

TM
Z5320
FCB
1989
M6

TM
Z5320
FCB
1989
M6



1020111394

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"ULTRAESTRUCTURA DEL QUISTE DE UNA NUEVA ESPECIE DE
SARCOCYSTIS (PROTOZOA; APICOMPLEXA) EN EL ROEDOR
SILVESTRE NEOTOMA MICROPUS Y DESARROLLO DEL CICLO
BIOLÓGICO EXPERIMENTAL EN GATOS DOMESTICOS "



TESIS DE MAESTRIA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

PRESENTA

ABEL MORÓN GUZMÁN

CD. UNIVERSITARIA

JUNIO DE 1989

TM
25320
Fcb
1989
M6

0130-92060



161905

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

"ULTRAESTRUCTURA DEL QUISTE DE UNA NUEVA ESPECIE DE
SARCOCYSTIS (PROTOZOA; APICOMPLEXA) EN EL ROEDOR
SILVESTRE NEOTOMA MICROPUS Y DESARROLLO DEL CICLO
BIOLOGICO EXPERIMENTAL EN GATOS DOMESTICOS "

TESIS DE POSTGRADO

QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

PRESENTA

ABEL MORON GUZMAN

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE:

BIOL. M.C. FERNANDO JIMENEZ GUZMAN

SECRETARIO:

Q.B.P., M.C. LUCIO GALAVIZ SILVA

VOCAL:

Q.F.B., M.C. ENRIQUE RAMIREZ BON

CD. UNIVERSITARIA

JUNIO DE 1989

A MI ESPOSA A Z U C E N A POR SU
APOYO INCONDICIONAL PARA CULMINAR EL
PRESENTE ESTUDIO.

A MIS HIJOS AZUCENA Y ABEL QUE
SIEMPRE ESTAN EN MI MENTE.

A LA MEMORIA DE MIS PADRES:
SR. PASCUAL MORON T. Y SRA. CONCEPCION GUZMAN DE MORON

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Biol. M. C. Fernando Jiménez Guzmán por la orientación y guía para la elaboración de esta Tesis.

Al M.C. Lucio Galavíz Silva por su apoyo y dedicación, así como por la supervisión que permitió la realización del presente trabajo.

Al M.C. Feliciano Segovia Salinas por su gran apoyo y colaboración.

Al M.C. Enrique Ramirez Bon por su ayuda en el estudio ultraestructural y revisión del manuscrito.

A todo el personal del Laboratorio de Parasitología que de alguna forma colaboraron en el presente estudio.

A Todos mi más profundo agradecimiento.

I N D I C E

	PAG.
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE.....	iii
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
MATERIAL Y METODOS.....	10
RESULTADOS.....	14
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	35
LITERATURA CITADA.....	44

I N T R O D U C C I O N

A la actualidad son innumerables las contribuciones sobre la ultraestructura de *Sarcocystis*, en especial de su pared quística, la cual ha sido empleada con el objeto de diferenciar las especies pertenecientes a este género (por ejemplo Beaver y cols., 1979; Kan, 1979; Daly & Markus, 1980; Beaver & Maleckar, 1981; Gjerde, 1985a, b, etc.); sin embargo, se asume que la estructura de la pared quística varía de acuerdo con la edad del sarcoquiste (Daly y col., 1980 y Munday & Obendorf, 1984), por lo cual Levine (1986) hace un llamado de atención al respecto y propone determinar las especies de *Sarcocystis* en base al conocimiento del hospedero definitivo e intermediario en el medio silvestre o bien, en forma experimental para su correcta ubicación taxonómica debido a su especificidad hospedatoria, por considerar la ultraestructura de la pared quística poco satisfactoria.

Cabe mencionar que la variación estructural de acuerdo a la edad del parásito, ya había sido sugerida por Sokoloff y Caballero desde 1933, al estudiar una especie de *Sarcocystis* proveniente del corazón de ternera y estudiada de acuerdo al método de Gross; además, estos investigadores mencionan que para clasificar los *Sarcocystis* "es indispensable, además del estudio de la estructura de

La membrana, el de la citología y del modo de reproducción de los parásitos; lo cual concuerda con el llamado de Levine (1986).

En los registros internacionales no existen reportes donde se mencione al roedor *Neotoma micropus* Blaird como hospedero intermediario para *Sarcocystis* spp., pues solo se conocen 19 especies de este protozooario apicomplejo distribuidos en *Oryzomys capito*; *Bettogonia lesueri grayi*, *Echinosorex gymnuris*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *R. tiomanicus*, *R. exulans*, *R. losea*, *R. villosissis*, *R. jalorensis*, *R. colleti*, *R. argentiver*, *R. rattus diardii*, *R. annadalei*, *Praomys natalensis*, *Peromyscus higginsii* (?), *Mastacomys fuscus* (?), *Microtus savii*, *Proechimys guyannensis*, *Bandicota indica* y *B. bengalensis* (Levine, 1986 y Levine y col., 1987).

El roedor *Neotoma microtus* es conocido comunmente como rata gris de panza blanca y geograficamente se distribuye de America Central a Canada, en Mexico, además de esta especie existe *N. mexicana*, reportada desde el Centro Sur de los Estados Unidos hasta Honduras, establecida en México en la Región Central y Sur del Pais, con excepción del SO, la Cuenca del Balsas, la Planicie costera del Golfo y la Península de Yucatán, reconocida como una especie nativa de es-

tas regiones (Ceballos y Galindo, 1984; Patten & Anderson, 1981; Murie, 1976).

Por este motivo, el objeto principal de este trabajo es el determinar el ciclo biológico experimental de la nueva especie de *Sarcocystis* parásita de *Neotoma micropus*, colectada en las Rancherías "Las Flores" y "Las Animas", localizadas en Doctor Coss, Nuevo León, México; así como describir la ultraestructura de su pared quística y bradizoitos para compararla con las especies afines descritas en la literatura.

A N T E C E D E N T E S

Sokoloff y Caballero (1933) aplican el método de Gross a los sarcoquistes obtenidos del corazón de ternera y que inicialmente habían identificado como *S. tenella*. De acuerdo a sus observaciones, concluyen que la variación estructural a nivel de microscopia de luz se debe a la edad joven de los parásitos y que para su correcta clasificación es indispensable, además del estudio de la estructura de la membrana, el de la citología y del modo de reproducción de los parásitos.

Christie, Dubey y Pappas (1976) estudia la prevalencia de la sarcocistosis en gatos provenientes de una zona de recreo en Ohio, E.U.A. De 1000 gatos revisados encuentra que el 0.2 % tenía sarcocistosis. Identifican los ooquistes de este parásito mediante inoculaciones en ratones.

Markus (1978) describe la importancia de la sarcocistosis como una entidad de importancia clínica y veterinaria. Entre los datos más sobresalientes menciona con detalle la patogenicidad, cambios patogénicos ocasionados por el parásito e inmunología y serología.

Beaver y col. (1979) revisan cinco casos clínicos de *Sarcocystis* en el hombre y lo comparan con las revisiones de casos anteriores. Revelan que la especie puede ser desig-

nada como *Sarcocystis lindermani*.

Heydron y Haralambidis (1979) estudian el desarrollo de una especie de *Sarcocystis* de gran importancia veterinaria (*S. capricanis*), por lo cuál infectan oralmente 13 cabras con 30 000-30 millones de esporocistos y obtienen la infección en todos los animales. Reportan síntomas de apatía, anemia, fiebre y caquexia, además de la muerte en ejemplares inoculados con 150 mil esporocistos o más a los 20-34 días de postinoculación. En el exámen patológico encuentran los esquizontes en todos los órganos de los animales, incluyendo el cerebro y corazón.

Kan (1979) examina bajo el microscópio electrónico de transmisión la pared quística de *Sarcocystis* encontrada en músculo esquelético y tejido subcutáneo de los roedores *Rattus rattus diardi*, *R. exulans*, *R. annandalei*, *R. talorensis* y *Bandicota indica*. Encuentra tres tipos de quistes morfológicamente distintos en infecciones únicas o mixtas. Sugiere que estos roedores son importantes hospederos intermediarios en el ciclo vital de, por lo menos, tres especies de *Sarcocystis* cuyo hospedero definitivo es desconocido.

