclear division and merogony of *Eimeria ninakohlyakimovae* in cultured cells. *J. Parasitol.*, v. 59, n. 6, p. 1071-1079, 1973.
- KHAN, M. Z.; KAZAM, A. R. & SABRI, M. A. *Eimeria ninakohlyakimovae* in Pakistan (a case report). *Pak. J. Sci. Res.*, v. 25, p. 262-264, 1973.
- KORKIN, A. F.; BAKAEVA, A. D.; KARINA, R. A. & SEROVA, Z. G. (Coccidiosis among mohair goats in Orenburg region of the Soviet region). *Veterinariya*, v. 12, p. 42-43, 1979.
- KOUWENHOVEN, B. *Eimeria acervulina* infectie bij de kip een parasitologisch en biochemisch onderzoek. Ph. D. Thesis, Universiteit Utrecht, 1970.
- KRASSNER, S. M. Factors in host susceptibility and oocyst infectivity in *Eimeria acervulina* infections. *J. Protozool.*, v. 10, n. 3, p. 327-333, 1963.
- KSIHIRSSAGAR, H. S. Note on the prevalence, seasonal variation and species composition of *Eimeria* occurring in goats in Marathwada region. *Ind. J. Anim. Sci.*, v. 51, p. 572-5, 1981.

- LEE, D. L. & MILLARD, B. J. Fine structure the schizonts of *Eimeria praecox*. *Int. J. Parasitol.*, v. 1, p. 37-412, 1971a.
- LEE, D. L. & MILLARD, B. J. The structure and development of the macrogamete and oocyst of *Eimeria acervulina*. *Parasitology*, v. 62, p. 31-34, 1971b.
- LEVINE, N. D. *Protozoan parasites of domestic animals and man*. Mineapolis, Burgess Pub. Co., 1961. 406p.
- LEVINE, N. D. & IVENS, V. *The coccidian parasites (Protozoa, Sporozoa) of ruminants*. Illinois Biological Monographs 44, Univ. Illinois Press, 1970. 278p.
- LIMA, J. D. *The coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of the domestic goat, Capra hircus*. Ph. D. Thesis. Univ. Illinois, Urbana, XIII + 108 p., 1979.
- LIMA, J. D. *Eimeriose dos ruminantes*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2. Fortaleza, CE, 1980. *Anais...* Brasília, Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 79-97, 1980.
- LIMA, J. D. Life cycle of *Eimeria christenseni* Levine, Ivens & Fritz, 1962 from the domestic goat, *Capra hircus* L. *J. Protozool.*, v. 28, n. 1, p. 59-64, 1981.
- LIMA, J. D. *Eimeriideos de caprino*. Seminário Professor titular Dep. de Parasitologia - ICB/UFMG, Belo Horizonte, 1991a. Não numerado.

LIMA, J. D. Eimeriose Caprina. *Cad. Tec. Esc. Vet. UFMG*, Belo Horizonte, v. 6, p. 20-28, 1991b.

LIMA, J. D.; MACHADO, T. M. M. & SANTOS, N. M. *Identificação de Eimeria spp em fezes de caprinos de Minas Gerais. Anais... In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 8. Anais... Sociedade Brasileira de Parasitologia*, p. 196, 1983.

LLOYD, S. & SOULSBY, E. J. L. Survey of parasites in dairy goats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 39, p. 1057-1059, 1978.

LOTZE, J. C. & LEEK, R. G. Failure of development of sexual phase of *Eimeria intricata* in heavily inoculated sheep. *J. Protozool.*, v. 17, n. 3, p. 414-417, 1970.

MACHADO, T. M. M.; LIMA, J. D. & SANTOS, N. M. *Frequência de Eimeria spp em fezes de caprinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 5. Belo Horizonte, 1987. Anais... Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, p. 46, 1987.

MAGI, M.; CAMPO, M & MALLOGGI, M.; SBRANA, L.; CASAROSA, L. *Eimeria species of goats in Italy. Ann. del. Fac. Med. Vet. Pisa.*, v. 39, p. 185-188, 1986.

- MEHLHORN, H. Elektronenmikroskopische untersuchungen an entwicklungsstadien von *Eimeria maxima* (Sporozoa Coccidia). I. Die feinstruktur der makrogameten. *Z. Parasitenk.*, v. 39, p. 161-182, 1972.
- MERDIVENCI, A. (Coccidiosis in sheep and goats in Turkey). *Turk. Vet. Hekim. Dern. Derg.*, v. 29, p. 260-281, 1959.
- MICHAEL, E. Fine structure and development of schizonts, merozoites and macrogamants of *Eimeria acervulina* in the goblet cells of the duodenal epithelium of experimentally infected birds. *Parasitology*, v. 70, n. 2, p. 223-229, 1975.
- MISRA, S.C. & MOHAPATRA, G. S. Coccidian infection in goats and the chemotherapeutic effect of Burmidin and Sulmet. *Orissa Vet. J.*, v. 7, p. 9-14, 1972.
- MUSSAEV, M. A. & MAMEDOVA, M. A. Material for the taxonomy of the coccidia of the domestic goat (*Capra hircus*) and their structure in Azebaijan. *Izv. Aka. Nauk Azerb SSR, Ser. Biol. Nauk.*, v. 4, p. 68-76, 1981.
- NORTON, C. C. Coccidia of the domestic goat *Capra hircus* with notes on *Eimeria ovinoidalis* and *E. bakuensis* (Syn *E. ovina*) from the sheep *ovis aries*. *Parasitology*, v. 92, n. 2, p.272-89, 1986.

- O'CALLAGHAN, M. G. Coccidia of Domestic and Feral goats in South Australia. *Vet. Parasitol.*, v. 30, n. 4, p. 267-272, 1989.
- OPOKU-PARE, G. A. & CHINEME, C. N. Pathology of acute intestinal coccidiosis in young goats. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.*, v. 27, p. 269-73, 1979.
- OSMAN, H. S.; RESTANI, R. & CANESTRI-TROTTI, G. Recherche preliminari sui coccidi di ovini e caprini della Somalia. *Parassitologia*, v.14, p.167-173, 1972.
- PANDE, B. P.; SINGH, P. P. & KALA, P. On a small sized eimerian schizont in the colon of a kid. *Ind. J. Microbiol.*, v. 4, n. 3. p. 92-95, 1964.
- PIRES, P. P. & LOPES, C. W. G. Espécies de *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) em caprinos anglo-nubianos no estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rural, RJ*, v.8, p. 71-79, 1985.
- PITTILO, R. M. & BALL, S. J. The fine structure of the developing macrogamete of *Eimeria maxima*. *Parasitology*, v. 79, p. 259-265, 1979.
- PITTILO, R. M. & BALL, S. J. Electron microscopy of *Eimeria acervulina* macrogametogony and oocyst wall formation. *Parasitology*, v. 89, p. 1-7, 1984.



- PITTILO, R. M.; BALL, S. J.; CATCHPOLE, J. & NEAL, C. R. Electron microscopy of *Eimeria bakuensis* (Syn. *E. ovina*). Macrogametogony and oocyst wall formation. *Acta Vet. Hung.*, v. 36, n. 3-4, p. 233-237, 1988.
- QADIR, A. N. M. A case report on the fatal *Eimeria ninakohlyakimovae* (Yakimoff and Rastegaieff, 1930) infection in a naturally infected goat *Capra hircus*. *Bangladesh Vet. J.*, v. 14, p. 31-33, 1980.
- RALKOVIC-JANJE, R. & JOVANOVIC-BUNTA, V. Kokcidioza jaradi. *Veterinarska-Stanica*, v. 21, n. 2, p. 137-141, 1990.
- REBOUÇAS, M. M.; AMARAL, V.; TUCCI, E. C.; SPOSITO-FILHA, E.; ALBERTI, H.; MURAKAMI, T. O. & AMARAL, V. do. Identificação de espécies do gênero *Eimeria schneider*, 1875 como parasitas de caprinos no Estado de São Paulo, Brasil (Apicomplexa: Eimeriidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.1, n. 1, p. 61-64, 1992.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, v. 17, p. 208, 1963.
- SAMPSON, J. R. & HAMMOND, D. M. Fine structural aspects of development of *Eimeria alabamensis* schizonts in cell cultures. *J. Parasitol.*, v. 58, n. 2, p. 311-322, 1972.

- SANTANA, A. F. & PEREIRA, I. H. O. Espécies de *Eimeria* parasitas de caprinos no sertão de Pernambuco. *Cad. Omega Univ. Fed. Rural PE Sér. Vet.*, v.1, p.15-23, 1984.
- SAYIN, F. *Eimeria nina-kohl-yakimovi* Yakimoff and Rastegaieff, 1930 in angora goat. *Ankara Univer. Fak. Derg.*, v.11, p.136-141, 1964.
- SAYIN, F. *Eimeria arloingi* (Marotel, 1905) Martin 1909 in angora goats. *Ankara Univer. Fak. Derg.*, v. 12, p. 208-218, 1965.
- SAYIN, F. Tiftik keçilerinde bulunan *Eimeria türleri*; *Eimeria parva* kotlan, mocsy ve vajda, 1929'nin biyolojisi üzerinde deneysel araştırmalar. *Ankara Univ. Vet. Fakult. Yayinlari*, v. 199, 56 p, 1966.
- SAYIN, F.; DINCER, S.; MILLI, V. Life cycle of *Eimeria arloingi* (Marotel, 1905) Martin, 1909 in angora goats. *Ankara Univer. Fak. Derg.*, v. 25, n. 4, p. 656-673, 1978.
- SAYIN, F.L; DINCER, S. & MILLI, V. Pathogenicity of *Eimeria arloingi* (Marotel, 1905) Martin, 1909 in angora goats. *Ankara Univer. Fak. Derg.*, v. 26, n. 1-2, p. 185-202, 1979.
- SAYIN, F.; DINCER, S. & MILLI, V. Life cycle and pathogenicity of *Eimeria arloingi* (Marotel, 1905) Martin, 1909, in angora kids and an attempt of its transmission to lambs. *Zbl. Vet. Med. B.*, v. 27, p. 382-397, 1980.

SAYIN, F. KAHYAOGU, T. & CAKMAK, A. *Eimeria* species found in sheep and goats from the Aegean sea coast of Turkey. *Ankara Univer. Fak. Derg.*, v. 33, n. 1, p. 90-96, 1986.

SCHOLTYSECK, O. E. Electron microscope studies on *Eimeria perforans* (Sporozoa). *J. Protozool.*, v. 90, n. 4, p. 407-414, 1962.

SCHOLTYSECK, O. E. *Ultrastructure*. In: HAMMOND, D. M.; LONG, P. L (eds.). *The coccidia*. University Park Press, Baltimore, 1973.

SCHOLTYSECK, E.; HAMMOND, D. M. & ERNST, J. V. Fine structure of the macrogametes of *Eimeria perforans*, *E. stidae*, *E. bovis* and *E. auburnensis*. *J. Parasitol.*, v. 52, n. 5, p. 975-987, 1966.

SCHOLTYSECK, E.; MEHLHORN, H. & HAMMOND, D. M. Electron microscope studies of macrogametogenesis and oocysts of coccidia and related groups. *Z. Parasitenk.*, v. 37, p. 1-43, 1971.

