

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

SAMIRA SALIM MELLO GALLO

**PARASITAS GASTRINTESTINAIS EM EMAS, *Rhea americana*, DE
UM CRIATÓRIO CIENTÍFICO EM CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ:
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

Campos dos Goytacazes

2013

SAMIRA SALIM MELLO GALLO

PARASITAS GASTRINTESTINAIS EM EMAS, *Rhea americana*, DE UM
CRIATÓRIO CIENTÍFICO EM CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ:
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

Campos dos Goytacazes

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 025/2013

Gallo, Samira Salim Mello

Parasitas gastrintestinais em emas, *Rhea americana*, de um Criatório científico em Campos dos Goytacazes-RJ: aspectos morfológicos e moleculares / Samira Salim Mello Gallo. – 2013. 105 f. : il.

Orientador: Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira
Dissertação (Mestrado – Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.
Bibliografia: f. 81 – 105.

1. Ratitas 2. Nematóides 3. Coccídios 4. Cistos 5. PCR I.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 636.69089696

SAMIRA SALIM MELLO GALLO

PARASITAS GASTRINTESTINAIS EM EMAS, *Rhea americana*, DE UM
CRIATÓRIO CIENTÍFICO EM CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ:
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

Aprovado em 30 de Março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Nicole Brand Ederli - UFPA

Prof. Bruno Pereira Berto - UFRRJ

Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes - UFRRJ

Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira - UENF
(Professor Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Aos meus pais pela vida e por proporcionarem ser quem eu sou. Agradeço em especial ao meu pai que me ensinou que a maior riqueza que um ser humano pode ter é o conhecimento.

Ao professor e orientador Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira por todo o apoio, incentivo, paciência, ensinamentos e amizade. Agradeço também por ter permitido a continuidade de minha formação. Sua alegria e dedicação à pesquisa científica são sempre inspiradoras.

Ao João Carlos Fosse Filho pela paciência, apoio nas horas de dificuldade, pela dedicação, por compartilhar comigo todos os momentos, bons e difíceis, sendo participativo em muitos deles.

À professora Dr.^a Nicole Brand Ederli por toda ajuda prestada nesta pesquisa.

Aos meus amigos de laboratório, Murilo de Oliveira Bôa Morte, Edwards Frazão Teixeira, Carina dos Santos Teixeira e Amanda Lucia Jimenez Sanz pela amizade, apoio e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao Dr. Vagner Ricardo da Silva Fiuza pelo apoio que me dispensou desde o início deste trabalho.

Ao doutorando André Mauricio Barroso que proporcionou muitos momentos de alegrias com suas brincadeiras e com quem tive o prazer do convívio diário.

Ao professor Dr. Bruno Pereira Berto pela paciência e ajuda no desenho do coccídio que foi de fundamental importância neste trabalho.

À todos os familiares que torceram e acreditaram na conclusão deste curso, fico muito grata.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

GALLO, S. S. M. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2013; Parasitas gastrintestinais em emas, *Rhea americana*, de um criatório científico em Campos dos Goytacazes-RJ: aspectos morfológicos e moleculares. Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Emas são aves não voadoras pertencentes ao grupo das ratitas. O interesse pela criação destes animais vem crescendo nos últimos anos devido ao seu grande potencial reprodutivo em cativeiro, à adaptabilidade e aos produtos e subprodutos de excelente qualidade. O objetivo do presente estudo foi identificar parasitas gastrintestinais em emas, *Rhea americana*. Para tanto, foram utilizadas sete emas adultas, quatro fêmeas e três machos, mantidas em um criatório científico na UENF. As coletas de fezes foram realizadas em intervalos bimestrais durante oito meses, e através da técnica de centrifugo-flutuação em solução saturada de sacarose (1,1g/mL) foram investigadas a presença de ovos, cistos e oocistos, além de análise molecular para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Entamoeba*. Foram observados ovos de *Capillaria* sp., *Baylisascaris* sp., *Sicarius* sp. e do tipo *Sicarius* sp. e outros ovos de nematóides da ordem Strongylida, além de cistos de *Entamoeba* sp., oocistos de *Isospora* sp. e *Eimeria* sp.. Após esporulação através de aeração utilizando bomba de aquário por 10 a 15 dias os oocistos de *Isospora* sp. caracterizados morfológica e morfometricamente incluindo os esporocistos, corpos de stieda e substieda. Seis amostras de fezes (85,7%) foram diagnosticadas como positivas para *Entamoeba* pela PCR e não foram diagnosticadas amostras positivas para *Cryptosporidium* e *Giardia* pela nested PCR. Concluiu-se que as emas do criatório científico da UENF estavam infectadas de forma enzooótica por espécies de nematóides e protozoários; que estas aves são parasitadas por pelo menos uma espécie de *Isospora* ainda não descrita em emas e que se faz necessário o diagnóstico da espécie de *Entamoeba*, através do sequenciamento do fragmento de DNA amplificado, para se estabelecer a real relação deste protozoário e o seu potencial hospedeiro.