Kan y cols. (1979) describen detalladamente la microestructura de la pared del quiste y zoitos de una especie de *Sarcocystis* del músculo esquelético de un mono

Macaca fascicularis infectado en forma natural en Malasia. Encuentran similitudes con un sarcoquiste de roedor, otros tipos descritos en monos y otras especies de casos humanos. Indican que es probable que el hombre, roedores y monos sirvan como hospederos intermediarios comunes para varias especies de **Sarcocystis**.

Markus y cols. (1979) reportan que ultraestructuralmente la pared quística del microquiste de **Sarcocystis** encontrado en zebras son similares a los descritos en el caballo doméstico. Para realizar su estudio inoculan experimentalmente cuatro perros y lo identifican como el hospedero definitivo experimental, el cual adquiere la enfermedad en un plazo de 15 días. Concluyen que los animales silvestres sirven como reservorio para los sarcoquistes de animales domésticos.

Aryeetey, Melhorn & Heydron (1980) infectan oralmente a cabras con esporoquistes de **S. capricanis** provenientes de heces de perros los cuales habían sido infectados previamente con carne que contenía **Sarcocystis** de cabras infectadas en forma natural y recuperan esquizontes maduros en el citoplasma de las células endoteliales en las venas del hígado, riñón y cerebro a los 12, 20 y 21 días de la inoculación.

Daly y Markus (1980) demuestran la utilidad de los estudios de la pared quística del sarcoquiste para ubicar a las especies de este coccidio. En su trabajo utilizan sarcoquistes de ovinos cuyo hospedero definitivo experimental es el gato.

Melhorn & Frenkel (1980) comparan la ultraestructura de los quistes de *Hammondia hammondi* y *Toxoplasma gondii* en músculo esquelético de ratones con los quistes de *Sarcocystis muris*. Concluyen que la distinción genérica se basa en la distribución de los zoitos en los órganos del hospedero intermediario y el hospedero definitivo.

Beaver y Maleckar (1981) inoculan por vía oral a roedores de laboratorio, gatos y monos, esporocistos obtenidos de culebras y obtienen infección solo en las ratas. Identifican los coccidios como *S. singaporensis* y *S. zamani* y mencionan que estos han sido reportados anteriormente de varias especies de roedores silvestres, mientras que una tercer especie identificada (*S. villivillosi*) representa un caso único en roedores.

Heydron y Matuschka (1981) infectan experimentalmente a perros y mapaches con sarcoquistes de varios hospederos

intermediarios. Identifican a *S. suicanis*, *S. ovicanis* y *S. capricanis*. Confirman la importancia epidemiológica del mapache como un hospedero final para la especie *S. suicanis* en Europa.

Markus y cols. (1981) estudian la ultraestructura del quiste encontrado en el mono *Cercopithecus pygerythrus* detectado en músculo esquelético en 11 de 134 monos sudafricanos. Relacionan sus resultados con un caso clínico reportado anteriormente en músculo de un sudafricano.

Munday y Obendorf (1984) estudian el desarrollo de *Sarcocystis gigantea* y de las lesiones en 32 ovejas inoculadas experimentalmente para observar el cambio morfológico en la pared quística de acuerdo con la edad del parásito. Con este estudio demuestran que las descripciones taxonómicas en base a la ultraestructura de la pared del quiste son poco útiles y que tienen que apoyarse en otro tipo de estudios.

Ford (1986) confirma la transmisión gato-oveja en el ciclo de la sarcosporidiosis para lo cual utiliza animales libres de la enfermedad.

Levine (1986) sugiere un cambio taxonómico completo para la ubicación de las especies de *Sarcocystis* Lankester, 1882 en base a estudios de ciclo biológico mediante infecciones experimentales o en forma natural. Reconoce 122 espe-

cies del género y advierte el peligro de utilizar la microscopía electrónica para el ordenamiento de las especies debido a que esta cambia con la edad del parásito.

Kirkpatrick y cols. (1987) examina 52 mapaches (*Procyon lotor* L.) capturados en Ohio, Pennsylvania, Florida y Maryland, E.U.A y encuentra un índice de infección del 50 % con *Sarcocystis* sp. Sugiere que el medio silvestre el hospedero definitivo puede ser un carnívoro.

Levine y Ivens (1987) recopila la información existente sobre las especies de coccidios en roedores y encuentra 1687 especies conocidas en estos vertebrados, de las cuales señala 19 para *Sarcocystis*.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Descripción del area de estudio: El Rancho "Las Flores" y "Las Animas" se encuentran ubicados en el Municipio de Doctor Coss, en la Provincia Fisiográfica de la Gran Llanura de Norteamérica en el Este del Estado de Nuevo León, entre las coordenadas 25° 56' de Latitud Norte y 99° 11' de Longitud Este. El tipo de vegetación predominante es la xerófita, constituida por matorral espinoso y mezquital. La precipitación pluvial oscila entre 300 y 600 mm anuales, el clima varía de secos a semicálidos subhúmedos, la temperatura media es mayor de 22°C, registrándose las mas cálidas de Junio a Agosto con 30-32°C. El tipo de suelo es salino y xerosoles sobre una topografía de llanuras y lomerios suaves (Secretaría de Programación y Presupuesto, 1981).

Colecta de Hospederos: La captura de las ratas de campo *Neotoma micropus* Blaird, se realizó con el empleo de trampas Havahart (Cat. Bio-Quip, 1986-1987) y cebos de diferentes tipos como son crema de cacahuete, harina de maiz, harina de trigo, aceite de sardina, etc, de acuerdo a las recomendaciones de Gaviño y cols., 1985.

Las trampas Havahart fueron colocadas cerca de las madrigueras de las ratas, los cuales se encontraron en la base de las nopaleras principalmente.

Los roedores capturaados fueron transportados vivos al Laboratorio de Parasitología de esta Facultad, donde se disectaron para examinar el tejido muscular en búsqueda de los saecoquistes, los cuales fueron depositados inicialmente en solución salina fisiológica y divididos en tres lotes para el estudio de microscopía y ciclo biológico experimental.

Estudio de microscopía de luz: Un lote de sarcoquistes detectados en los músculos maseteros, nasales, intercostales y en piernas, fueron fijados en formalina al 10 % por 24-48 horas para posteriormente teñirlos con la técnica tradicional de Hematoxilina y Eosina (Lillie & Fullmer, 1976); además, otros quistes fueron presionados individualmente entre portaobjetos y cubreobjetos para liberar los bradizoitos y teñirlos con azul de metileno, según las técnicas descritas por Melvin-Brooke, 1974. La merística de los sarcoquistes y bradizoitos fueron realizadas con un ocular micrométrico adaptado a un microscopio Carl Zeiss Junior y Las fotografías fueron tomadas en un Fotomicroscopio Carl Zeiss III.

Los ooquistes inmaduros provenientes de las inoculaciones experimentales en gatos domésticos fueron esporulados en una solución de dicromato de potasio al 2.5% con aeración constante por un periodo de 2-7 días, después de

de lo cual fueron separados de los detritos mediante la técnica de concentración por centrifugación de oquistes con una solución salina saturada de cloruro de sodio descrita por Davis (1973) y transferidos finalmente a agua destilada, donde se mantuvieron en viales para su estudio.

Estudio de microscopia de transmisión: Un segundo lote de sarcoquistes fue transferido de la solución salina a glutaraldehído al 2 % para su fijación, después de lo cual fueron postfijados en tetraóxido de osmio al 4%, deshidratados en una serie gradual de acetona y óxido de propileno e incluidos en resina epon. Los cortes finos y semifinos se realizaron en un Ultramicrotomo Sorvall Porter Blum, los cortes ultrafinos fueron depositados en rejillas de 200-400 mesh, treñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo y examinados en un microscopio electrónico de transmisión EM 109 de acuerdo a las técnicas descritas por Hayat (1972), Beaver y cols. (1979); Kan (1979) y Daly & Markus (1980).

Inoculación experimental: Un tercer lote de parásitos constituido por 390 sarcoquistes fué subdividido en 6 grupos de 65 quistes para ser administrados por vía oral mezclados con el alimento a tres gatos domésticos *Felis catus* y tres perros *Canis familiaris* previamente desparasitados y en observación continua por un periodo de dos semanas.

A los dos grupos de hospederos experimentales se les mantuvo con alimento comercial peletizado durante el desarrollo del experimento, y una vez infectados fueron examinados diariamente en búsqueda de los ooquistes por un periodo de 17 días consecutivos. Los exámenes coproparasitológicos se realizaron con las primeras deyecciones del día y en base a preparaciones directas con solución salina y con lugol entre portaobjetos y cubreobjetos, según lo recomienda Melvin & Brooke (1974) y Faust (1976).