SCHOLTYSECK, O. E.; MEHLHORN, H. & HAMMOND, D. M. Electron microscope studies of microgametogenesis in coccidia and related groups. *Z. Parasitenk.*, v. 38, p. 95-131, 1972.

- SHAH, H. L. & JOSHI, S. C. Coccidia (protozoa: Eimeriida) of goats in Madhya Pradesh, with descriptions of the sporulated oocysts of eight species. *J. Vet. Anim. Husb. Res.*, v. 7, p. 9-20, 1963.
- SHARMA, D. V. P. Histopatological studies in natural infection of goat coccidiosis. *Ind. Vet. J.*, v. 43, p. 122-127, 1966.
- SHEFFIELD, H. G. & HAMMOND, D. M. Fine structure of first-generation merozoites of *Eimeria bovis*. *J. Parasitol.*, v. 52, n. 3, p. 595-606, 1966.
- SHEFFIELD, H. G. & HAMMOND, D.M. Electron microscope observations on the development of first-generation merozoites of *Eimeria bovis*. *J. Parasitol.*, v. 53, n. 4, p. 831-840, 1967.
- SIVADAS, C. G.; RAJAN, A. & NAIR, M. K. Studies on pathology of coccidiosis in goats. *Indian Vet. J.*, v. 42, p. 474-79, 1965.
- SONG, X. L; LIN, Y. Y.; TU, Y. & ZUO, Y. X. A. Survey of coccidia spp in goats and sheep in Yunnan Province. *Chinese J. Vet. Sci. Tec.*, v. 21, n. 4, p. 15-19, 1991.
- SPEER, C. A. Ultrastructure of two types of first-generation merozoites of *Eimeria bovis*. *J. Protozool.*, v. 35, n. 3, p. 379-381, 1988.

- SVANBAEV, S. K. K. Voprosu o faune i morfologii koktsidii ovets i koz zapadnogo kazakhstana. *Trudy Inst. Zool. Akad. Sci. kazakh. SSR.*, v. 7, p. 252-257, 1957.
- THAKUR, R. P.; CHAND-THAKURI, K. & RAI, K. Identification of *Eimeria* species in sheep and goats of the eastern hills of Nepal. *Vet. Rev. Katamandu*, v. 8, n. 1, p. 29-31, 1993.
- TRUMP, B. F.; SMUCKLER, E. A. & BENDITT, E. P. A method for staining epoxy sections for light microscopy. *J. Ultrastruc. Res.*, v. 5, p. 343, 1961.
- TSAGLIS, A. Coccidia of sheep and goats in Greece. *Nuova Vet.*, v. 46, p. 117-129, 1970.
- VASSILIADÈS, G. La coccidiose intestinale dans ruminants domestiques au Sénégal. Epidémiologie, répartition géographique, importance économique. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, v. 22, p. 47-53, 1969
- VERCRUYSSSE, J. The coccidia of sheep and goats in Senegal. *Vet. Parasitol.*, v. 10, p. 297-306, 1982.
- VIEIRA, L. S.; SILVA, M. B. O.; TOLENTINO, A. C. V.; LIMA, J. D. & SILVA, A. C. *Surto de criptosporidiose em caprinos lactentes*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9. Campo Grande,

MS. *Anais...* Campo Grande. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 210, 1995.

VIHAN, V. S.; SINGH, N. & SINGH, S. V. *Effect of environmental changes on the prevalence of clinical coccidiosis in kids under semi-arid conditions. In: INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL HYGIENE, 6. Proceedings...* v. 1, p. 161-166, 1988.

VUJIC, B. & ILIC, G. Study of the most important diseases of goats: Coccidiosis. *Veterinarski Glasnik.*, v. 39, n. 7, p. 799-810, 1985.

WANG, M. & SU, C. L. A survey of species of coccidia in goats in Beijing area, China. *Chinese J. Vet. Med.*, v. 15, n. 10, p. 4-6, 1989.

WARUIRU, R. M.; GITHIGIA, S. M. & NGINYI, J. M. The prevalence of coccidia of goats in Ol'Magogo farm in Kenya. *Bul. Anim. Hlth. Prod. Afr.*, v. 39, n. 2, p. 242-249, 1991.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metal. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v. 4, p. 475-478, 1958.

WHEAT, B. E.; JENSEN, J. B.; ERNST, J. V. & CHOBOTAR, B. Ultrastructure of *Eimeria mivati*. *Z. Parasitenk.*, v. 50, p. 125-136, 1976.

- WHITLOCK, H. V. Some modification of the Mc-Master egg counting technique apparatus. *J. Coun. Sci. Ind. Res.*, v. 21, p. 177-180, 1948.
- WIESENHUTTER, E. Das vorkommen von kokzidien und piroplasmen bei schafen und ziegen in syrien. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.*, v. 78, p. 247-249, 1965.
- WOJI, A. Y.; LITTLE, D. A. & IKWUEGB, O. A. Prevalence of coccidial infections in the West African dwarf goat in the subhumid zone of Nigeria. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v. 26, n. 1, p. 1-6, 1994.
- YABIN, D.; MENCHU, L.; SHENXING, Z. & AOQI, F. Hepatic coccidiosis in the goat. *Int. J. Parasitol.*, v. 21, n. 3, 381-382, 1991.
- YAKIMOFF, W. L. & RASTEGAIEFF, E. F. Zur frage uber Coccidien der Ziegen. *Arch. Protistenk.*, v. 70, p. 185-91, 1930.
- YVORE, P.; ESNAULT, T. A. & NACIRI, M. La coccidiose caprine: effect de contaminations mono ou multiespecificques. *Rec. Med. Vet.*, v. 161, n. 4, p. 347-351, 1985.



## **10. APÊNDICES**



## 10. APÊNDICE I

Belo Horizonte, 12 de março de 1996

Ilmo(a) Sr(a) Secretário(a) de  
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz  
Av Brasil 4365,  
21045-900, Rio de Janeiro.

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos encaminhar o original mais três cópias do trabalho *Development of Eimeria ninakohlyakimovae* ... de autoria de Luiz S. Vieira e outros, para ser submetido a apreciação do Corpo Editorial dessa revista.

Atenciosamente,

Luiz da Silva Vieira

Endereço para correspondência:  
EMBRAPA - CNP Caprinos  
Fazenda Experimental Três Lagoas  
Estrada Sobral-Groaíras, KM 4,  
Caixa Postal D-10  
62100-000, Sobral, CE.

Development of **Eimeria ninakohlyakimovae** Yakimoff & Rastegaieff,  
1930 emend. Levine, 1961 in experimentally infected goats.

LUIZ S. VIEIRA<sup>a</sup>, JOSÉ D. LIMA<sup>b</sup>, JANETE S. ROSA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Goats Research Center - The Brazilian Agricultural Research Agency  
(EMBRAPA) P.O.Box D-10 Zip code 62100, Sobral, CE, Brazil. <sup>b</sup> Parasitology  
Department - ICB/UFMG P.O.Box 486. Zip code 31270901,  
Belo Horizonte, MG, Brazil

#### SUMMARY

The endogenous development, prepatent and patent periods of **Eimeria ninakohlyakimovae** were studied in 43 one-to-three week old coccidia-free kids, inoculated with  $5.0 \times 10^4$ ;  $1.5 \times 10^5$ ;  $2.0 \times 10^5$  or  $9.0 \times 10^5$  sporulated oocysts/kg. Twenty five kids were killed, at 24 or 48 hour-intervals, 2 to 18 days after the inoculation (DAI). Two generations of meronts, gamonts, gametes and oocysts were found in sections stained with HE examined under light microscopy. The first generation of meronts developed in the endothelium of the lacteals, in the lamina propria and in the lymphatic vessels of the ileum submucosa. Mature meronts,

165.5 x 123.6  $\mu\text{m}$ , were first found 10 DAI. The second generation merogony developed in the crypt epithelial cells of the caecum and colon; mature meronts, 16.8 x 11.6  $\mu\text{m}$ , were first seen 12 DAI. The gametogenesis occurred in caecum and colon epithelium; mature microgamonts (16.1 x 13.0  $\mu\text{m}$ ), microgametes, macrogametes (14.7 x 12.5  $\mu\text{m}$ ) and young oocysts (18.3 x 13.3  $\mu\text{m}$ ) were seen at 13 DAI. The course of the infection was determined in 18 kids examined every day until the 24 DAI. The prepatent period was 14.7 (13-17) days and the patent period 6.8 (4-10) days. The sporulation at 30° C with constant aeration was 2-3 days.

Key words: Goats, ***Eimeria ninakohlyakimovae***, coccidia, ***Eimeria***, life cycle.

## INTRODUCTION

***Eimeria ninakohlyakimovae*** Yakimoff & Rastegaieff, 1930 emend Levine, 1961, is widespread in goats, being found with high prevalence in all the countries studied (Osman et al, 1972; Lima, 1980; Magi et al, 1986; Song et al 1991). It has been frequently associated with goat coccidiosis and it has been regarded as pathogenic for animals of all ages (Aumont et al, 1984; Yvone et al, 1985; Kanyari, 1990).

There are few studies about ***E. ninakohlyakimovae*** biology, and they are not complete and, sometimes controversial because doubtful identification of the

parasite seen during natural or, rarely, experimental infections (Balozet, 1932b; Sayin, 1964; Levine & Ivens, 1970; Qadir, 1980; Norton, 1986). This work describes the endogenous development and the infection course of **E. ninakohlyakimovae** studied in experimentally infected goats.

## MATERIALS AND METHODS

Forty-three crossbred goats were raised free of coccidia in individual cages kept in closed rooms of restricted access. Kids were removed from their mother immediately after birth and were fed artificial colostrum for two days, and thereafter cow's milk. Cages and rooms were cleaned daily and disinfected with 2.5% sodium hypochlorite solution.

The oocysts of **E. ninakohlyakimovae** were obtained through inoculation of coccidia-free kids with oocysts collected from naturally infected goats. The pure culture was selected, after serial inoculations in coccidia-free kids, using morphological and biological characteristics to separate the **E. ninakohlyakimovae** from other species. Oocysts collected were sporulated in 2.5% potassium bicromate solution and stored at 4° C until its use. The sporulation period was determined at 30°C with constant aeration provided by an aquarium pump.

Eighteen coccidia-free kids inoculated with different doses, one with  $5.0 \times 10^4$  ; seven with  $1.5 \times 10^5$ ; eight with  $2.0 \times 10^5$  and two with  $9.0 \times 10^5$  sporulated

oocysts/kg were kept for 24 days after the inoculation (DAI), to determine the infection course.

The endogenous development was studied in 25 coccidia-free kids, inoculated with different numbers of sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae*: five with  $5.0 \times 10^4$ ; 10 with  $1.5 \times 10^5$ ; four with  $2.0 \times 10^5$  and six with  $9.0 \times 10^5$  oocysts/kg. The kids were killed 2 DAI and thereafter at 24 or 48 hour-intervals until 18 DAI. Animals were examined grossly, and then tissues were examined microscopically for endogenous development and lesions of coccidiosis. Tissue samples were taken from the liver, gall bladder, heart, lungs, pancreas, kidneys, mesenteric lymph nodes, small intestine (one sample every 20 cm), caecum, colon and rectum.

The tissues were fixed in 10% buffered formalin solution (pH 7.2), sections were stained with hematoxylin and eosin and examined using light microscopy.