Palavras-chave: Ratitas, nematóides, coccídios, cistos, PCR.

ABSTRACT

GALLO, S. S. M. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Mars 2013; Gastrintestinal parasites in rheas, *Rhea americana*, from a scientific breeding in Campos dos Goytacazes-RJ: morphological and molecular aspects. Advisor: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Rheas are not flying birds belonging to the group of ratites. Interest in the creation of these animals has increased in recent years due to its large reproductive potential in captivity, adaptability and products and by-products of excellent quality. The aim of this study was to identify gastrintestinal parasites in rheas, *Rhea americana*. To this end, were used seven adult rheas, four females and three males, kept in a scientific breeding located in UENF. The fecal samples were taken at bimonthly intervals for eight months, using the technique of centrifugal-flotation in saturated solution of sucrose (1.1 g/mL) were examined the presence of eggs, cysts and oocysts, in addition to molecular analysis for the diagnosis of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Entamoeba*. Eggs were observed of *Capillaria* sp., *Baylisascaris* sp., *Sicarius* sp. and the type *Sicarius* sp. and other nematode eggs of the Strongylida order in addition to cysts of *Entamoeba* sp., oocysts of *Isospora* sp. and *Eimeria* sp.. After sporulation by means of aeration utilizing aquarium bomb for 10 to 15 days oocysts of *Isospora* sp. were characterized morphologically and morphometrically including sporocysts, stieda and substieda bodies. Six stool samples (85.7%) were diagnosed as positive for *Entamoeba* by PCR and were not diagnosed positive samples for *Cryptosporidium* and *Giardia* by nested PCR. It was concluded that rheas of UENF scientific breeding were infected in order enzootic by species of nematodes and protozoa, these birds are parasitized by at least one species of *Isospora* not yet described in rheas and that it is necessary the diagnosis species of *Entamoeba*, by sequencing the amplified DNA fragment, to establish the actual relationship of this protozoan and its potential host.

Keywords: Ratites, nematodes, coccidia, cysts, PCR

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sequências dos iniciadores específicos para protozoários de potencial patogênico e zoonótico e seus tamanhos de fragmentos amplificados.	60
-----------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ciclo biológico de *Isospora* spp. e *Eimeria* spp. A contaminação se dá pela ingestão de oocistos esporulados presentes na cama, alimentos ou água contaminada. Os oocistos tem sua parede rompida, liberando os esporocistos (a) que no estômago liberam seus esporozoítos (b) que invadem as células intestinais. O esporozoíto inicia o processo de reprodução assexuada chamada de esquizogonia ou merogonia (c), formando o esquizonte que é uma unidade repleta de merozoítos. Os merozoítos se diferenciam em macrogametas e microgametas (d). O macrogameta é fecundado pelo microgameta formando o zigoto (e) e finalizando a fase endógena a parede celular é formada, dando origem ao oocisto não esporulado ou imaturo (f) que posteriormente é liberado na luz intestinal e irá esporular no ambiente (g). Setas vermelhas – fase exógena. Setas azuis – fase endógena. 26
- Figura 2** Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. Após a contaminação de um hospedeiro adequado, ocorre excistação (a). Os esporozoítos são liberados e parasitam as células epiteliais (b) do trato gastrointestinal ou de outros tecidos, tais como o trato respiratório. Os esporozoítos vão se tornando esféricos e passam a ser chamados de trofozoítos (c) Nessas células, os parasitas sofrem multiplicação assexuada (esquizogonia ou merogonia) (d,e) e depois a multiplicação sexual (gametogonia) (f) produzindo microgamontes (g) e macrogamontes (h). Após a fertilização dos macrogamontes pelos microgamontes (i), dois tipos diferentes de oocistos são produzidos: o de parede espessa (j), que é comumente excretado a partir do hospedeiro, e o oocisto de parede fina (k), que é principalmente envolvido na auto-infecção. Os oocistos são infectivos na excreção, permitindo assim transmissão direta (CDC modificado, 2012)..... 34
- Figura 3** Ciclo biológico de *Giardia* spp. Cistos são formas resistentes e são responsáveis pela transmissão da giardíase. Os cistos são resistentes e podem sobreviver vários meses na água fria. A infecção ocorre pela ingestão de cistos em água contaminada, alimentos ou por via fecal-oral (mãos ou fômites) (a). No intestino delgado, a excistação libera os trofozoítos (cada cisto produz dois trofozoítos) (b). Trofozoítos se multiplicam por fissão binária longitudinal, mantendo-se no lúmen do intestino delgado proximal, onde eles podem ser livres ou ligados à mucosa por um disco de sucção ventral. Encistação ocorre com o trânsito dos parasitas para o cólon