Los ooquistes completamente esporulados fueron administrados por vía oral a seis ratones de laboratorio, a dosis de 30, 50, 100, 150, 300 y 600 ooquistes por ratón. Para favorecer la ingestión de los ooquistes se utilizó una solución de fructuosa donde fueron suspendidos los ooquistes.

De la misma manera se procedió a inocular tres cuyos y tres ratas blancas con dosis de 30, 50 y 100 ooquistes por animal experimental, de acuerdo a las técnicas mencionadas por Christie y cols. (1976) y Beaver & Maleckar (1981).

R E S U L T A D O S

Para el ordenamiento taxonómico de la nueva especie de protozoario apicomplejo *Sarcocystis neotomafelis* n. sp. se siguió el criterio establecido recientemente por Levine (1986).

Incidencia de sarcosporidiasis:

Los sarcoquistes fueron obtenidos de 100 roedores silvestres *Neotoma micropus* de los cuales 46 fueron machos y 54 hembras; la prevalencia global de parasitismo detectada fué del 73 %, distribuidos en un 46.57 % en los machos y 53.42 % en las hembras, lo cual parece indicar que este tipo de parasitosis no depende del sexo del hospedero para su establecimiento, pues de los machos se encontraron 34 positivos y de las hembras 39, sin mostrar una diferencia notable en su distribución.

Estudio morfológico con microscopia de luz:

Los sarcoquistes procesados por la técnica de hematoxilina y eosina, miden 148.9 a 1161.42 μ m de longitud por 59.56 a 729.61 μ m de anchura; estos fueron localizados principalmente en los musculos maseteros, fosas nasales, y en menor cantidad en los músculos intercostales, fasciales y en las extremidades posteriores.

Al microscopio de luz, se observa solamente una pared quística de 2 a 4 μ m de grosor (Foto 1), sin proyecciones dirigidas hacia el tejido del hospedero, ocasionalmente se observa un espacio vacío entre la pared quística y las fibras musculares (Foto 1 y 3). En algunos sarcoquistes los bradizoitos se observan distribuidos principalmente en el margen

L A M I N A 1

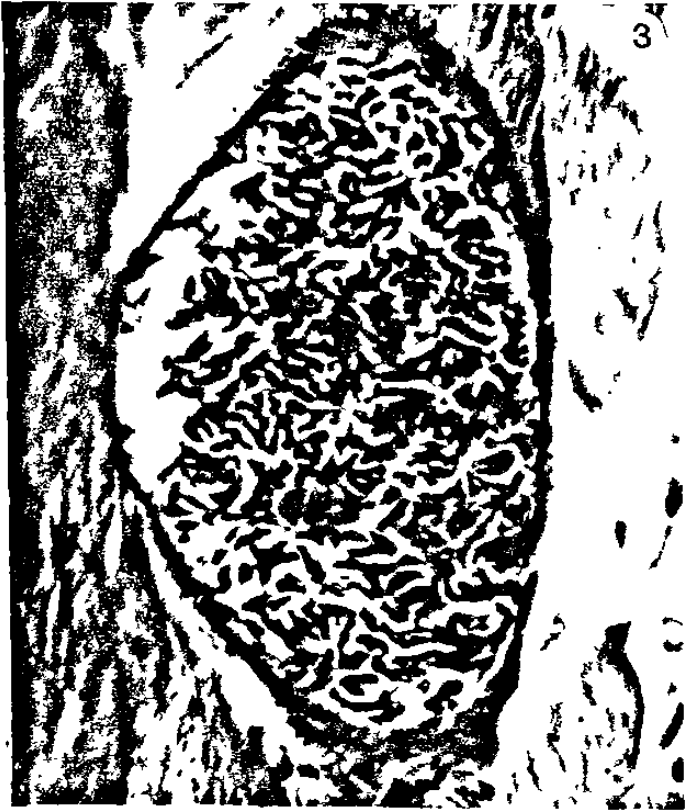
Foto 1 - Foto 4: Observaciones del quiste de *Sarcocystis neotomafelis* n.sp. con microscopía de luz.

Foto 1. Panorámica de la pared quística, note el espacio vacío entre la pared quística y el tejido del hospedero (FM). 1000 X

Foto 2. Quiste con bradizoitos en la periferia y material granular en el centro. 800 X

Foto 3. Quiste con bradizoitos distribuidos completamente en su interior. 1000 X

Foto 4. Zona central de quiste donde presenta material granular y fibras dirigidas de la periferia al centro (flecha). 1000 X



periferico (Foto 2), mientras en otros se encuentran dispersos uniformemente en todo el interior (Foto 3); en la zona central del primer tipo de sarcoquistes se observa un material granular donde convergen numerosas fibras que se originan cerca de la pared y le dan una apariencia de interdivisiones o compartimentos que separan un paquete de bradizoitos de los otros (Foto 4).

Los bradizoitos se observan en forma de luna en creciente cuando maduros y miden 7.65 a 12.24 μm de longitud y 1.53 por 3.06 μm de anchura.

Estudio ultraestructural:

Al microscopio electrónico de transmisión se observan dos tipos de pared en los de quistes sarcosporidianos, de acuerdo a su estructura, algunos se encuentran rodeados por la pared quística primaria y secundaria y otros solamente por la pared quística primaria.

La pared secundaria (Foto 7 y 8) se encuentra más cercana al tejido del hospedero separada ocasionalmente de este último por una membrana (Foto 9), sin observarse una vacuola parasitofora; carece de invaginaciones o proyecciones, presenta un grosor variable de 225 nm a 1.136 μm (Foto 7 y 8), en su interior se encuentran innumerables vesículas con una longitud de 66 nm a 1.42 μm por 125 a 583 nm de anchura,

L A M I N A 2

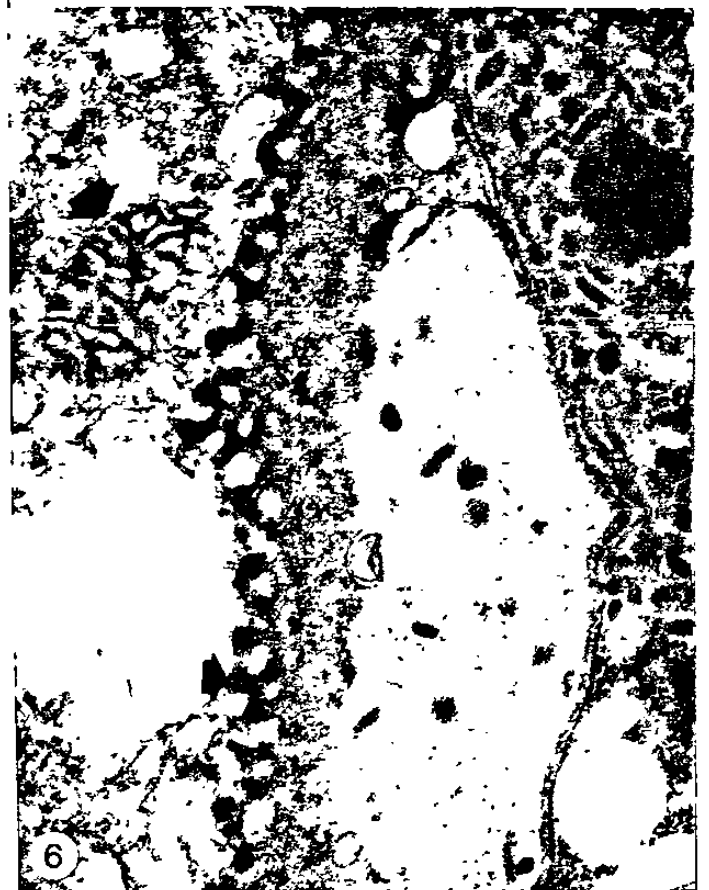
Foto 5 - Foto 8: Aspectos de la pared quística de *S. neotomafelis* n.sp. observados al microscopio electrónico de transmisión.