## RESULTS

Two generations of meronts, gamonts, gametes and oocysts formation were found in 21 animals of the 25 necropsied. First generation meronts were found 7 DAI in endothelial cells of the lacteals of the intestine villi, in the lamina propria and with less frequency in the lymphatic vessel of the ileum submucosa. One meront, detected 7 DAI, measured  $58.2 \times 49.9 \mu\text{m}$  and contained well defined nuclei, with a residuum of  $4.5 \times 3.3 \mu\text{m}$  and were involved by a  $4.1 \mu\text{m}$  thick

capsule-like structure (Figure 1). Eight DAI, 12 meronts measured 64 (31.2-78.0) x 56.3 (22.9-72.8)  $\mu\text{m}$  and had a wall 3.4  $\mu\text{m}$  thick (Figure 2). Six nine day-old meronts measured 80.1 (72.9-116.8) x 71.5 (46.8-198.4)  $\mu\text{m}$ , contained several nuclei, which were most abundant in the center, randomly distributed or forming compartments in the interior of the meront and a 3.4  $\mu\text{m}$  thick wall (Figure 3). Thirty-three immature meronts 10 DAI measured 127.3 (55.1-208.5) x 95.7 (50-129.3)  $\mu\text{m}$  with most of the nuclei forming compartments in the interior of the meront and with walls (3.2 $\mu\text{m}$ ) that, sometimes were very thin and barely seen (Figure 4). Mature first generation meronts were first found 10 DAI; they measured 165.5 (125.1-300.2) x 123.6 (62.6-196.0)  $\mu\text{m}$  and contained large number of merozoites laid side by side within the mature meront (Figures 5, 6 and 7). Residual body was sometimes seen. The merozoites with 8.4 (7.8-9.4) x 2.7 (2.1-3.3)  $\mu\text{m}$  were found free in the ileum lumina, after the rupture of the mature meronts (Figure 8).

The second generation merogony took place in the crypt epithelial cells of caecum and colon. Trophozoites and immature meronts were seen 11 DAI (Figures 9 and 10) and the secondary mature meronts were first observed 12 DAI (Figures 11 and 12). Second generation meronts were usually located above the host cell nuclei; multiple infection of crypt cells were frequently seen. Forty-six secondary mature meronts measured 16.8 (10.3-24.6) x 11.6 (7.4-15.6)  $\mu\text{m}$  and contained 10 to 32 merozoites ( $\bar{x}$ =24). The merozoites were 6.9 (5.3-7.8) x 1.8 (1.6-2.1)  $\mu\text{m}$  and were laid side by side within the mature meront (Figures 11 and 12).

The gametogenesis occurred in the crypt epithelium of caecum and colon. Gamonts, microgametes, macrogametes and young oocysts, laid below the host cell nuclei were seen 13 DAI. Infected cells with more than one gamont were common.

Microgamonts had a large number of nuclei arranged at the periphery, measured 16.1 (10.3-18.5) x 13.0 (9.2-16.4)  $\mu\text{m}$  and contained several microgametes randomly arranged within its interior, sometimes with a residual body (Figure 13). Most of the microgamonts (77%) were seen in the caecum. Macrogamonts had a large central nuclei and a prominent nucleolus. The macrogametes contained a large number of eosinophilic plastic granules randomly arranged in the cytoplasm; they measured 14.7 (11.5-17.2) x 12.5 (9.0-15.6)  $\mu\text{m}$  with 86% of them located in the colon (Figure 14 and 15). The young oocysts were seen 13 DAI, and measured 18.3 (16.4-23.8) x 13.3 (9.4-18.4)  $\mu\text{m}$  (Figure 16).

The prepatent period in 18 kids were  $14.7 \pm 1.0$  (13-17) days and the patent  $6.8 \pm 1.6$  (4-10) days. The sporulation time was two to three days.

## DISCUSSION

The prepatent period found in this study is similar to that described by Norton (1986), for *E. ninakohlyakimovae*. The short prepatent period, observed by Balozet (1932b) is doubtful, because of the oocyst identification used in that trial. The patent period observed in this experiment represents the first report about this

parameter for **E. ninakohlyakimovae**; it is similar to those seen for **E. jolchijevi**; short than those of **E. alijevi**, **E. christenseni** and **E. hirci** and longer than that of **E. caprina** (Lima 1980).

The sporulation time found in this study is similar to those reported by Sayin (1964), Opo-Kupare & Chineme (1979) and Deb et al (1982) for **E. ninakohlyakimovae**. The longer period seen by Balozet (1932b), for **E. ninakohlyakimovae**, might be not only due to temperature or oxigenation used for sporulation, but also the incorrect identification of the parasite.

The endogenous cycle of the **E. ninakohlyakimovae** is not well known and some information about it should be considered with reserve. The results showed by Balozet (1932b), are very different from those seen in this study and they came from a single sacrificed animal on the 39 DAI. The location, the development periods and the morphologic characteristics of the endogenous forms are different from those found for **E. ninakohlyakimovae** in the present study, and probably they are of another species of **Eimeria**. Sayin's observations (1964), also are doubtful, because they were obtained from a single naturally infected animal and, according to him, the endogenous forms can belong to other species of **Eimeria** . The results of this study are similar to those found by Norton (1986), but, unfortunately, his information are restrict to the localization and lesions caused by the **E. ninakohlyakimovae** secondary meronts, gamonts and oocysts.



The initial phase of the endogenous development of the **E. ninakohlyakimovae** is similar to that of other species of **Eimeria** parasite of goats (Sayin et al 1978; Lima 1981; Kanyari, 1990) occurring in the endothelial cells of the small intestine, but it is restrict to the ileum, where the primary meronts are found. The other endogenous stages, are found in the large intestine. First generation meronts of most the species of **Eimeria** parasites of goats is confined to the small intestine. The presence in the large intestine, reported by this paper is similar to Kanyari's (1990) findings for **E. apsheronica**.

Like **E. ninakohlyakimovae**, **E. alijevi** (Sayin 1966) and **E. apsheronica** (Kanyari, 1990) have endogenous development in the same sites, but their secondary merogony, gametogenesis and oocysts formation occur in the small intestine. Furthermore, the size of the endogenous stages of the **E. ninakohlyakimovae** are different although the morphological characteristics are similar to those of mentioned species.

The results of this work and the others obtained by different authors (Sayin 1978; Lima 1981; Kanyari 1990), suggest that the endogenous development of the species of **Eimeria** parasites of goats have the same pattern with two generations of meronts, the first in the endothelial cells of the lacteals of the small intestine villi and the second in the epithelial cells of the small intestine and/or large intestine.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their recognition to Mrs. Ana Cristina Carvalho Botelho and Mr. José Maria Martins da Silva, for their support in the histologic preparations and to Mrs. Helena Araujo da Ponte and Mr. Felipe Cavalcante Machado for their help in the field work and laboratory analysis.

## REFERENCES

- Aumont, G.; Yvore, P.; Esnaut, A. 1984. Experimental coccidiosis in goats. Experimental model effects of parasitism on the feeding behaviour and the growth of animals and intestinal lesions. **Ann. Rech. Vet.**, **15 (4)** : 467-473.
- Balozet, L. 1932a. Etude experimental d'*Eimeria nina-kohl-yakimovi*, W. L. Yakimoff et Rastegaieva, 1930. **Bull. Soc. Path. Exot.**, **25** : 715-720.
- Balozet, L. 1932b. Les coccidiosis du mouton et de la chevre. Cycle evolutive de *E. nina-kohl-yakimovi*. Yakimoff et Rastegaieva, 1930. **Arch. Inst. Pasteur Tunis**, **21 (1)** : 88-118.

- Deb, A.R.; Ansar, M. Z.; Sinha, B. N. & Sahi, B. N. 1982. Incidence and biology of eimerian species in goats at ranchi chotanagpur. **Indian J. Anim. Health**, **21** (1) : 33-38.
- Kanyari, P. W. N. 1990. *Eimeria apsheronica* in the goat. Endogenous development and host cellular response. **Int. J. Parasitol.**, **20** (5) : 625-630.
- Levine, N. D. 1961. Protozoan parasites of domestic animals and of man, Burgess, Minneapolis. III + 412 p.
- Levine, N. D. & Ivens, V. 1970. The coccidian parasites (Protozoa, Sporozoa) of ruminants III. Biol. Monogr # 44. Univ. Illinois. Press, Urbana, 278 p.
- Lima, J. D. 1981. Life cycle of *Eimeria christenseni* Levine, Ivens & Fritz, 1962 from the domestic goat *Capra hircus* L. **J. Protozool.**, **28** (1) : 59-64.
- Lima, J. D. 1980. Prevalence of coccidia in domestic goats from Illinois, Indiana, Missouri and Wisconsin. **Int. Goat Sheep Res.** **1** (3) : 234-241, 1980.
- Magi, M.; Campo, M.; Malloggi, M.; Sbrana, L. & Casarosa, L. 1986. The coccidia of the domestic goat (*Capra hircus*) in Itali. **Ann. Fac. Med. Vet. Pisa**, **39** : 185-188.

- Norton, C. C. 1986. Coccidia of the domestic goat *Capra hircus* with notes on *Eimeria ovinoidalis* and *bakuensis* (Syn. *E. ovina*) from the sheep *Ovis aries*. **Parasitology**, **92**: 279-281.
- Opoku-pare, G. A. & Chineme, C. N. 1979. Pathology of acute intestinal coccidiosis in young goats. **Bull. Anim. Hlth. Prod. Afric.**, **27** : 269-273.
- Osman, H.S.; Restan, R. & Canestritroti, G. 1972. Richerche preliminari sui coccidi ovini e caprini della Somália. **Parassitologia**, **14** : 167-173.
- Qadir, A. N. M. A. 1980. A Case report on the fatal *Eimeria ninakohloyakimovae* (Yakimoff and Rastegaieff), infected goat. *Capra hircus*. **Bangladesh Vet. J.**, **14**: 31-33.
- Sayin, F. 1964. *Eimeria nina-kohl-yakimovi* Yakimoff and Rastegaieff, 1930 in Angora goat. **Ankara Univer. Fak. Derg.**, **11** : 136-141.
- Sayin, F.; Dincer, S. & Milli, V. 1978. Cycle of *Eimeria arlongi* (Marotel, 1905) Martin, 1909 in Angora goats. **Vet. Fak. Derg. Ankara Univers.**, **25** (4) : 656-673.
- Song, X. L.; Linn, Y. Y.; Tu, Y. & Svo, Y. X. A. 1991. A survey of coccidia spp in goats sheep in Yunnan Province. **Chin. J. Vet. Sci. Tec.**, **21** (4) : 15-19.

Yarkimov, W. L. & Rastegaieff. 1930. Zur Frage über coccidien der Zeigen. **Arch. Protistenk.**, **70** : 185-191.

Yvone, P. ; Esnault, T. A.; Naciri, M. 1985. La coccidiose caprine : effect de contaminations mono ou multiespecifiques. **Res. Med. Vet.**, **161 (4)** : 347-51.