	(c). Tanto cistos como trofozoítos podem ser encontrados nas fezes (d) (CDC modificado, 2012).....	41
Figura 4	Ciclo biológico de <i>Entamoeba</i> spp. Cistos e trofozoítos são passados nas fezes (1). A infecção ocorre pela ingestão de cistos maduros (2) em alimentos contaminados com fezes, água ou mãos. Excistação (3) ocorre no intestino delgado e trofozoítos (4) são liberados e migram para o intestino grosso. Os trofozoítos multiplicam por fissão binária e produzem cistos (5), e ambas as fases são passadas nas fezes. Por causa da proteção conferida pelas suas paredes, os cistos podem sobreviver dias a semanas no ambiente externo e são responsáveis pela transmissão da doença. Trofozoítos passados nas fezes são rapidamente destruídos uma vez fora do corpo, e em caso de ingestão não sobrevivem à exposição ao ambiente gástrico. Em muitos casos, os trofozoítos permanecem confinados a luz intestinal (A: infecção não invasiva) de indivíduos que são portadores assintomáticos, passando cistos em suas fezes. Em alguns pacientes, os trofozoítos invadem a mucosa intestinal (B: doença intestinal), ou, através da circulação sanguínea vão para locais extra-intestinais tais como o fígado, pulmões e cérebro (C: doença extra-intestinal), com manifestações patológicas resultantes (CDC modificado, 2012).....	48
Figura 5	Pissetes ligados à bomba de aquário por meio de mangueiras.	56
Figura 6	Cisto de <i>Entamoeba</i> sp. com um núcleo bem visível, observado em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> (Barra de 10 µm).....	64
Figura 7	<i>Isospora</i> sp. observada em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> . Em A e B oocisto não esporulado e esporulado respectivamente (Barra de 10 µm).....	64
Figura 8	Formas semelhantes à <i>Eimeria</i> sp. com quatro esporocistos visíveis no interior do oocisto, observado em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> (Barra de 10 µm).....	65
Figura 9	Ovo do tipo Strongylida observado em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> (Barra de 20 µm)	65
Figura 10	Ovo de <i>Capillaria</i> sp. observado em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> (Barra de 10 µm)	66
Figura 11	Ovo de <i>Baylisascaris</i> sp. observado em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> (Barra de 20 µm)	66