Foto 5. Quiste rodeado por la pared quística primaria solamente, constituida por la membrana limitante con proyecciones (flecha) y la substancia granular periférica (SG). Observe la película de aspecto membranal que limita la substancia granular y el contenido quístico. 30, 000 X

Foto 6. Panorámica de la pared quística primaria embebida en tejido fibroso. Observe la mitocondria del angulo izquierdo superior (flecha), proyecciones digitiformes y substancia granular. 12, 000 X

Foto 7. Quiste con una pared quística secundaria y pared quística primaria. 20, 000 X

Foto 8. Aspecto general de la pared primaria y secundaria (flecha curvada) que rodean al quiste dividido en septos (S) o compartimientos. Note el núcleo (N) de un metrocito o bradizoito inmaduro. 4, 400 X



estas vesículas ocasionalmente se observan ocupadas por un material amorfo, granular y ligeramente electrodensó que presentan un diámetro de 40 a 863 nm. En el interior de la pared secundaria se observan también material fibrilar y retículo endoplásmico.

La pared primaria se localiza inmediatamente abajo de la secundaria, se encuentra constituida por una membrana limitante y la sustancia granular. La membrana limitante presenta en su superficie externa numerosas invaginaciones o proyecciones dirigidas hacia la pared secundaria o hacia las células del hospedero, estas miden de 41 a 400 nm de longitud con una anchura de 83 a 108 nm (Foto 5 y 6), son proyecciones digitiformes sencillas y ocasionalmente se ramifican en tres proyecciones similares. Bajo la membrana limitante se encuentra la sustancia granular que rodea la periferia del quiste con un espesor de 175 nm a 1.025 μ m ; en su interior presenta material electrodensó y vesículas rodeadas por una membrana. Entre la sustancia granular y el resto del contenido no se observa membrana limitante, solo las que pertenecen a los bradizoitos inmaduros. La sustancia granular electrodensa se invagina hacia el interior del quiste a una distancia de 1.363-6.3 μ m y rodea los bradizoitos en desarrollo (Fotos 8-10).

L A M I N A 3

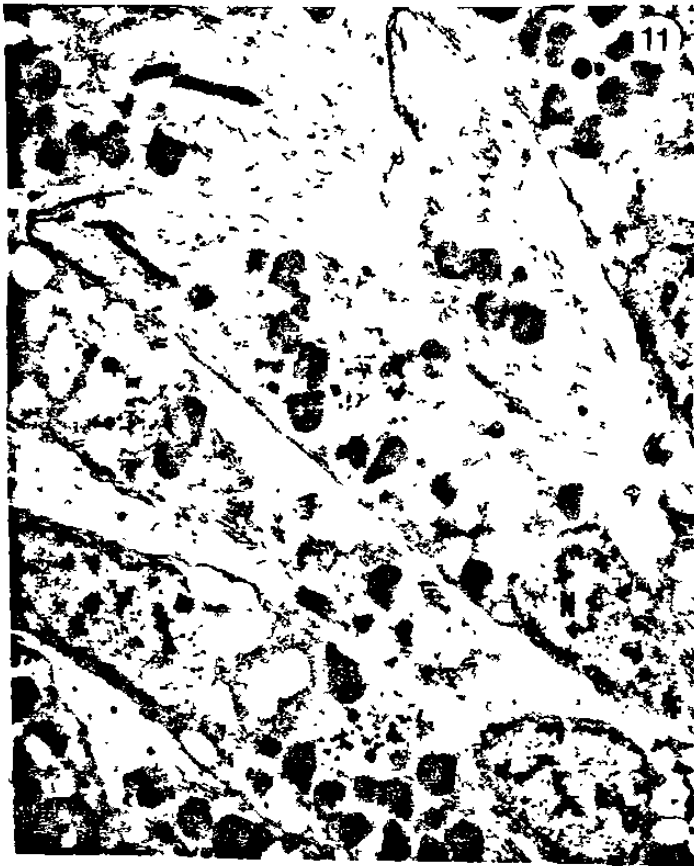
Foto 9 - Foto 12: Aspectos generales del interior del quiste de *S. neotomafelis*.

Foto 9. Acercamiento a un metrocito donde se aprecia el núcleo (N) y vacuolas lipídicas inmediatamente bajo la sustancia granular (SG) limitada por la pared primaria (flecha) y la pared secundaria (PS). 12, 000 X

Foto 10. Aspecto de las interdicciones o septos del quiste, constituidos por sustancia granular similar a la que rodea la periferia interior del quiste. 4, 400 X.

Foto 11. Panorámica de los bradizoitos en forma de luna en creciente localizados en el interior del quiste.
7,000 X

Foto 12. Corte transversal de los bradizoitos observados al microscopio electrónico de transmisión. 12, 000 X.



L A M I N A 4

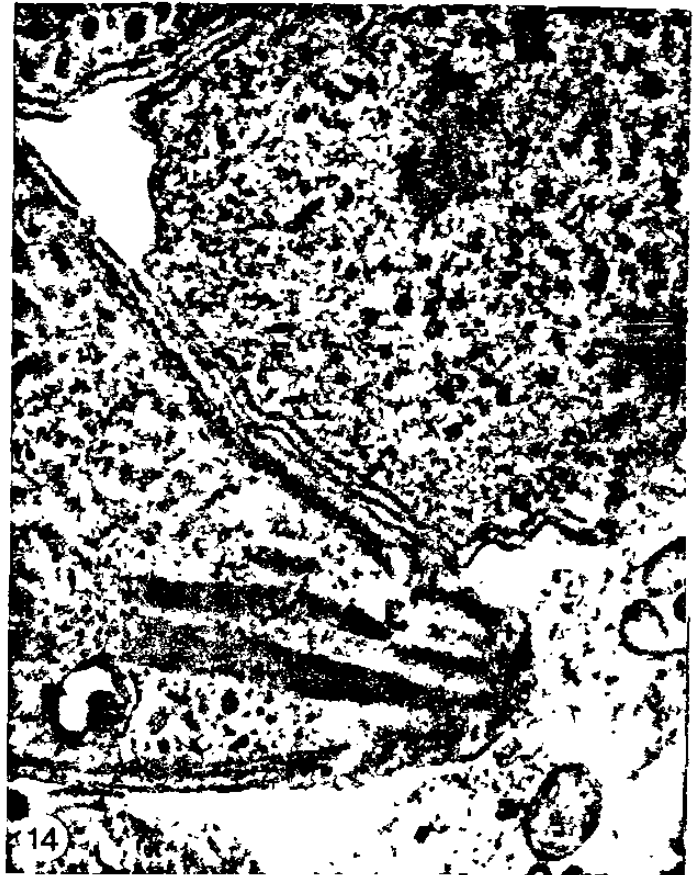
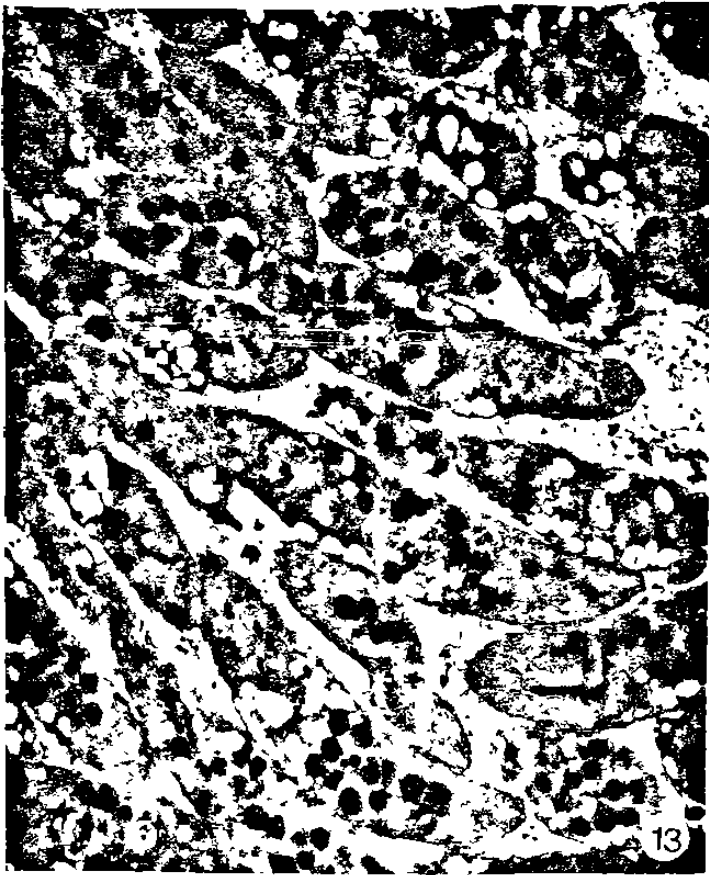
Foto 13 - 16: Micrografías al microscopio electrónico del sarcoquiste mostrando los diferentes aspectos del quiste y bradizoitos.