### Figure Captions

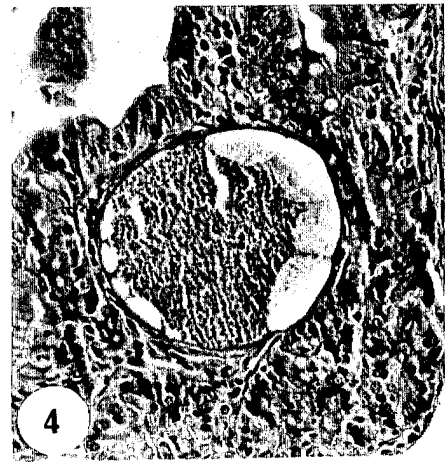
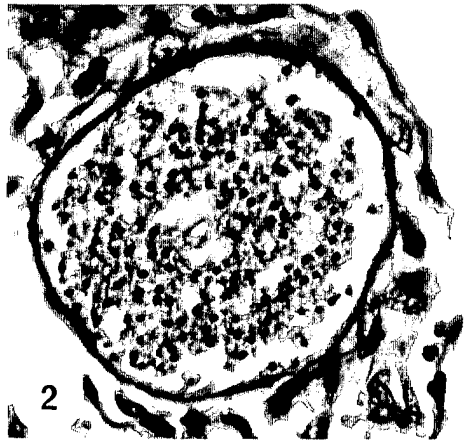
#### Development of *Eimeria ninakohlyakimovae*

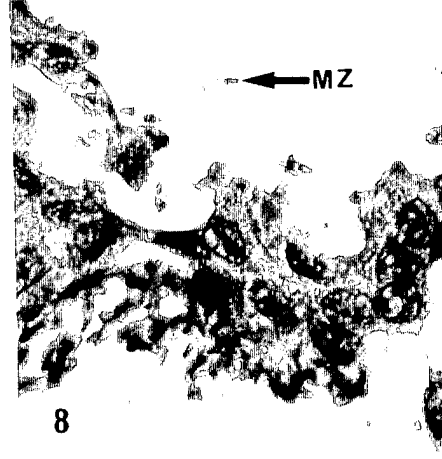
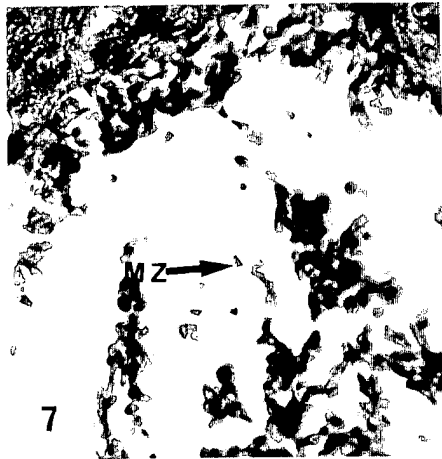
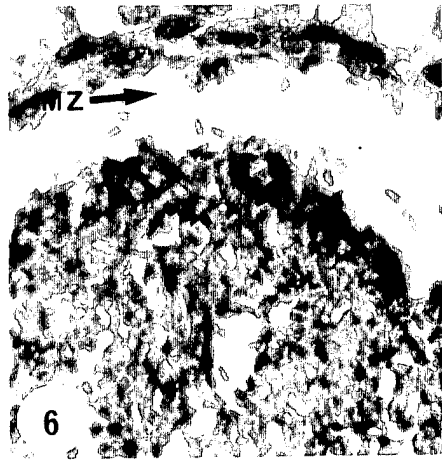
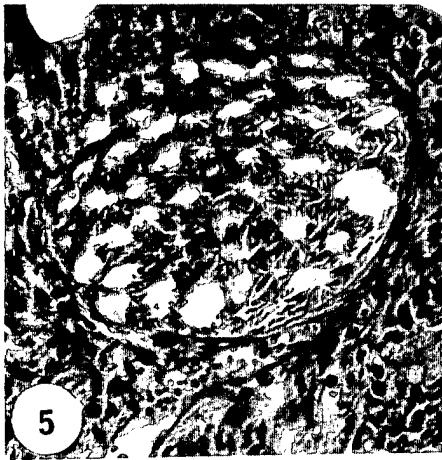
Fig. 1-4. First generation merogony of *E. ninakohlyakimovae* in the ileum of experimentally infected kids, H&E. 1. Immature meront, 7 DAI (x430). 2. Immature meront 8 DAI (x650). 3. Immature meront 9 DAI (x260). 4. Immature meront 10 DAI (x260).

Fig. 5-8. Primary mature meronts and first generation merozoites of *E. ninakohlyakimovae* in the ileum of experimentally infected kids, H&E. 5. Mature meront, 10 DAI (x350). 6. Mature meront with merozoites -MZ (x825). 7. Merozoites free in the meront (x850). 8. Merozoites free in the ileum lumina (x850).

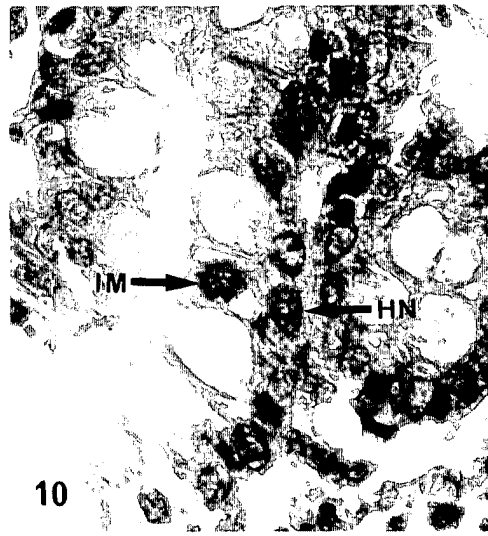
Fig. 9-12. Second generation merogony of *E. ninakohlyakimovae* in the crypt epithelial cells of large intestine of experimentally infected kids, H&E (x825). 9. Trophozoites (A) and immature meront (B); host cells nucleus (HN). 10. Immature meront (IM) and HN, 12 DAI. 11. Mature meront (MM) with merozoites (MZ), 12 DAI. 12. Mature meront with MZ, and HN.

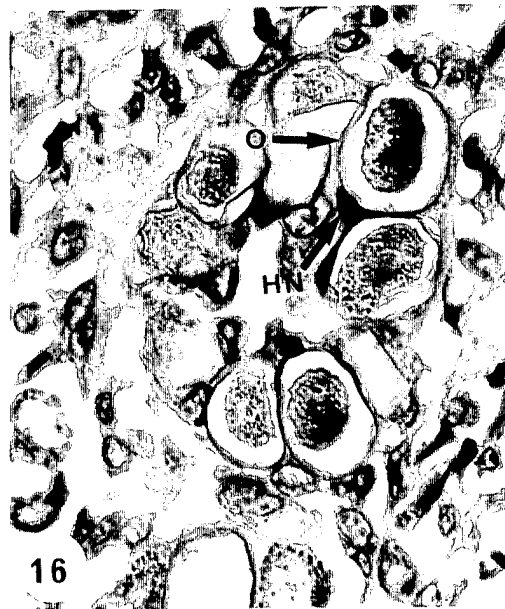
Fig 13-16. Gametogenesis and oocyst formation of *E. ninakohlyakimovae* in the crypt epithelial cells of large intestine of experimentally infected kids, H&E (x825), 13 DAI. 13. Microgamont (A) and microgametes (B); host cell nucleus (HN). 14. Macrogamont (MC). 15. Macrogamete (MA). 16. Immature oocysts (O); HN.











## 11. APÊNDICE II

March 27, 1996

Rédacteur en chef:  
Revue de Médecine Vétérinaire  
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
23, Chemin des Capelles  
31076, Toulouse Cedex - France

Dear Sir,

I am sending the manuscript **Coccidiosis in goats experimentally infected with *Eimeria ninakohlyakimovae* Yakimoff & Rastegaieff, 1930 emend. Levine, 1961** for your appreciation.

Sincerely yours,

Luiz da Silva Vieira

Corresponding adress:

Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos – EMBRAPA.  
Caixa Postal D – 10. CEP 62100-000, Sobral, CE, Brazil  
Tel. (085) 612–1032; Fax. (085) 612–1132

**Coccidiosis in goats experimentally infected with *Eimeria*  
*ninakohlyakimovae* Yakimoff & Rastegaieff, 1930 emend. Levine,  
1961.**

L. S. Vieira<sup>a</sup>, J. D. Lima<sup>b</sup>, M. B. O. Silva<sup>b</sup>, A. C. V. Tolentino<sup>b</sup> & A. C. C.  
Botelho<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos – EMBRAPA.

Caixa Postal D – 10. CEP 62100-000, Sobral, CE, Brazil

Tel. (085) 612–1032; Fax. (085) 612–1132

<sup>b</sup> Departamento de Parasitologia – ICB/ UFMG

Caixa Postal 486. CEP 31270–901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

## SUMMARY

Forty-three from one to three week old goats, experimentally infected with *E. ninakohlyakimovae* were observed from the first to the 24<sup>th</sup> day after the infection (DAI). Animals inoculated with  $2.0 \times 10^5$  oocysts/kg of body weight presented diarrheal feces with fetid odor, dark brown coloration and presence of blood and pieces of intestinal mucosa, loss of appetite, dehydration, matted fur and general organic debility. The macroscopic lesions observed, consisted of a thickening of the caecum and colon mucosa, edema, hemorrhage and hyperemia. Histologically a scaling of the crypts epithelium, with a severe hemorrhagic enteritis, edema and necrosis.

**KEY WORDS:** goats, diarrhea, coccidiosis, *Eimeria ninakohlyakimovae*, coccidia, clinical symptomatology.

## RÉSUMÉ

L'infection expérimentale par *Eimeria ninakohlyakimovae* a été suivie pendant 24 jours en chevreaux âgés d'une à trois semaines. On a observé chez les animaux inoculés, avec  $2,0 \times 10^5$  ookystes/kg, des selles diarrhéiques, anorexie, déshydratation suivi de débilité générale à partir du 13<sup>ème</sup> jour. L'épaississement de la muqueuse du caecum, còlon avec de l'œdème, hémorrhagie et hyperémie ont été vérifiés au diagnostic post mortem à partir du 15<sup>ème</sup> jour de l'infection. Une sévère enterite hémorragique, de l'œdème, nécrose, suivi de l'écaillement de l'épithélium des criptes à été remarqué avec l'aide histologique.

**MOTS-CLÉS:** Chevreaux, coccidiose, *Eimeria ninakohlyakimovae*, coccidies, symptomatologie clinique.

## Introduction

*Eimeria ninakohlyakimovae* has been frequently associated with coccidiosis in goats [6] and undertakes young [14] and adult animals [1]. The clinical symptomatology is very little known, mainly in experimentally infected animals. Most of the studies were based on necropsy findings of goats naturally infected with several species of *Eimeria*. BALOZET [2] described a case of bloody mucus diarrhea, followed by death of an adult animal naturally infected with *E. ninakohlyakimovae*, and reproduced the disease in two newborn goats. SAYIN [13], related a case of enteritis in a goat naturally infected associated with *E. ninakohlyakimovae*. Similar situations were observed in mixed, natural and experimental infections, involving *E. ninakohlyakimovae* [3,15]. NORTON [12] observed alterations in the cecum and in the colon of an animal experimentally infected with 5,000 sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae*.

This paper describes the clinical symptomatology and the alterations caused by *E. ninakohlyakimovae* in experimentally infected young goats.