Figura 12	Ovo de <i>Sicarius</i> sp. observado em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> (Barra de 20 µm)	67
Figura 13	Ovo do tipo <i>Sicarius</i> sp. observado em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> (Barra de 10 µm)	67
Figura 14	<i>Isospora</i> observada em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> . Em A fotomicrografia de um oocisto esporulado onde observa-se um oocistos subesféricos com parede dupla e lisa sem micrópila, resíduo do oocisto e grânulo polar, esporocistos levemente ovoides com corpo de stieda presente e parastieda ausente, esporozoítos com um corpo refrátil oblongo e núcleo e em B desenho esquemático das características morfológicas do oocisto (a) com corpo de stieda achatado e substieda (b,c,d,e) em formato irregular e proeminente..	69
Figura 15	Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da nested PCR do gene 18S rRNA de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> Marcador de peso molecular (MM); controle positivo (+); controle (nested) negativo (N); controle negativo (-) e amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 negativas. A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb..	71
Figura 16	Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de cistos de <i>Giardia</i> . Marcador de peso molecular (MM); controle positivo (+); controle (nested) negativo (N); controle negativo (-) e amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 negativas. A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 300 pb.	72
Figura 17	Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de cistos de <i>Entamoeba</i> . Marcador de peso molecular (MM); controle positivo (+); controle negativo (-) e amostras 1, 3, 4, 5, 6 e 7 positivas e amostra 2 negativa. A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 550 pb.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Morfometria em micrômetros dos cistos de <i>Entamoeba</i> e ovos de nematóides isolados em fezes de emas, <i>Rhea americana</i>	67
Tabela 2	Morfometria em micrômetros de oocistos de <i>Isospora</i> isolados em fezes de ema, <i>Rhea americana</i>	70
Tabela 3	Morfometria em micrômetros de esporocistos contidos em oocistos esporulados de <i>Isospora</i> em fezes de ema, <i>Rhea americana</i> . .	70
Tabela 4	Morfometria em micrômetros de corpo de stieda e substieda contidos em esporocistos de oocistos de <i>Isospora</i> isolados em fezes de ema, <i>Rhea americana</i>	70

LISTA DE SIGLAS

BSA - Bovine serum albumine

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CCTA - Centro de Ciências Tecnológicas Agropecuárias

DNA - Deoxyribonucleic acid

dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfato

GalNAc - N-acetilgalactosamina

HXGPRT - Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase

IFAT - Indirect Fluorescent Antibody Test

LSA - Laboratório de Sanidade Animal

NUPAP - Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia

ODC - Ornithine Decarboxylase

OOPG - Oocistos por grama de fezes

OPG - Ovos por grama de fezes

pb - Pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA - Ribonucleic acid

rpm - Rotações por minuto

UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

USA - United States of America

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	EMA. <i>Rhea americana</i>	20
3.1.1	Produtos e subprodutos	21
3.2	COCCÍDEOS EM AVES	22
3.2.1	Morfologia de <i>Eimeria</i> spp. e <i>Isospora</i> spp.	23
3.2.2	Infecção	24
3.2.3	Patogenia	25
3.2.4	Sintomatologia	25
3.2.5	Ciclo biológico	26
3.2.6	Diagnóstico	27
3.2.7	Profilaxia, controle e tratamento	28
3.3	O GÊNERO <i>Cryptosporidium</i>	29
3.3.1	Morfologia de <i>Cryptosporidium</i> spp.	30
3.3.2	Infecção e patogenicidade	31
3.3.3	Sintomatologia	32
3.3.4	Ciclo biológico	33
3.3.5	Diagnóstico	35
3.3.6	Profilaxia, controle e tratamento	36
3.4	O GÊNERO <i>Giardia</i>	37
3.4.1	Morfologia de <i>Giardia</i> spp.	38
3.4.2	Infecção e patogenicidade	38
3.4.3	Sintomatologia	39
3.4.4	Ciclo biológico	40
3.4.5	Diagnóstico	42
3.4.6	Profilaxia, controle e tratamento	43

3.5	O GÊNERO <i>Entamoeba</i>	43
3.5.1	Morfologia de <i>Entamoeba</i> spp.	45
3.5.2	Infecção e patogenicidade	45
3.5.3	Sintomatologia	46
3.5.4	Ciclo biológico	47
3.5.5	Diagnóstico	49
3.5.6	Profilaxia, controle e tratamento	50
3.6	BIOLOGIA MOLECULAR.....	50
3.6.1	Reação em Cadeia da Polimerase	51
3.6.1.1	Nested PCR.....	52
3.6.1.2	Multiplex PCR.....	52
3.6.1.3	PCR-RFLP.....	53
3.6.1.4	Sequenciamento.....	53
4.	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1	ANIMAIS E LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	54
4.2	COLETA DE AMOSTRAS.....	54
4.3	DIAGNÓSTICO DE OVOS, CISTOS E OOCISTOS NAS FEZES..	54
4.4	ESPORULAÇÃO.....	55
4.5	CONCENTRAÇÃO DOS OOCISTOS.....	56
4.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA.....	57
4.7	ANÁLISE MOLECULAR.....	57
4.7.1	Técnica de Centrífugo-flutuação	58
4.7.2	Extração do DNA	58
4.7.3	Reação em Cadeia da Polimerase	59
4.7.3.1	<i>Cryptosporidium</i> spp.	61
4.7.3.2	<i>Giardia</i> spp.	61
4.7.3.3	<i>Entamoeba</i> spp.	61
4.7.4	Análise da PCR	62
5	RESULTADOS	63
5.1	MICROSCOPIA.....	63
5.2	MORFOLOGIA E MORFOMETRIA.....	68
5.3	BIOLOGIA MOLECULAR.....	71