Foto 13. Panorámica de la morfología general de los bradizoitos de *S. neotomafelis*. 4, 400 X

Foto 14. Región apical en corte longitudinal de un bradizoito donde se observa el inicio de los roptries y la doble película que los rodea. 30, 000 X

Foto 15. Corte transversal de la región apical de un bradizoito donde se observa el conoide, anillo polar y el origen de los roptries. Observe la doble película que rodea al bradizoito y la vacuola lipídica del interior. 140, 000 X

Foto 16. Acercamiento a la región apical de un bradizoito en corte transversal, note el inicio de los roptries y la vacuola con doble película en la matriz. 50, 000 X



Los roptries alcanzan a medir 6.71 μm de longitud (Fotos 11, 17) y se observan aproximadamente de 8 a 9 por bradizoito, son sumamente electrodensos y con un diámetro variable de 190-500 nm (Fotos 12-13, 17-21).

Dispersos en la region medial anterior de los bradizoi-
tos se localiza una gran cantidad de micronemas (Fotos 11,
13, 17, 18), los cuales se observan como estructuras ligera-
mente electrodensas, fusiformes y en su mayoría dirigidas
hacia el extremo apical, estas miden de 44 a 225 nm de longi-
tud por 26 a 60 nm de anchura.

Los microtúbulos se localizan inmediatamente abajo de
la membrana celular interna (Fotos 20-21); en corte transver-
sal son redondeados con 14 a 20 nm de diámetro, aparentemen-
te huecos y en corte longitudinal se observan como estructu-
ras cilíndricas que recorren la periferia del bradizoito y
convergen en el conoide (Foto 19), observandose en número
de 8 a 16 por célula, separados entre sí por una distancia
aproximada de 126 a 258 nm lo cual varía de acuerdo al ni-
vel del corte transversal.

En el interior del bradizoito también se observan nume-
rosas vesículas lipídicas (Fotos 11-13, 17) las cuales lle-
gan a medir de 272 a 500 nm de longitud por 142 a 280 nm de
anchura y se localizan en su mayoría en la region media del
bradizoito.

L A M I N A 5

Foto 17 - Foto 20: Aspectos ultraestructurales de los bradizoitos y la matriz del quiste de *S. neotomafelis*.

Foto 17. Micrografía que muestra los roptries en corte longitudinal y transversal. Observe la varicción en el diámetro de estas estructuras y las vesículas embebidas en la matriz. 20, 000 X.

Foto 18. Micrografía de los bradizoitos en corte longitudinal que presenta los micronemas (MN) fusiformes con el axis principal dirigido longitudinalmente. Observe el plano longitudinal del conoide y las vesículas de la matriz. 20, 000 X.

Foto 19. Aspecto del conoide donde convergen los micronemas (flecha) en la region apical del bradizoito. 30, 000 X.

Foto 20. Corte transversal de un bradizoito a nivel de los roptries. Además se observa la doble película (flecha) y las vesículas de la matriz. 30, 000 X.



Los bradozoitos inmaduros se localizan generalmente inmediatamente bajo la sustancia granular, donde se encuentran embebidos (Fotos 8-9). Los bradizoitos completamente desarrollados (Fotos 11 y 13) son en forma de luna en creciente con el extremo anterior agudo y el posterior ligeramente redondeado; se distribuyen irregularmente dentro del quiste. Miden 6.6 - 9.8 μm de longitud por 1.68 - 2.26 μm de anchura. Poseen dos membranas celulares lo cuál constituye la película, separadas por una capa intermedia de material ligeramente electrodense semejante a la sustancia granular electrodensa; la membrana externa presenta un espesor de 6-15 nm, la capa intermedia de 6 - 16 nm y la membrana interna de 8-16 nm.

En la región apical los bradizoitos presentan un conoide electrodense (Fotos 14, 18, 19), semejante a un cilindro, las paredes del conoide miden 28.5 a 316 nm de longitud de acuerdo al tamaño del bradizoito con un diámetro exterior de 272 a 340 nm e interior de 239 a 321 nm. En corte transversal (Fotos 15-16) posee varias masas de material amorfo que constituye el inicio de los roptries.

El anillo polar (Fotos 15-16) se localiza en la periferia externa del conoide, mide 250 nm de diámetro interno y 360 nm de diámetro externo con un grosor de 36 nm.

L A M I N A 6

Foto 21 - Foto 22: Ultraestructura en corte transversal de los bradizoitos y matriz circundante del sarcoquiste.

Foto 21. Película constituida por la membrana externa, zona media y membrana interna (flechas) de los bradizoitos a nivel de los ropries. Note las vesículas con doble membrana que rodean los bradizoitos. 50, 000 X

Foto 22. Ultraestructura de un corte transversal a nivel del núcleo (N) que ocupa toda la anchura del bradizoito. Note la doble película y los elementos vesiculares que le rodean. 30, 000 X



El núcleo se localiza cerca del extremo posterior (Fotos 11, 13), este es de forma redondeada, antero posteriormente alargado y llega a ocupar casi toda lo ancho del bra-
dizoito (Fotos 11, 13, 22), mide de 1.78 a 2.71 um de longi-
tud por 1.171 a 1.25 de anchura máxima.

En la matriz del sarcoquiste se localizan una gran can-
tidad de vacuolas con un diámetro de 50 a 400 nm, rodeadas
por una doble membrana, las cuales pueden observarse en las
fotos 11-22.

Ciclo Biológico Experimental:

Los perros domésticos inoculados con los sarcoquistes
viables y revisados periodicamente en busca de los ooquistes
isosporidiano fueron sacrificados al 45 día de post-inocu-
lación debido a los resultados negativos en los exámenes
coproparasitológicos. Estos resultados fueron corroborados
por el estudio histológico del intestino donde se reveló
la ausencia de fases gametogónicas.

En los gatos domésticos, en cambio, se obtuvo la pro-
ducción de los ooquistes isosporidiano inmaduros al 17^o
día de post-inoculación.

Las preparaciones en fresco con lugol o solución sali-
na fisiológica revelaron la producción de ooquistes con
uno o dos esporoblastos (Foto 23-24). Al tercer día de espo-

L A M I N A 7

Foto 23 - Foto 26: Morfología de los ooquistes producidos por *S. neotomafelis* en gatos domésticos inoculados experimentalmente.

Foto 23. Ooquiste inmaduro con un esporoblasto. 800 X

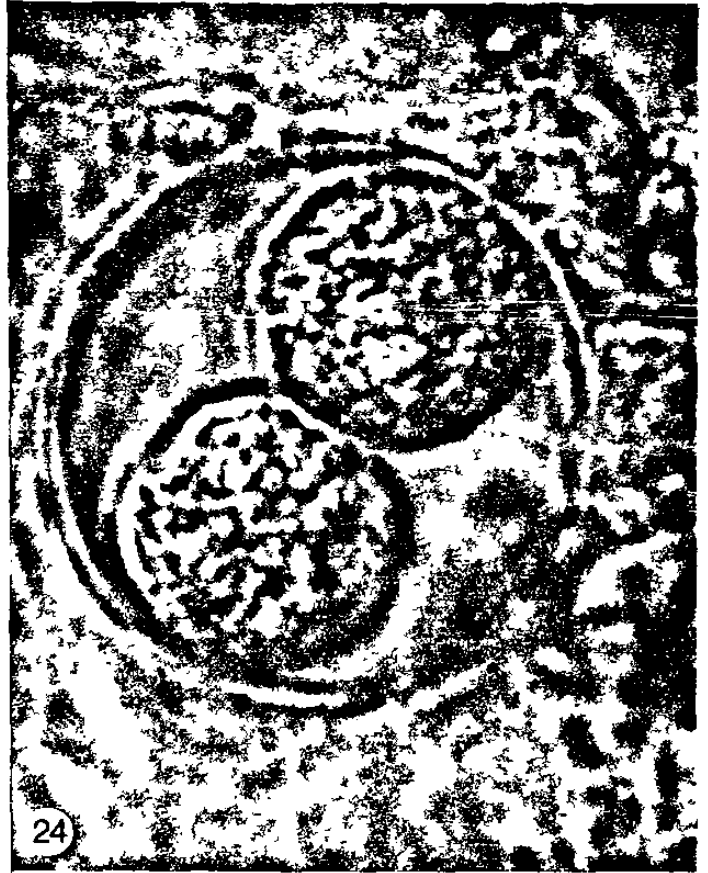
Foto 24. Ooquiste observado en heces fecales de los gatos domésticos con dos esporoblastos. 1, 000 X