## Material and methods

Forty-three crossbreed goats of both sexes, from one to three weeks old were used. Twenty-five were infected per os with  $5.0 \times 10^4$ ;  $1.5 \times 10^5$  or  $9.0 \times 10^5$  sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* /kg of body weight. The animals were killed at one or two day intervals, from the second to the 18<sup>th</sup> day of

infection (DAI). Fragments of the small and large intestines were collected, fixed in a 10% buffered formaldehyde solution (pH 7.2), processed, included in paraffin, cut in a five to seven  $\mu\text{m}$  thickness, stained with hematoxylin–eosine and examined in an optic microscope.

The clinical signs caused by *E. ninakohlyakimovae* were observed in 18 goats infected like this: 1 with  $5.0 \times 10^4$ , 7 with  $1.5 \times 10^5$ ; 8 with  $2.0 \times 10^5$  and 2 with  $9.0 \times 10^5$  oocysts/kg and followed closely in a period of 24 days. These animals were observed daily through parasitological fecal exams and clinical evaluation.

Six non infected goats remained with the group inoculated with  $1.5 \times 10^5$  oocysts/kg. Both groups (infected and control) were weighed weekly in a period of three weeks when the experiment ended.

## Results

### Death caused by *E. ninakohlyakimovae*

A death caused by *E. ninakohlyakimovae* occurred in a goat infected with  $2.0 \times 10^5$  oocysts/kg on the 16<sup>th</sup> DAI. The animal presented a dark coloration diarrhea on the 13<sup>th</sup> DAI, simultaneously with the appearance of *E. ninakohlyakimovae* oocysts in its feces. The oocysts elimination peak was observed from the 15<sup>th</sup> to the 16<sup>th</sup> DAI, with 24,700 oocysts per gram of



feces (OPG), coinciding with the animal's death. In this period, the goat eliminated 200ml of totally liquid and bloody feces, with a red coloration and pieces of intestinal mucosa. Before dying, the animal presented apathy, total loss of appetite and intense dehydration.

### Clinical Symptomatology

The other infected goats with the four different doses of oocysts, presented clinical signs of eimeriosis, but none of them died. The most severe symptoms were observed in the animals infected with  $2.0 \times 10^5$  sporulated oocysts/kg and consisted of diarrheal feces, with fetid odor, a dark brown coloration and presence of nonmetabolized blood and pieces of intestinal mucosa, loss of appetite, lightly dehydrated, matted and dull fur and general organic debility. The diarrhea lasted for approximately a week, and the loss of appetite lasted from two to three days.

In the goats infected with  $5.0 \times 10^4$ ,  $1.5 \times 10^5$  and  $9.0 \times 10^5$  oocysts/kg the clinical signs of eimeriosis were moderate and consisted in only a moderate yellow-brownish diarrhea with a fetid odor. The presence of mucus and blood in the feces was observed only in the group inoculated with  $1.5 \times 10^5$  oocysts/kg. In these animals the average weight gain, followed closely in a period of 24 days, was 1.8kg and in the control group, in the same



period, with the animals maintained under the same conditions, it was 2.1kg.

In most of the inoculated animals, the onset of the clinical symptomatology coincided with the appearance of oocysts in the feces, or in rare cases, it started one or two days later. The maximum number of OPG eliminated by the infected animals occurred from the second to the third day of patency. This peak occurred on the fourth day of patency in only two animals. The animals inoculated with  $9.0 \times 10^5$  oocysts /kg eliminated less oocysts in a shorter period and were the ones which presented symptoms of eimeriosis less severe than those infected with smaller doses.

#### Necropsy Findings

No macroscopic alteration was observed in the goats necropsied on the 13<sup>th</sup> DAI. Thickening, edema, hemorrhage and hyperemia of the cecum and colon mucosa were found in the animals killed from the 15<sup>th</sup> DAI. The mesenteric lymph nodes, mainly the ileocaecal, were increased in volume. No alterations were observed in the small intestine.

#### Histological Alterations

As it happened in the macroscopy, no histological alteration was observed in the goats sacrificed up to the 13<sup>th</sup> DAI. The goats necropsied

from the 15<sup>th</sup> DAI presented scaling of the crypt's epithelium of the cecum and colon. The cells where the endogenous stages of *E. ninakohlyakimovae* developed, were destroyed and eliminated. The most intense lesions occurred in the goat necropsied on the 15<sup>th</sup> DAI and in the one which died on the 16<sup>th</sup> DAI. In these ones the lesions consisted in an almost total destruction of the crypts, with hemorrhage, hyperemia, edema and necrosis. These were caused mainly by sexual stages and f oocysts of *E. ninakohlyakimovae*. In other regions the epithelium scaling was so intense that the crypts' structure was compromised. Agglomerates of parasite, mainly microgametes and macrogametes, located in the crypts were observed in these areas. No alteration occurred in the small intestine.

The inflammatory infiltrated consisted of rare plasmocytes, lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear leucocytes, located in the submucosa and with less intensity in the crypts' epithelium.

### **Discussion**

The clinical signs of coccidiosis in goats experimentally infected with *Eimeria ninakohlyakimovae* observed in the present study were similar to those described by NORTON [12] for this species and to those observed in cases of natural infection caused by other *Eimeria* species [3, 4, 10]. However, most of the authors do not mention the *Eimeria* species present

and they were probably mixed infections caused by several species of *Eimeria* .

The macroscopic and histologic alterations caused by *E. ninakohlyakimovae* observed in this experiment are comparable to the Norton's [12] observations, in a goat inoculated experimentally with 5,000 sporulated oocysts of this species.

Clinical signs of coccidiosis caused by *E. ninakohlyakimovae* were observed in this study even in the smaller infecting dose administered ( $5.0 \times 10^4$  oocysts/kg). The goats infected with  $2.0 \times 10^5$  oocysts/kg presented the most serious symptoms of eimeriosis and one of them died on the 16<sup>th</sup> DAI. These results corroborate the pathogenicity of this species for goats, which was already ascertained in previous studies [2, 13]. The pathogeny of the infection with *E. ninakohlyakimovae* in goats is comparable with the one of *Eimeria ovinoïdalis* in ovines. Both of them destroy the cecum and colon crypts' indifferntiated cells, leaving the mucosa without an epithelium [12]. The species of coccidia which are located in the large intestine of ruminants are generally more prejudicial to the hosts than the species which develop in the small intestine [5]. The lesions observed in this experiment were located only in the large intestine, suggesting that the primary merogony of *Eimeria ninakohlyakimovae* does not cause significant alterations in the

small intestine of goats, comparable with what occurs with *Eimeria christensenii* [9] where the main lesions are associated with the gametogony and formation of oocysts.

The fact that goats inoculated with  $9.0 \times 10^5$  oocysts have not presented a clinical symptomatology proportional to the infecting dose and that they have eliminated few oocysts in their feces may be probably explained by a "Crowding factor" effect, in which the number of available epithelial cells is not enough to lodge all parasites when high doses of oocysts are administered [7]. This fact was observed by Kouwenhoven [8] who inoculated chicken with 60,000 sporulated oocysts of *Eimeria acervulina* and they did not present clinical symptomatology in accordance with the infecting dose. LOTZE & LEEK [11] working with *Eimeria intricata* in ovines, believe that the reaction of the host to a massive infection by asexual stages results in the inhibition of the sexual stages.

### References

1. - AUMOUNT (G.), YVORE (P.) and ESNAULT (A.): Experimental model effects of parasitism on the feeding behaviour. *Ann. Rech. Vet.* ,1984, **15** : 467-473.

2. - BALOZET ( L.): Les coccidies du mouton et de la chèvre. Cycle évolutif de *Eimeria nina-Kohl- Yakimovae* Yakimoff et Rasteigaiva, 1930. *Arch. Inst. Past. Tunis.*, 1932, **21** : 88-118.
3. - BHATIA ( B. B.) and PANDE ( B. P.): Giant eimerian schizonts in mesenteric lymph nodes of a kid. *Ind. J. microbiol.*, 1967, **7**: 161-164.
4. - GILL ( B.S.) and KATIVAR (R. D.): An acute outbreak of coccidiosis (*Eimeria arloingi* Marotel, 1905) in kids of Orai sheep breeding farm. *Ind. J. Vet. Sci. Anim. Husb.*, 1961, **31**: 213 - 216.
5. - GREGORY ( M. W. ) : Host reactions to coccidia in the sheep and rabbit their relevance to intestinal disease. 1983. Ph. D. Thesis, University of London.
6. - KANYARI ( P. W. N.): *Eimeria apsheronica* in the goat. Endogenous development and host cellular response. *Int. J. Parasitol.*, 1990, **20**: 625-630.
7. - KRASSNER (S. M.): Factors in host susceptibility and oocyst infectivity in *Eimeria acervulina* infections. *J. Protozool.*, 1963, **10**: 327-333.
8. - KOVWENHOVEN (B.): *Eimeria acervulina* infectie bij de kip een parasitologisch en biochemisch onderzoek. 1970. Ph. D. Thesis, Universiteit Utrecht.

9. - LIMA (J. D.): Life cycle of *Eimeria christenseni* Levine, Ivens & Fritz 1962 from the domestic goat *Capra hircus* L. *J. Protozool.*, 1981, **28**: 59-64.
10. - LLOYD (S.) and SOULSBY (E. J. L.): Survey of parasites in dairy goats. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, **39**: 1057 - 1059.
11. - LOTZE (I.) and LEEK (R. G.): Failure of development of sexual stages phase of *Eimeria intricata* in heavily inoculated sheep. *J. Protozool.*, 1970, **17**: 414-417.
12. - NORTON (C. C.): Coccidia of the domestique goat *Capra hircus* with notes on *Eimeria ovinoidalis* and *bakuensis* (sin, *E. ovina*) from the sheep *Ovis aries*. *Parasitology*, 1986, **92**: 279-289.
13. - SAYIN (F.): *Eimeria nina-kohl-yakimoi* Yakimof and Rastegaieff, 1930 in Angara goat. *Ankara Univer. Fak Derg.*, 1964, **11**: 136-141.
14. - YVORE (P.), ESNAUT (T. A.) and NACIRI (M.): La coccidiose caprine: effect de contaminations mono ou multiesoecifiques. *Rec. Med. Vet.*, 1985, **161**: 347-351.
15. - YVORE (P.), DUPRE (P.), ESNAULT (A.) and BESNAND (J.): Experimental coccidiosis in young goat. *Int. Goat and Sheep Research*, 1980, **1**: 163-167.

## 12. APÊNDICE III

April 02 1996

The Editorial Office of  
*Veterinary Parasitology*  
P. O. Box 181  
1000 A D Amsterdam  
The Netherlands

Dear Sir,

I am sending the manuscript **Ultrastructure of endogenous stages of *Eimeria ninakohlyakimovae* Yakimoff & Rategaieff, 1930 emend. Levine, 1961 in experimentally infected goat** for your appreciation.

Sincerely yours,

Luiz da Silva Vieira

Corresponding adress:

Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos – EMBRAPA.  
Caixa Postal D – 10. CEP 62100-000, Sobral, CE, Brazil  
Tel. (085) 612–1032; Fax. (085) 612–1132



Ultrastructure of endogenous stages of *Eimeria ninakohlyakimovae* Yakimoff & Rategaieff, 1930 emend. Levine, 1961 in experimentally infected goat

L. S. Vieira<sup>\*a</sup>, J. D. Lima<sup>b</sup>, M. F. B. Ribeiro<sup>b</sup>, I. A. Bozzi<sup>c</sup>, E. R. S. Camargos<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos - EMBRAPA.