6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÕES	80
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO

A criação de ratitas é uma atividade em ampla expansão em todo o mundo e nos últimos anos a ema vem ganhando espaço, como ave ornamental bem como uma nova alternativa para pecuária brasileira. A finalidade da produção busca atender a demanda dos consumidores de couro de alta qualidade, carne vermelha com baixo teor de gordura, penas e outros subprodutos, como óleos em indústrias farmacêuticas e de cosmética. A criação comercial de *Rhea americana* (ema) apresenta alto crescimento devido às perspectivas da mesma no mercado nacional e internacional, contribuindo significativamente para o Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, além das vantagens que a criação deste animal oferece em relação as demais atividades agropecuárias, tais como rusticidade, produtividade e lucratividade. Além de possuir as mesmas qualidades de produtos e subprodutos das avestruzes, diante dos aspectos comportamentais, as emas apresentam vantagens no manejo zootécnico diante das avestruzes.

Em completude ao desenvolvimento da criação comercial de emas, aspectos voltados à sanidade destas aves assumem caráter de importância significativa para o sucesso desta atividade comercial. Nesse contexto, a vigilância e o controle de alguns patógenos, tais como os parasitas inclusive os protozoários, são essenciais para o êxito da criação de ratitas, refletindo diretamente na lucratividade do produtor. Dentre as enfermidades de importância, destacam-se as parasitárias, visto seu grande impacto em criatórios de maneira geral, demonstrando forte influência negativa na eficiência e rentabilidade produtiva. Quadros de coccidioses em instalações de ema podem causar além de mal-estar geral, redução no crescimento, baixos resultados reprodutivos e algumas vezes óbito de animais.

Medidas profiláticas são de ordem primária no gerenciamento de criações de aves de maneira geral, incluindo as ratitas. Um dos principais limitadores no controle e profilaxia das doenças em criações desses animais é o manejo, seguido pela escassez de informações técnico-científicas a respeito dos agentes infecciosos presentes nas emas, tanto em vida livre, quanto em sistema comercial de criação.

Desta forma, fica evidente que as práticas de manejo adequado associado ao conhecimento prévio dos principais agentes infecciosos comuns em ratitas assumem

caráter essencial na manutenção de uma unidade de produção bem-sucedida e lucrativa, atuando como barreiras positivas na propagação de enfermidades virais, bacterianas e parasitárias entre o plantel.

Diante da inexorável importância destas aves na cadeia produtiva nacional e da necessidade do preenchimento de lacunas a respeito de suas reais formas parasitárias, a execução desta pesquisa assume papel significativo para a perpetuação e manutenção destas aves em sistemas comerciais de criação.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Pretendeu-se avançar no estudo dos parasitas gastrintestinais de emas, *Rhea americana*, e caracterizar morfológicamente e morfometricamente as espécies de coccídios entéricos que parasitam as emas, além de abordar aspectos moleculares de espécies dos gêneros *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Entamoeba* presentes nessas aves.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar parasitas gastrintestinais que acometem as emas, *Rhea americana*.
- Caracterizar morfológicamente oocistos esporulados de coccídios que parasitam as emas
- Identificar morfometricamente oocistos dos gêneros *Eimeria* e *Isospora* de infecções naturais em emas.
- Caracterizar molecularmente espécies dos gêneros *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Entamoeba* utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EMA, *Rhea americana*

Emas, *Rhea americana*, são aves nativas da América do Sul, pertencentes a fauna brasileira e habitantes de campos e cerrados, biomas muito comuns em território nacional. Taxonomicamente, pertencem à Ordem Struthioniformes, Família Rheidae e ao Gênero *Rhea*. No Brasil, as espécies mais frequentes são a *R. americana americana* (DUNNING e BELTON, 1993), encontrada no norte do Paraná, regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil e a *R. americana intermedia*, encontrada nos três estados da região Sul (PARIZZI et al., 2008). É uma ave pernalta de grande porte, considerada a maior ave brasileira, pertencente ao grupo das Ratitas (aves não voadoras). É um animal da fauna silvestre nativa, controlado e protegido por órgão governamental, que define e regulariza as normas para criação, além de proibir sua caça em território nacional (LUDWIG e MARQUES, 2008).