Foto 25. Ooquiste isosporidiano maduro en dicromato de potasio al 2.5 %. Note los dos esporocistos con cuatro esporozoitos cada uno. 1, 000 X

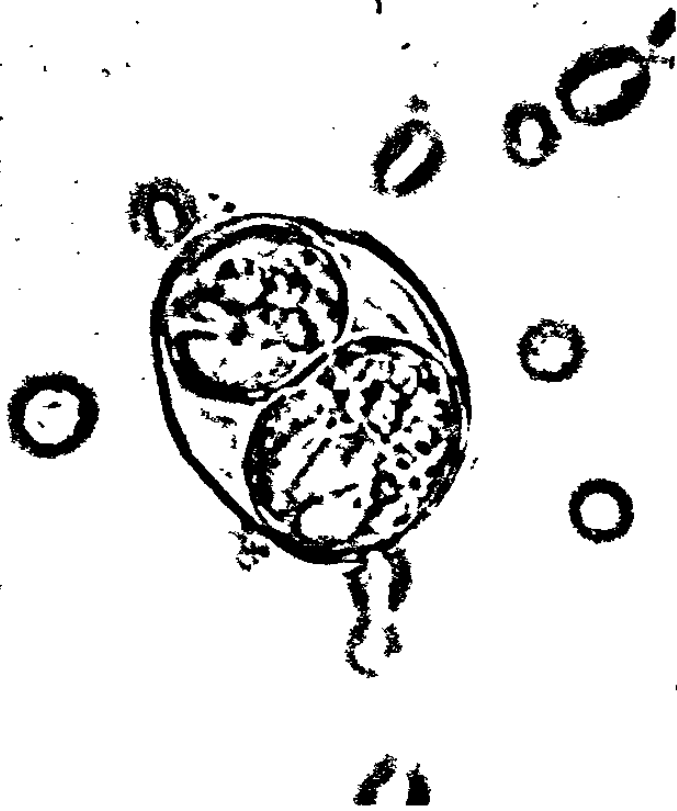
Foto 26. Ooquiste isosporidiano madurado en disromato de potasio 2.5 %. Note los cuadro esporozoitos por esporocisto y el cuerpo residual, así como la ausencia del micropilo.



23

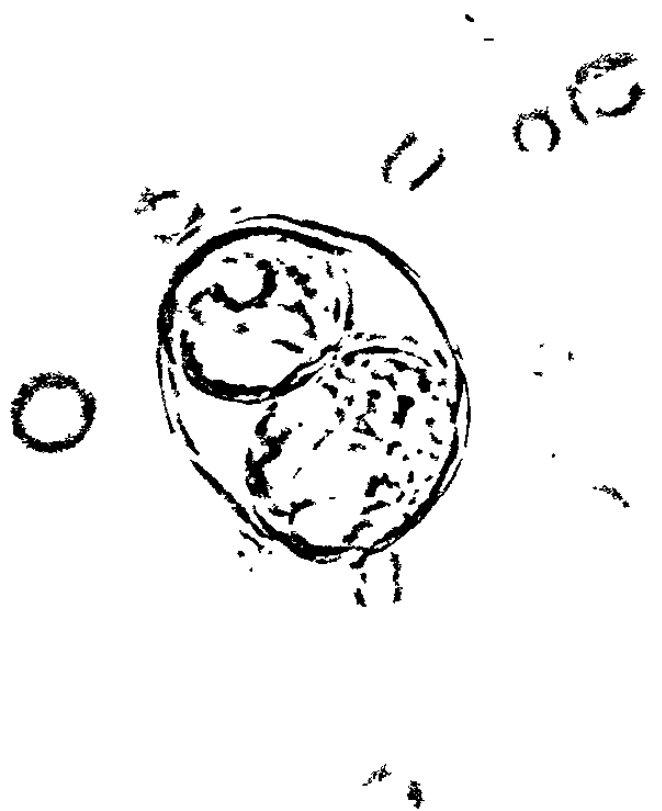


24



25

26



rulación inducida con dicromato de potasio y bombeo de aire, se observó la maduración completa de los ooquistes, los cuales presentan dos esporocistos con cuatro esporozoitos cada uno (Fotos 25-26).

Los ooquistes isosporidiano sporulados miden de 24.48 a 30.6 um de longitud por 18.36 a 22.95 um de anchura, mientras los esporocistos presentan una longitud de 15.3 a 19.89 um de longitud por 10.71 a 15.3 um de ancho.

Los esporozoitos son en forma de luna en creciente, miden 10.71-18.36 de longitud por 3.06-4.59 de anchura máxima. El residuo del esporocisto presenta un diámetro aproximado de 3.06 um.

En los ratones inoculados con lotes de 30, 50, 100, 150, 300 y 600 ooquistes isosporidiano, se observó muerte súbita iniciando al tercer día de post-inoculación.

Los intestinos de los animales experimentales se observaron con liquefacción y necrosis generalizada sin llegar a observar la formación de sarcoquistes en vasos o músculo. Resultados similares fueron observados en tres cuyos y tres ratas blancas.

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

En este trabajo se describe la ultraestructura de la pared quística y bradizoitos de *Sarcocystis neotomafelis* n.sp.

Debido a que durante las dos últimas décadas han sido innumerables las contribuciones sobre este tema, no es sorprendente observar una elevada variación en la terminología empleada, en este trabajo nos inclinamos en utilizar los terminos empleados por Levine (1986) por considerarla la de mayor difusión a nivel mundial.

Anteriormente a la fase de sarcoquiste se le denominaba tubulos de Miescher, que contienen formas "maduras" llamadas bradizoitos en su interior o ultima generación de merontes (cistozoitos, merozoitos, zoitos) y formas "inmaduras" o metrocitos; estos provienen de los esporozoitos ingeridos por el hospedero intermediario, los cuales desarrollan la primera generación de merontes en las células endoteliales o subendoteliales de los vasos sanguíneos y desarrollan la primera generación de merozoitos (taquizoitos) los cuales dan lugar a la segunda generación de merontes y consecuentemente a la segunda generación de merozoitos; menciona que esta secuencia puede ocurrir varias veces y que finalmente se establecen en músculo donde desarrollan el sarcoquiste; en el hospedero definitivo, una vez que ingiere los sarco-

quistes, los bradizoitos desarrollan gamontes en la pared intestinal y se desarrollan a gametos, cigotos y finalmente a ooquistes con dos esporocistos y cada uno con cuatro esporozoitos (Levine, 1986).

Sobre el género *Sarcocystis* solo existe una contribución formal realizada en la Republica Mexicana por Sokoloff y Caballero (1933), el cual destaca por su caracter visionario al señalar que los sarcoquistes provenientes de un corazón de ternera son difícil de identificar debido a que "para ello es indispensable, además del estudio de la membrana, el de citología y del método de reproducción".

De acuerdo al ciclo biológico presa-predador que presentan estos protozoarios apicomplexos, proponemos esta nueva especie debido a la especificidad que presentan, pues no existe ninguna especie asignada para la rata de campo *Neotoma micropus* como hospedero intermediario, de acuerdo al listado proporcionado por Levine (1986) quien ordena 122 especies reconocidas en base al hospedero definitivo e intermediario, de las cuales, según menciona solo se conocen en 56 especies.

Para la determinación específica de *S. neotomafelis* se consideró principalmente el ciclo biológico experimental el cual incluye a la rata *Neotoma* y gatos

domésticos, debido a que en la actualidad no es suficiente el conocimiento ultraestructural de la pared y bradizoitos, pues en el transcurso de los 70's-80's una gran cantidad de estudios fundamentaban las descripciones de las nuevas especies en la estructura de la pared quística (Dissanaike & Kan, 1978; Kan & Dissanaike, 1978; Kan, 1979; Beaver & Maleckar, 1981; Colwell & Mahrt, 1981; Markus y cols., 1981; Kaiser & Markus, 1983 y Gjerde, 1985a, b) lo cual ha pasado a segundo término debido a las contribuciones de Munday & Obendorf (1984) quienes al estudiar la morfología de *Sarcocystis gigantea* en ovejas infectadas experimentalmente observan los cambios estructurales de la pared quística del 40^o día al 47 meses de post-inoculación. Otras de las contribuciones que respaldan los resultados de estos investigadores son las de Box y cols. (1984) y Markus (1984).