Caixa Postal D-10. CEP 62.011-970, Sobral, CE., Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG.

Caixa Postal 486. CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG., Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Morfologia - ICB/UFMG.

Caixa Postal 486. CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG., Brasil.

---

**Abstract**

The ultrastructure of endogenous stages of *Eimeria ninakohlyakimovae* was observed in epithelial cells of cecum and colon crypts from a goat experimentally infected with  $2.0 \times 10^5$  oocysts/kg. The secondary meronts developed above the nucleus of the host cell. The nucleus first divides and merozoites then form on the surface of multinucleated meronts. Free merozoites in the parasitophorous vacuole present a conoid, double membrane, one pair of rhoptries, micronemes, micropore, anterior and posterior polar ring, polysaccharide granules, a nucleus with a nucleolus and peripheral chromatin. The microgamonts are located below the nucleus of the host cell and contain several nuclei at the periphery of the parasite. The microgametes consist of a body, a nucleus, three flagella and mitochondria. The macrogamonts develop below the nucleus of the host cell and have a large nucleus with a prominent

nucleolus. The macrogametes contain a nucleus, wall-forming bodies of type I (WFB I) and type II (WFB II) and polysaccharide granules. The young oocysts present a wall containing two layers and a sporont with polysaccharide granules.

Keywords: Goats, *Eimeria ninakohlyakimovae*, Ultrastructure, Coccidia, *Eimeria*.

---

\*Corresponding author: Fax: (088)-612-1132; Phone: (088)-612-1032

## 1. Introduction

The ultrastructure of *Eimeria* species infecting domestic animals has been extensively studied (Scholtyseck, 1973; Chobotar and Scholtyseck, 1982), but the coccidia of goats have been less contemplated in studies of this nature.

Light microscopy studies of the endogenous cycle of *Eimeria ninakohlyakimovae* in goats have been partially described in naturally (Sayin, 1964; Qadir, 1980) and experimentally (Balozet, 1932; Norton, 1986) infected animals. The ultrastructure of this species is still unknown. In the present report it is described the ultrastructure of endogenous stages of *E. ninakohlyakimovae* in a goat experimentally infected at two days of age.

## 2. Materials and methods

A two day old crossbred goat was inoculated with  $2.0 \times 10^5$  sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae*/kg and killed 15 days after infection. Cecum and colon fragments were collected and fixed in 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.4), and postfixed in 2% osmium tetroxide. The material was then dehydrated in growing concentrations of ethyl alcohol and embedded in Epon 812 resin. Ultrathin sections (90 nm) stained with an aqueous solution of uranyl acetate (Watson, 1958) and with a lead citrate solution (Reynolds, 1963) were examined under a Zeiss EM 10 transmission electron microscope.

### 3. Results

#### 3.1. *Development and ultrastructure of secondary meronts and merozoite formation*

Secondary meronts were observed in the epithelial cells of cecum and colon crypts, where they were located above the nucleus of the host cell inside a parasitophorous vacuole bounded by a membrane. Trophozoites containing a nucleus with peripheral chromatin and electron-lucent vacuoles were first observed (Fig. 1 (A)). Meront development starts with nucleus division and merozoites develop from an elongation of a region close to each nucleus, forming the apical complex of the merozoite (Fig. 1(B)). The plasma membrane of the parasite is formed simultaneously. During this stage, the anterior region of the merozoite is free and the posterior region is linked to the meront. Finally, the posterior end of the merozoite is released from the meront (Fig. 1(C)). The residual body of the meront contains polysaccharide granules.

#### 3.2. *Merozoite ultrastructure*

Merozoites were detected free inside parasitophorous vacuoles bounded by a double membrane (Fig. 1(D)). They contain a nucleus with a nucleolus and peripheral chromatin (Fig. 2(A)). The apical complex consists of the conoid, a pair of rhoptries and several micronemes. The ducts of the rhoptries run towards the anterior end and extend as far as the conoid and the posterior region, which is wider and club-shaped, extends in a caudal direction as far as approximately half the length of the merozoite (Figs. 2(A) - 2(B) - 2(C) - 2(D)). The anterior polar ring was not easily observed, but the posterior ring was clearly visible Fig. 2(A)). The micropore is located above the nucleus in the anterior region (Fig. 2(D)). Two to four spherical electron-dense bodies are usually located in the anterior region.

Polysaccharide granules distributed throughout the parasite were frequently observed .

### *3.3. Microgamont ultrastructure and microgamete formation*

The microgamonts inside the parasitophorous vacuoles develop below the nucleus of epithelial cells of cecum and colon crypts (Fig. 3(A)). They are round or slightly oval in shape and are bounded by a membrane. Immature microgamonts contain 2 to 19 nuclei distributed through the cytoplasm or localized at the periphery of the parasite, with a nucleolus and peripheral chromatin (Fig. 3 (B)). Polysaccharide granules are observed starting from the initial stages of development. Nuclear division occurs at the same time as parasite development. The microgametes develop in two phases: nuclear division occurs first and then the microgametes differentiate. After nuclear division, the nuclei migrate toward the periphery of the parasite and chromatin concentrates in one half of the nucleus (Fig. 3 (C)). The nucleus presents two regions, an electron-dense one that develops toward the parasite membrane and a less dense one that remains attached to the microgamont (Fig. 3 (D)). After maturation, the posterior portion of the microgamete is released from the microgamont. The residual body of the microgamont contains polysaccharide granules.

### *3.4. Microgamete ultrastructure*

The microgametes are free inside parasitophorous vacuoles or around the residual body (Fig. 4 (A)). They are elongated or slightly curved in shape, and

cross-sections are rounded (Figs. 4(B) - 4(C) - 4(D)). They consist of a body associated with an elongated mitochondrion and an electron-dense nucleus bounded by two membranes. They have three flagella originating from the anterior end which are longer than the microgamete (Figs. 4 (B) - 4 (C)). In cross-sections of the flagella, nine pairs of microtubules localized at the periphery were observed, as well as a central pair (Fig. 4 (D)).

### *3.5. Development and ultrastructure of macrogametes and oocysts*

Macrogamonts were detected below the nucleus of epithelial cells of cecum and colon crypts. They are ovoidal in shape and are located inside a parasitophorous vacuole apparently bounded by only one membrane. They have a large nucleus, with a prominent nucleolus (Fig. 5 (A)). The wall-forming bodies of type II (WFB II) are the first to be formed; they contain a scarcely electron-dense structure with a spongy aspect and are usually close to organelles resembling rough endoplasmic reticulum, bounded by a small electron-lucent area. Wall-forming bodies of the type I (WFB I) were observed only in more advanced stages. They are electron-dense, spherical and smaller than WFB II .

In macrogametes, WFB I are arranged in a row at the periphery of the parasite and WFB II are concentrated in the central part (Fig. 5 (B)). Polysaccharide granules and electron-lucent canaliculi are numerous in this stage .

Young oocysts are bounded by a double wall, formed by coalescence of WFB I (outer) and WFB II (inner); and contain a sporont with polysaccharide granules that are larger, more numerous and more electron-lucent than in the macrogametes (Figs. 5 (C) - 5 (D)).

#### 4. Discussion

The ultrastructural development of secondary meronts and the formation of merozoites of *E. ninakolyakimovae* are similar to those of *Eimeria bovis* (Sheffield and Hammond, 1967; Dubremetz and Elsner, 1979), *Eimeria ovinoidalis* (Kelley and Hammond, 1973) and *Eimeria praecox* (Lee and Millard, 1971a).

The electron-lucent vacuoles detected in the trophozoites of *E. ninakolyakimovae* are comparable to those of *Eimeria acervulina*, described by Michael (1975) as alimentary vacuoles.

The ultrastructure of *E. ninakolyakimovae* merozoites is similar to that of other *Eimeria* species (Sheffield and Hammond, 1966; Kelley and Hammond, 1973; Fernando, 1974).

The dense bodies observed in the anterior region of *E. ninakohlyakimovae* merozoites are comparable to those of *E. acervulina*, described by Michael (1975) as protein granules.

The microgametogenesis of *E. ninakolyakimovae*, characterized by nucleus multiplication and by microgamete differentiation, is similar to the general pattern reported for other *Eimeria* species (Scholtyseck et al., 1972; Ball et al., 1988). The microgametes of *E. ninakolyakimovae* have the same structure as the microgametes of other *Eimeria* species (Scholtyseck et al., 1972; Ball and Pittilo, 1988; Ball et al., 1988).

The ultrastructural aspects of macrogamete development and oocyst wall formation of *E. ninakolyakimovae* generally present the same sequence as described for other *Eimeria* species infecting mammals (Scholtyseck et al., 1971) and birds (Scholtyseck et al., 1971; Michael, 1975; Wheat et al., 1976; Elwasila, 1984; Pittilo and Ball, 1984).

The WFB I and WFB II observed in the macrogametes of *E. ninakolyakimovae* are shared by most *Eimeria* species (Scholtyseck et al., 1971). The WFB II of *E. ninakolyakimovae* are formed before the WFB I, as also occurs for other *Eimeria* species (Lee and Millard, 1971a,b; Scholtyseck et al., 1971), except *Eimeria truncata* (Gajadhar and Stockdale, 1986), in which WFB I are formed before WFB II. The size of WFB I and WFB II varies among the different *Eimeria* species. The WFB I of *E. ninakolyakimovae* are smaller than the WFB II, as is the case for *E. bovis* and *E. auburnensis* (Scholtyseck et al., 1966, 1971), but differ from those of *E. perforans*, *E. tenella* and *E. maxima* (Scholtyseck et al., 1971; Elwasila, 1984).

### References

- Ball, S. J.; Hutchison, W. M. & Pittilo, R. M., 1988. Ultrastructure of microgametogenesis of *Eimeria stiedai* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Acta Vet. Hung.*, 36: 229-232.
- Ball, S. J. & Pittilo, R. M., 1988. Ultrastructural observations of microgametogenesis in *Eimeria bakuensis* (Syn. *E. ovina*) of sheep. *Parasitol. Res.*, 74 : 431-435.
- Balozet, L., 1932. Les coccidies du mouton et de la chèvre. Cycle évolutif de *Eimeria nina -kohl-yakimovi* Yakimoff et Rastegaieva 1930. *Arch. Inst. Past. Tunis.* 21: 88-118.