A ema vive normalmente em grupos com aproximadamente 40 indivíduos e apresenta hábitos diurnos (BRUNING, 1974). Esta ave pode ser considerada onívora, pois sua alimentação é composta basicamente de vegetais, insetos e pequenos invertebrados, sendo comum entre filhotes o hábito de ingerir suas próprias fezes e as das aves adultas, classificando-as como aves de hábito coprofágicos. Através de análises de conteúdos estomacais em quatro exemplares capturados na natureza, foram encontrados hemípteros, folhas, galhos pequenos de vegetação herbácea, sementes de diversas dimensões, restos vegetais de plantas de brejo, frutos de palmeiras e de macaúba, além de raízes de gramíneas, demonstrando a ampla gama de componentes de sua dieta (REINHARDT, 1870).

Estas aves possuem regressão para vôo, apesar de possuírem asas desenvolvidas, mas essa limitação é compensada pela grande capacidade para correr podendo alcançar até 60 km/h (FOLCH, 1992; S, 2001; NAROSKY e YZURIETA, 2003). Suas longas asas são usadas para manter o contrapeso durante a corrida e no ato da cópula, para a proteção dos filhotes, termorregulação e como objeto de exibicionismo no ritual de acasalamento (SILVA, 2001).

Ao contrário da musculatura dos membros dianteiros menos desenvolvidos, suas pernas apresentam grande desenvolvimento muscular, sendo muito fortes permitindo desta forma agilidade, resistência e velocidade à corrida (SARASQUETA, 1990).

Estas ratitas possuem de maneira geral, temperamento dócil e traços comportamentais curiosos. Por outro lado, quando assustadas, correm com passadas longas, em ziguezagues, mostrando assim a funcionalidade de suas longas asas para uma ave que não voa (SICK, 1985).

As fêmeas geralmente iniciam a postura 25 dias após a cópula, os ovos são postos em volta de uma depressão no solo e o macho se encarrega de empurrá-los para dentro do ninho até que seja atingida uma quantidade satisfatória, estimulando o cessar da postura e início da incubação. A incubação é realizada pelo macho, que tem potencial de incubar de 10 até 60 ovos, contudo o número geralmente observado é de 18 ovos por ninho (AGUIAR e MAURO, 2004). Segundo Sick (1985), uma fêmea em intervalos de dois a três dias entre as posturas, é capaz de produzir de 10 a 18 ovos, e realizam várias posturas com diferentes machos em uma mesma estação reprodutiva, gerando aproximadamente 25 a 40 ovos ao término do período reprodutivo (SILVA, 2001).

3.1.1 Produtos e Subprodutos

A carne da ema possui excelente palatabilidade, baixa quantidade de gordura e colesterol, alto teor de proteína e ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega 3, além de apresentar maior rendimento econômico que bovinos e suínos nativos no que diz respeito ao tempo de produção, qualidade dos insumos e valor agregado (DANI et al., 1993; ABRACE, 2008). Uma característica peculiar da carne de ema, não observada em carnes de outras espécies, é o fato de conter menos de 1% de lipídios (SILVA, 2001). Essa carne é uma boa fonte nutricional de ferro e ferro heme (RAMOS et al., 2009).

A extração das penas das emas pode ser realizada a partir dos dez meses de idade e comercializada com bom preço para indústrias da moda e carnavalescas. O couro destas aves é de excelente qualidade, muito utilizado na produção de acessórios como cintos e bolsas. O óleo de gordura da ema é rico em vitamina E,

muito utilizado por indústrias cosméticas na produção de agentes hidratantes e emolientes. Possui propriedades anti-inflamatórias, anti-alérgicas, anti-reumáticas, cicatrizantes (muito utilizado em queimaduras), com grande importância para a indústria farmacêutica (ABRACE, 2008).