De acuerdo a los resultados obtenidos, *S. neotomafelis* es una especie altamente específica para la rata gris de panza blanca, debido a que los ooquistes esporulados no infectaron a los ratones y ratas de laboratorio, cuyos y hamsters. De hecho, para *Sarcocystis* y otros organismos relacionados, se reconoce una gran especificidad parasitaria por lo cual es necesario determinar el hospedero definitivo natural o experimental. Incluso se le reconocen no solo un estrecho rango de hospedantes, sino que presentan afinidad por

ciertos organos, partes de ciertos sistemas, tipos específicos de células y localizaciones específicas dentro de las células dentro de las cuales habitan; por lo cual, en este trabajo se tomaron en cuenta los tres principios básicos para la identificación de coccidios (1) morfología de los ooquistes, considerado como un método excelente para describir e identificar nuevas formas; (2) la determinación de los hospederos, necesaria para conocer el ciclo biológico y la apariencia de los ooquistes y (3) comprobar que los vertebrados filogenéticamente relacionados no son hospederos de la especie en estudio, debido a que las fallas para producir una infección en hospederos potenciales afines donde al parecer este tiene una amplia oportunidad para ser infectivo significa que el hospedero no es el adecuado. (Marquardt, 1973).

Con este reporte, ascienden aproximadamente a 20 las especies de *Sarcocystis* detectadas en roedores, lo cual significa 448 especies de coccidios distribuidas en 1688 especies conocidas de roedores pertenecientes a 16 familias, 93 géneros y 208 especies de hospedantes, según los listados proporcionados por Levine & Ivens (1987).

Los resultados obtenidos sobre la ultraestructura de la pared y bradizoitos son generalmente similares a los que

se describen para otras especies del género. Las especies que presentaron mayor semejanza son los descritos por Beaver y Maleckar (1981) quienes inoculan por vía oral a roedores de laboratorio, gatos y monos esporocistos obtenidos de cu- lebras *Python reticulatus* y obtienen infección solo en las ratas donde determinan a las especies *S. zamani* y *S. villivillosi*. También presenta semejanza ultraestructural con *S. muris* (Mehlhorn & Frenkel, 1980) y *S. sigmodontis* (Dubey & Sheffield, 1988). La comparación ultraestructural de *S. neotomafelis* con respecto a estas especies señala que los organismos descritos en este trabajo difiere de *S. muris* en que estos últimos habitan dentro de las fibras mus- culares, al microscopio electrónico la pared primaria está constituída por numerosas vesículas proyectadas hacia las células del hospedero sin desarrollar las proyecciones tí- picas sin presentar una pared quística secundaria (Mehlhorn & Frenkel, 1980).

S. singaporensis Zaman & Colley, 1976 difiere habitar el músculo esquelético en general de *Rattus norvegicus*, presenta quistes fusiformes, sus quistes miden 100 um o me- nos; las microfotografías al M.E.T. muestran una pared quis- tica con proyecciones alargadas similares a vellos largos sin filamentos (Zaman & Colley, 1975, 1976; Beaver & Male- ckar, 1981).

S. villivillosi, proveniente del musculo esquelético de *Rattus norvegicus* difiere del organismo aqui descrito por presentar quistes microscopicos de 180 um de largo por 20 um de ancho y son fusiformes; *S. zamani*, reportada del mismo hospedero difiere porque los quistes habitan en musculo estriado, principalmente en lengua, esófago, vagina y diafragma, miden de 200 a 300 um de diámetro y son fusiformes (Beaver & Maleckar, 1981). En cuanto al ciclo biológico, *S. zamani*, *S. singaporensis* y *S. villivillosi* difiere de *S. neotomafelis* por presentar como hospedero intermediario a *Python reticulatus* mientras que el nuevo organismo descrito desarrolla su gametogonia en gatos domésticos de acuerdo al estudio experimental desarrollado.

S. sigmodontis (Dubey & Sheffield, 1988) aunque es ultraestructuralmente similar a *S. neotomafelis* difiere por presentar quistes macroscopicos con varios centímetros de largo y parasitan unicamente musculo esquelético; además de no parasitar perros ni gatos domésticos.

Otra de las especies similares ultraestructuralmente fué *S. muris*, más sin embargo se observaron diferencias debido a que esta presenta una pared primaria constituida por numerosas vesículas proyectándose hacia las células del hospedero sin desarrollar las proyecciones típicas ni

la pared quística secundaria, aunque cabe mencionar que estos organismos utilizan como hospedero definitivos a gatos domésticos (Mehlhorn & Frenkel, 1980).

Los ooquistes no esporulados obtenidos en las heces de los gatos también han sido observados por Powell & McCarley (1975) quienes trabajan con sarcoquistes de *Sarcocystis muris* obtenidos de ratones de laboratorio e infectan gatos, en los cuales observan un periodo prepatente de 5-13 y un periodo patente de 7-20 días, lo cual es similar a los resultados obtenidos en este estudio. Aunque Melhorn & Frenkel (1980) describen que los ooquistes de *Hammondia* son evacuados sin esporular, semejantes a los de *Toxoplasma gondii*, mientras que los ooquistes sarcosporidianos siempre desarrollan esporocistos con esporozoitos antes de ser evacuados.

La presencia de una pared secundaria observada en *S. neotomafelis* se debe a la "edad" del sarcoquiste, debido a que el tejido que lo rodea tiende a atrofiarse y a degenerar ocasionando la formación de tejido fibroso, así mismo, en la zona central o medula del quiste los bradizoitos degeneran ocasionando la aparición de una zona vacía. Estas observaciones son apoyadas por los trabajos desarrollados recientemente por Munday & Obendorf (1984) quienes describen una pared quística con una morfología que varía de acuer-

do a la edad del sarcoquiste. Tambien Gjerde (1985a, b) menciona que la pared quística secundaria representa el material fibrilar que rodea la zona parasitada para formar una cápsula desarrollado por el tejido del hospedero. Tambien Gjerde sugiere que a la pared primaria se le denomine membrana quística debido a que esta es realmente una membrana unitaria con lo cual concordamos.

Otros estudios similares realizados en el extranjero son los de Kan (1979), quien realiza observaciones ultraestructurales de la pared quística de los sarcoquistes encontrados en cuatro especies de roedores (*Rattus r. diardi*, *R. exulans*, *R. jalorensis*, *R. annandalei*) y una bandicota (*Bandicota indica*) de Malaysia, en base a sus observaciones describe tres tipos de *Sarcocystis* nombrándolos Tipo I, II y III en base a las características y dimensiones de varias estructuras de la pared quística. Daly y Markus (1980) utilizan la ultraestructura de la pared quística para la separación de las especies de *Sarcocystis*, porque según menciona "es característica de cada especie y puede usarse para distinguir entre ellas, especialmente cuando se trata de la misma especie de hospederos", en su estudio describen la pared quística de un sarcoquiste de *Rattus norvegicus*.

Para la ubicación correcta del género *Sarcocystis*

fué necesario caracterizarlo con estudios de ultraestructura para distinguirlo de otros organismos afines como *Hammondia* y *Toxoplasma*, de acuerdo al criterio establecido por Melhorn & Frenkel (1980), quienes mencionan que las fases parasitas de metrocitos y bradizoitos (merozoitos quísticos) en *Sarcocystis* difieren significativamente de los de *Toxoplasma gondii* y *H. hammondi*. Los quistes de ambos organismos no difieren significativamente excepto por el tamaño de los bradizoitos y la presencia de una zona vesículas que rodean los quistes más viejos de *H. hammondi*. Sin embargo, *T. gondii* y *H. hammondi* difieren ambos de *Sarcocystis muris* en que esta última tiene una pared quística primaria con vesículas esféricas y tallo corto con metrocitos los cuales nunca se observan en en los de *Toxoplasma* o *Hammondia*, además, las dos últimas especies no presentan septos al verlos al microscopio electrónico de transmisión. Estas observaciones confirman el ordenamiento genérico de los organismos aquí descritos.