- Chobotar, B. & Scholtyseck, O. E., 1982. Ultrastructure: In: Long, P. L. (ed). The Biology of the coccidia. University Park Press, Baltimore, Maryland, p. 101-165.
- Dubremetz, J. F.; Elsner, Y. Y., 1979. Ultrastructural study of schizogony of *Eimeria bovis* in cell cultures. J. Protozool., 26: 367-376.
- Elwasila, M., 1984. Fine structure of process of oocyst wall formation of *Eimeria maxima* (Apicomplexa: *Eimeriina*). Acta Vet. Hung., 32: 159-163.
- Fernando, A. M., 1974. Fine structure of the schizonts and merozoites of *Eimeria acervulina* in the chicken. J. Parasitol., 60: 149-159.
- Gajadhar, A. A. & Stockdale, P. H. G., 1986. Ultrastructural studies of microgametogenesis and macrogametogenesis of *Eimeria truncata* of the lesser snow goose. J. Protozool., 33: 345-351.
- Kelley, G. L. & Hammond, D. M., 1973. Fine structural aspects of nuclear division and merogony of *Eimeria ninakohlyakimovae* in cultured cells. J. Parasitol., 59: 1071-1079.
- Lee, D. L. & Millard, B. J., 1971a. Fine structure of the schizonts of *Eimeria praecox*. Int. J. Parasitol., 1: 37-41.
- Lee, D. L. & Millard, B. J., 1971b. The structure and development of the macrogamete and oocyst of *Eimeria acervulina*. Parasitol., 62: 31-34.
- Michael, E., 1975. Fine structure and development of schizonts, merozoites and macrogamonts of *Eimeria acervulina* in the goblet cells of the duodenal epithelium of experimentally infected birds. Parasitol., 70: 223-229.
- Norton, C. C., 1986. Coccidia of the domestic goat *Capra hircus*, with notes on *Eimeria ovinoitalis* and *E. bakuensis* (Syn, *E. ovina*) from the sheep *Ovis aries*. Parasitol., 92: 279-289.

- Pittilo, R. M.; Ball, S. J.; Catchpole, J. & Neal, C. R., 1988. Electron microscopy of *Eimeria bakuensis* (Syn *E. ovina*): macrogametogony and oocyst wall formation. *Acta Vet. Hung.*, 36: 233-237.
- Pittilo, R. M. & Ball, S. J., 1984. Electron microscopic of *Eimeria acervulina* macrogametogony and oocyst wall formation. *Parasitol.*, 89: 1-7.
- Qadir, A. N. M. A., 1980. A case report on the fatal *Eimeria ninakohlyakimovae* (Yakimoff and Rastegaieff, 1930) infection in a naturally infected goat. *Capra hircus*. *Bangladesh Vet.*, 14: 31-33.
- Reynolds, E. S., 1963. The use lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17: 208.
- Sayin, F., 1964. *Eimeria nina-kohl-yakimovi* Yakimoff and Rastegaieff, 1930 in an angora goat. *Ankara Univer. Fak. Derg.*, 11: 136-141.
- Scholyseck, E. O., 1962. Electron microscope studies on *Eimeria perforans* (Sporozoa). *J. Protozool.*, 9: 407-414.
- Scholyseck, E. O. 1973. Ultrastructure. In: HAMMOND, D. M.; LONG, P. L. (eds.) *The coccidia*. University Park Press, Baltimore, p. 81 - 144.
- Scholyseck, E.; Hammond, D. M. & Ernst, J. V., 1966. Fine structure of the macrogamete of *Eimeria perforans*, *E. stiedai*, *E. bovis*, and *E. auburnensis*. *J. Parasitol.*, 52: 975-987.
- Scholyseck, E.; Mehlhorn, H. & Hammond, D. M., 1971. Fine structure of macrogametes and oocysts of coccidia and related organisms. *Z. Parasitenk.*, 37: 1-43.
- Scholyseck, E. O., Mehlhorn, H. & Hammond, D. M., 1972. Electron microscope studies of microgametogenesis in coccidia and related groups. *Z. Parasitenk.*, 38: 95-131.

- Sheffield, H. G.; Hammond, D. M., 1966. Fine structure of first-generation merozoites of *Eimeria bovis*. J. Parasitol., 52: 595-606.
- Sheffield, H. G. & Hammond, D. M. 1967. Electron microscope observations on the development of first - generation merozoites of *Eimeria bovis*. J. Parasitol., 53: 831-840.
- Watson, M. L., 1958. Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4: 475-478.
- Wheat, B. E.; Jensen, J. B.; Ernst, J. V. & Chobotar, B. 1976. Ultrastructure of macrogametogenesis *Eimeria mivati*. Z. Parasitenk., 50: 125-136.

## Figure Captions

Fig. 1. Electron-micrographs of second generation merogony of *E. ninakohlyakimovae* in the large intestine epithelial cells of experimentally infected goat, 15 days after infection (DAI). A. Trophozoite (T) and immature meront (IM), Scale bar = 1.2  $\mu\text{m}$ ; host cell nucleus (HN), parasite nucleus (PN), parasitophorous vacuole (PV). B. Division and migration of meront nuclei (arrow), Scale bar = 2.1  $\mu\text{m}$ ; HN. C. Formation and liberation (arrows) of merozoites, Scale bar = 0.8  $\mu\text{m}$ ; residual body (RB). D. Merozoites (Mz) free in the parasitophorous vacuole (PV); Scale bar = 1.0  $\mu\text{m}$ .

Figure 2. Electron-micrographs of merozoites of *E. ninakohlyakimovae* in the large intestine epithelial cells of experimentally infected goat, 15 DAI. A. Merozoite, Scale bar = 1.0  $\mu\text{m}$ ; parasite nucleus (PN), nucleolus (NU), posterior polar ring (PPR). B. Merozoite, Scale bar = 1.0  $\mu\text{m}$ ; conoid (C). C. Merozoite, Scale bar = 0.4  $\mu\text{m}$ ; conoid (C), rhoptries (R), polysaccharide granules (PG). D. Merozoite, Scale bar = 0.3  $\mu\text{m}$ ; micronemes (MI), micropore (MP), electron-dense bodies (EDB).

Figure 3. Electron-micrographs of microgamonts of *E. ninakohlyakimovae* in the large intestine epithelial cells of experimentally infected goat, 15 DAI. A. Microgametogenesis localization; microgamont (M) with microgametes (MG) situated below the host cell nucleus (HN), Scale bar = 1.6  $\mu\text{m}$ . B. microgamont in process of nuclear division, Scale bar = 2.1  $\mu\text{m}$ ; host cell mitochondria (arrow). C. microgamont (M), Scale bar = 1.6  $\mu\text{m}$ ; chromatin (arrow). D. nuclei migration (arrows) of microgamont to formation of microgametes; Scale bar = 0.6  $\mu\text{m}$ .

Figure 4. Electron - micrographs of microgametes of *E.ninakohlyakimovae* in the large intestine epithelial cells of experimentally infected goat, 15 DAI. A. Microgametes (MG) free in the parasitophorous vacuole, Scale bar = 1.0  $\mu\text{m}$ ; residual body (RB). B. Microgametes, Scale bar = 0.6  $\mu\text{m}$ ; flagellum (F), parasite nucleus (PN). C. Microgametes, Scale bar = 0.4  $\mu\text{m}$ ; flagellum (F). D. Transversal section of flagellum (F), Scale bar = 0.4  $\mu\text{m}$ .

Figure 5. Electron - micrographs of macrogamonts, macrogametes and oocyst of *E. ninakohlyakimovae* in the large intestine epithelial cells of experimentally infected goat, 15 DAI. A. Macrogamont (MA), Scale bar = 1.2  $\mu\text{m}$ ; host cell nucleus (HN). B. Macrogamete, Scale bar = 2.5  $\mu\text{m}$ ; parasite nucleus (PN), wall-forming body type I (1), wall-forming body type II (2), HN. C. Formation of the oocyst wall, Scale bar = 0.4  $\mu\text{m}$ ; coalescence of WFB II (arrow). D. Oocyst, Scale bar = 2.1  $\mu\text{m}$ ; host cell nucleus (HN), polysaccharide granule (PG).