LITERATURA CITADA

- Aryeetey M., H. Mehlhorn & A.O. Heydorn. 1980. Electron Microscopic Studies on the Development of *Sarcocystis capracanis* in Experimentally Infected Goats. Zbl. Bakt. Hyg., I. abt. Orig. A 247: 543-556.
- Beaver, P. C.; R.K. Gadil & P. Morera. 1979. *Sarcocystis* in man: A review and report of five cases. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28 (5): 819-844.
- Beaver, P.C. & J.R. Maleckar. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman y Colley (1975), (1976), *Sarcocystis villivillosi* sp. n. and *Sarcocystis zamani* sp. n. Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. J. Parasitol. 67(2):241-256.
- Box, E.D., J.L. Meier, & J.H. Smith. 1984. Description of *Sarcocystis falcatula* Stiles, 1893, of parasites of birds and opossums. J. Protozool. 31: 521-524.
- Ceballos, G. y C. G. Leal. 1984. Mamíferos silvestres de la cuenca de México. Editada por Limusa y MAB-UNESCO (Programa del Hombre y su Biosfera), México, pp. 217-218.
- Christie, E.; J.P. Dubey, P.W. Pappas. 1976. Prevalence of *Sarcocystis* infection and other intestinal parasitism in cats from a humane shelter in Ohio. JAVMA, 168(5):421-422.

- Colwell, D.D. & J.L. Mahrt. 1981. Ultrastructure of the cyst wall and merozoites of *Sarcocystis* from moose (*Alces alces*) in Alberta, Canada. *Z. Parasitenkd.* 65; 317-329.
- Daly, T.J.M. y B. Markus. 1980. Separation of *Sarcocystis* species (Protozoa: Sporozoa, Coccidea) by means of cyst wall ultrastructure. *Electr. Micros. Soc. of South. Africa Proc.* 10: 95-96.
- Davis, L.R. 1973. Techniques. In: *The Coccidia Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera.* Edited by D.M. Hammond & P.L. Long. Publ. by University Park Press, Baltimore with Butterworth & Co. (Editores). Ltd. London. pp. 411-458.
- Dissanaike, A.S. & S.P. Kan. 1978. Studies on *Sarcocystis* in Malaysia. I. *Sarcocystis levinei* n. sp. from the water buffalo *Bubalus bubalis*. *Z. Parasitenkd.* 55: 127-138.
- Dubey, J.P. & H.G. Sheffield. 1988. *Sarcocystis sigmodontis* n. sp. from the cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *J. Parasitol.* 74(5):889-891.
- Faust E.; Farr R.P. y Clifton. 1976. *Parasitologia clinica.* Ed. Salvat. 5a. edicion. pp. 785-787.

- Ford, G.E. 1974. Prey-predator transmission in the epizootiology of ovine sarcosporidiosis. *Aust. Vet. J.* 50: 38-39.
- Ford, G.E. 1986. Completion of the cycle for transmission of sarcosporidiasis between cats and sheep reared specific pathogen free. *Australian Veterinary Journal.* 63(2)42-44.
- Frenkel, J.K.; J.P. Dubey.; N.L. Miller. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 167:893-896.
- Gaviño, de la Torre G., C.J. Lopez y H.H.F. Tapia. 1985. *Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo.* Editorial Limusa. México. pp 251.
- Gjerde, B. 1985a. Ultrastructure of the cyst of *Sarcocystis grueneri* from cardiac muscle of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Z. Parasitenkd.* 71: 189-198.
- Gjerde, B. 1985b. Ultrastructure of the cyst of *Sarcocystis tarandivulpes* from skeletal muscle of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *acta vet. Scand.* 26: 91-104.
- Hayat, M.A. 1972. *Basic Electron Microscopy Techniques.* Van Nostrand Reinhold Co., U.S.A. 119pp.

- Heydorn A.O. & F.R. Matuschka. 1981. Zur Endwirtspezifität der vom Hund übertragenen Sarkosporidienarten. Z. Parasitenkd, 66:231-234.
- Heydorn A.O. & S. Haralambidis. 1982. Zur Entwicklung von *Sarcocystis capracanis* Fisher, 1979, Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 95: 265-271.
- Kaiser, I.a. & M.B. Markus. 1983. Species of *Sarcocystis* in wild south African birds. Electr. Micros. Soc. of South. Africa Proc. 13: 103-104.
- Kan, S.P. 1979. Ultrastructure of the cyst wall of *Sarcocystis* spp. from some rodents in Malaysia. Int. J. Parasitol. 9: 475-480.
- Kan, S.P. & A.S. Dissanaiké. 1978. Studies on *Sarcocystis* in Malaysia. II. Comparative ultrastructure of the cyst wall and zoites of *Sarcocystis levinei* and *Sarcocystis fusiformis* from the water buffalo, *Bubalus bubalis*, Z. Parasitenkd. 57: 107-116.
- Kan, S.P.; K. Prathap & A.S. Dissanaiké. 1979. Light and electron microstructure of a *Sarcocystis* sp. from the Malaysian long-tailed monkey, *Macaca fascicularis*. Am. J. trop. Med. Hyg. 28(4): 634-642.

- Kirkpatrick C.E., A.N. Hamir., J.P. Dubey y C.E. Rupprecht.
1987. Sarcocystis in Muscles of Raccoons (*Procyon lotor* L.).
J. Protozool. 34(4): 445-447.
- Levine, N.D. 1986. The taxonomy of Sarcocystis (Protozoa, Apicomplexa) species. J. Parasitol. 72 (3): 372-382.
- Levine, N.D. & V.R. Ivens: 1987. Corrections in the names of rodent coccidia (Apicomplexa, Coccidiasina). J. Protozool. 34(4): 371.
- Lillie, R.D. & H.M. Fullmer. 1976. Histopathological techniques and practical histochemistry. 4^o Ed. Mc. Graw Hull Book Co.
- Markus, M.B., 1978. Sarcocystis and Sarcocystosis in domestic Animals and Man. Adv. in Vet.Sc. Comp. Med. 22: 160-187
- Markus, M.B.; I.A. Kauser & T.J.M. Daly. 1981. Sarcocystis of the vervet monkey *Cercopithecus pygerythrus*. Electr. Micros. Soc. of South. Africa Proc. 11: 117-118.
- Markus, M.B.; & T.J.M. Daly. 1984. Host Specificity of Sarcocystis species of wild African ungulates. Parasitology. 89: XLIII-XLIV.

- Marquardt, W.C. 1973. Host and Site Specificity in the Coccidia.
In: The Coccidia Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related
genera. Editada por D.M. Hammond & P.L. Long. Publ.
University Park Press (Editores) Ltd. London. pp. 23-43.
- Mehlhorn, H. & J.K Frenkel. 1980. Ultrastructural comparison of
cyst and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris* and
Hammondia hammondi in skeletal muscle of mice.
Protistologica. 12: 451-467.
- Melvin & Brooke. 1974. *Metodos de Laboratorio para Diagnostico de
Parasitosis Intestinalis*. Ed. Interamericana. Munday, B.L. &
D.L. Obendorf. 1984. Morphology of *Sarcocystis gigantea* in
experimentally-infected sheep. *Vet. Parasit.* 16: 193-199.
- Murie, O.J. 1976. *A Field Guide to Animal Tracks*. editada por
Roger Tory Peterson. Segunda Edicion, Houghton Mifflin
Company Boston. pp. 199.
- Patten, d. & S. Anderson. 1981. *Mammals*. In: *Harper & Row's
Complete Field Guide to North American Wildlife*, Harper &
Row, Editores. pp. 336-338.
- Sokoloff, D. & E.C.Caballero. 1933. El método de Gross aplicado
al estudio de la membrana de *Sarcocystis*. *Ann. Inst. Biol.*,
U.N.A.M. 4(1): 145-147.

Zaman, V. & F.C. Colley. 1975. Light and electron microscopic observations on the life cycle of *Sarcocystis orientalis* sp. n. in the rat (*Rattus norvegicus*) and the Malaysian reticulated python (*Python reticulatus*). *Z. Parasitenkd.* 47: 169-185.

Zaman, V. & F.C. Colley. 1976. Replacement of *Sarcocystis orientalis* Zaman and Colley, 1975 by *Sarcocystis singaporensis* sp. n. *Z. Parasitenkd.* 51: 137.