Figure 1

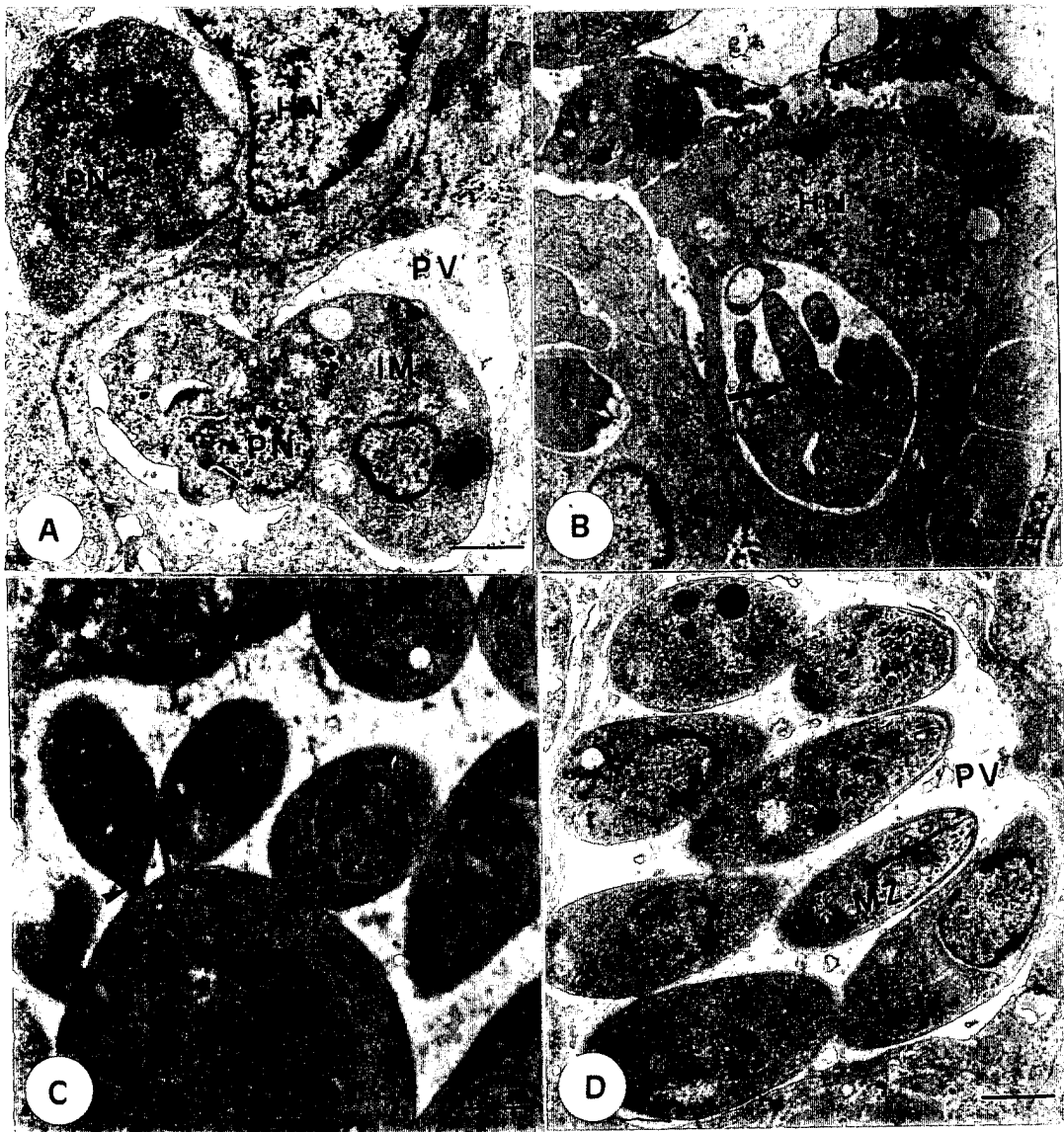


Figure 2

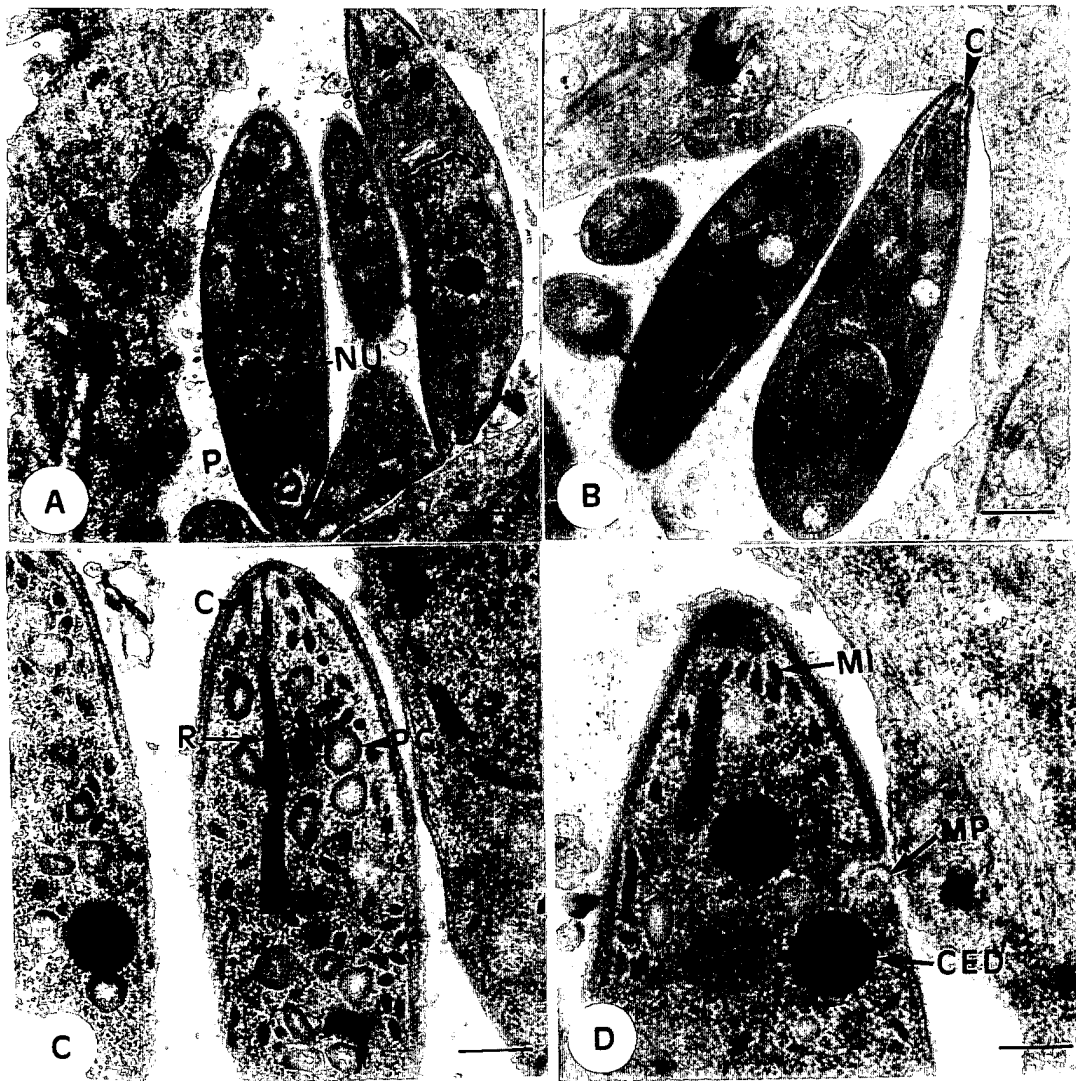


Figure 3

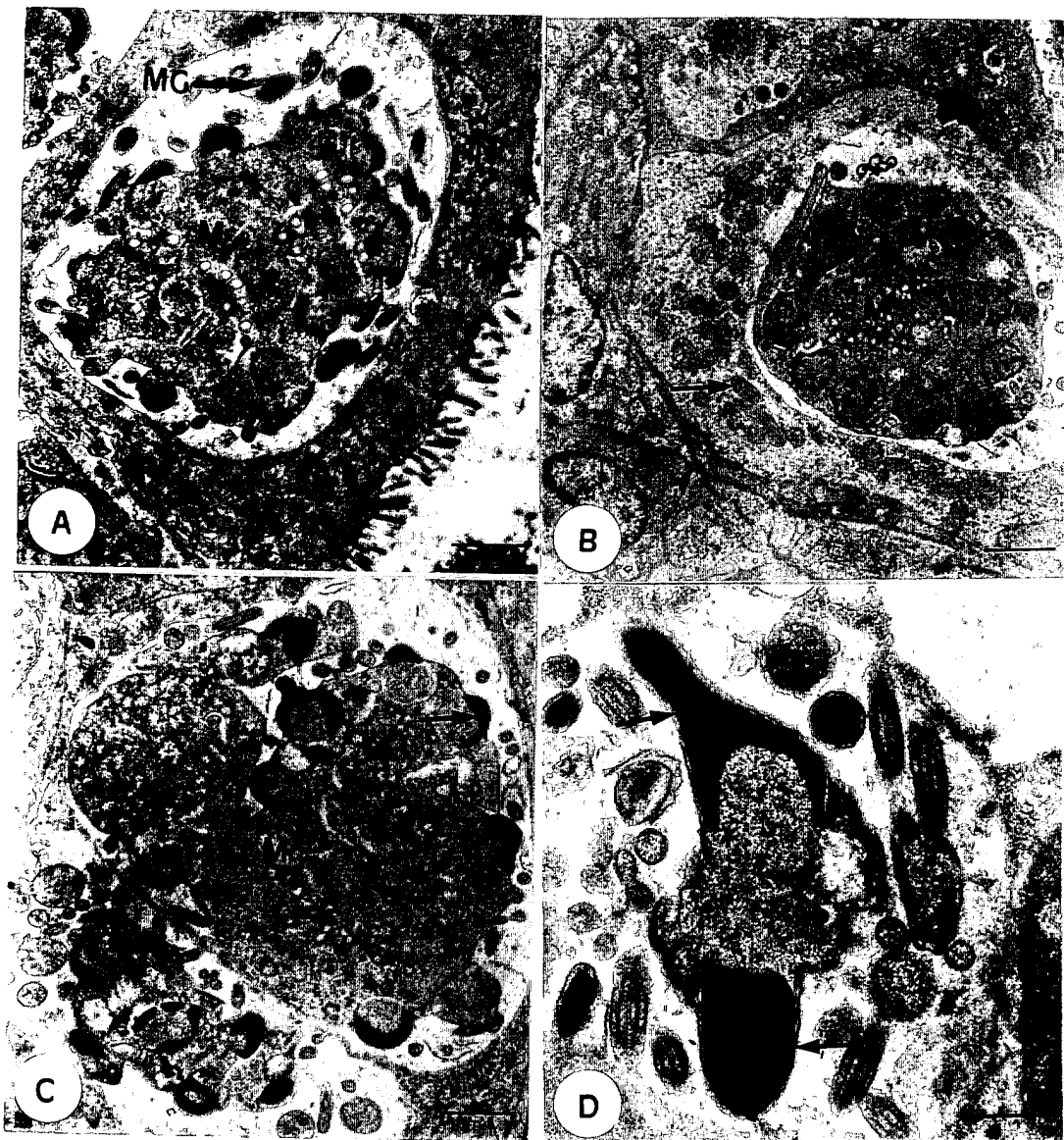




Figure 4

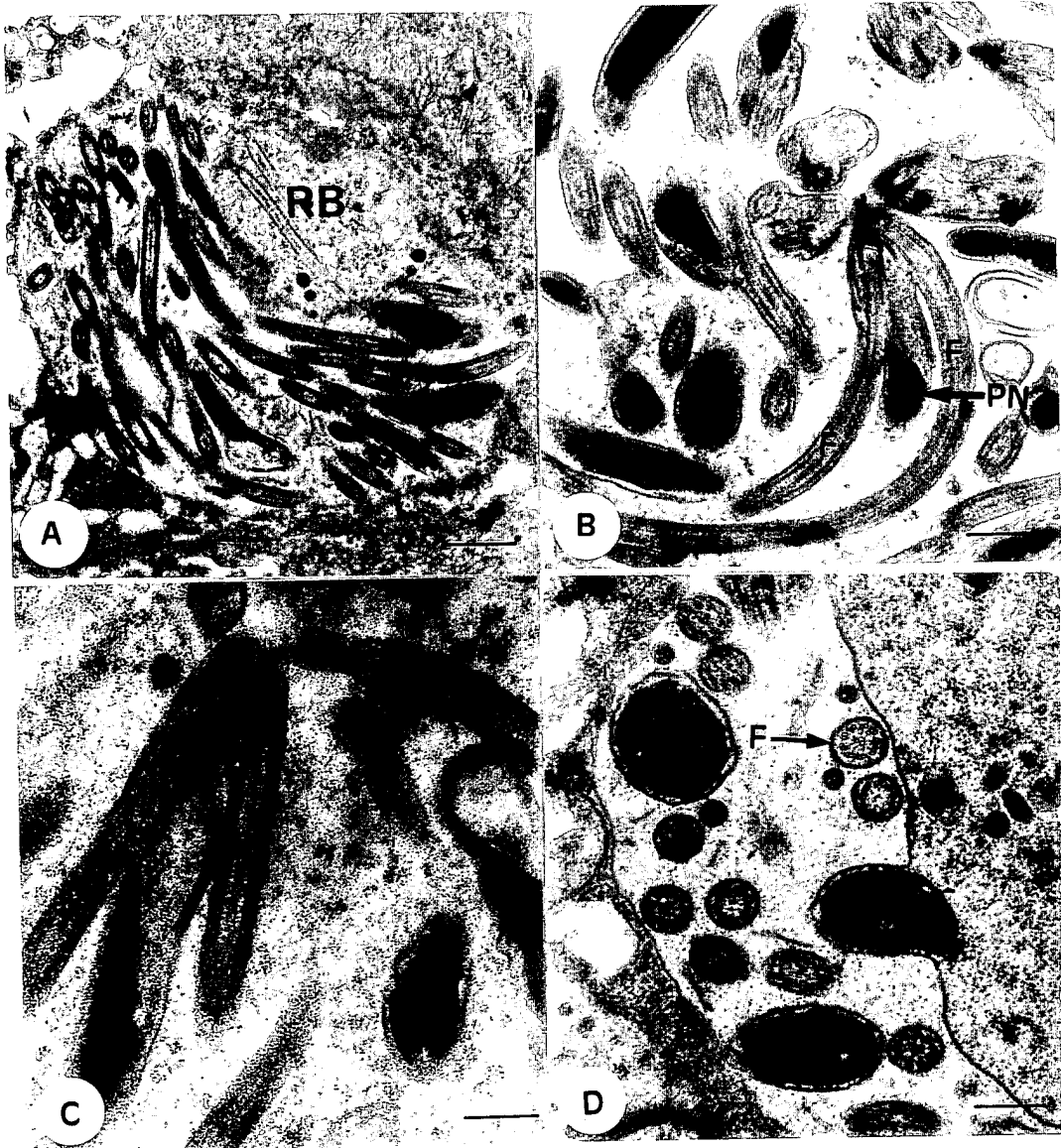


Figure 5