A casca do ovo pode ser comercializada para o artesanato ou triturada servindo também como componente de rações (DANI et al., 1993), além disto, é rica em cálcio (98,5%), tem demonstrado grande potencial para utilizações médicas, com seu pó também considerado um poderoso afrodisíaco (SILVA, 2001). O ovo pode ser utilizado como insumo na indústria de shampoos e preparo de vacinas (GIANNONI, 1996).

O fígado tem por finalidade a produção de patês de alto valor comercial, sendo a França o maior produtor atual e existem alguns fazendeiros franceses produzindo estes patês em Portugal (GIANNONI, 1996).

Unhas, cílios e bico são utilizados na produção de artesanato e acessórios de maquiagem, sendo os cílios utilizados na confecção de excelentes pincéis. O couro da canela é semelhante ao dos répteis, apresentando potencialidade para produção de pulseiras, cintos e outros itens decorativos (SILVA, 2001).

3.2 COCCÍDIOS EM AVES

Os coccídios consistem em uma grande variedade de parasitas unicelulares, pertencentes ao sub-reino Protozoa e Filo Apicomplexa (CONWAY e MCKENZIE, 1991). As coccidioses são doenças parasitárias ocasionadas por protozoários geralmente dos gêneros *Eimeria* e *Isospora*. Esta enfermidade pode ser também denominada como isosporose ou eimeriose, de acordo com seu agente causador. Embora a especificidade de hospedeiros para os coccídios seja um tema ainda pouco explorado, o senso comum é de que os coccídios são espécies-específicos, principalmente no que diz respeito ao acometimento de aves mantidas em gaiola. Diversas espécies de coccídios ocorrem em uma mesma espécie de ave e a maioria dessas espécies não é patogênica, demonstrando a importância não apenas quantitativa, mas também qualitativa de seu diagnóstico (CUBAS et. al., 2007).

3.2.1 Morfologia de *Isospora* spp. e *Eimeria* spp.

Os coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria* são pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Sub-ordem Eimeriorina e Família Eimeriidae (UPTON, 2000).

Em Passeriformes, relata-se que os protozoários de maior ocorrência são do gênero *Isospora* (FRIEND e FRANSON, 1999). O oocisto de *Isospora* spp. após a esporulação apresentam dois esporocistos contendo quatro esporozoítos em cada esporocisto (URQUHART et al., 1998; FORTES, 2004).

O gênero *Eimeria* quando esporulado caracteriza-se por ter um oocisto contendo quatro esporocistos com dois esporozoítos cada, num total de oito esporozoítos por oocisto (FORTES, 2004).

A identificação desses coccídios é feita, basicamente, através da observação das formas exógenas destes parasitos, que são os oocistos esporulados (DUSZYNSKI e WILBER, 1997; TENTER et al., 2002).

Duszynski e Wilber (1997) indicaram que sejam observadas as seguintes estruturas e características nos oocistos dos gêneros *Eimeria* e *Isospora*:

- ✓ Diâmetros maior e menor do oocisto e esporocisto, assim como seus respectivos índices morfométricos, que correspondem a razão entre os diâmetros maior sobre o menor;
- ✓ Textura (áspera ou lisa), projeções (cônicas ou espinhosas) e espessura aproximada das paredes dos oocistos;
- ✓ Presença ou ausência de micrópila, capuz polar, resíduo e grânulo polar no oocisto esporulado e, se presentes, seus tamanhos, local aproximado e descrição das estruturas encontradas;
- ✓ Presença ou ausência de esporopódios, membranas aderentes, suturas, resíduo (diâmetro e descrição) e corpos de stieda, substieda e parastieda no esporocisto;
- ✓ Presença ou ausência de corpo refrátil (quantidade, diâmetro e forma) e núcleo no esporozoíto.

A parede do oocisto é essencial na delimitação, proteção e resistência dos coccídios no meio exógeno, portanto, esta estrutura permite o desenvolvimento e infectividade do parasita (LEVINE, 1985; SOULSBY, 1987).

De acordo com os estudos ultra-estruturais de Belli et al. (2006), a morfologia básica da parede dos oocistos é comum a todos os coccídios, ou seja, todos os oocistos, de todas as espécies e gêneros, têm a mesma estrutura base. Segundo estes mesmos autores, esta estrutura é composta por uma membrana exterior e por uma parede contendo duas camadas, uma interna e outra externa. Logo após o desenvolvimento do oocisto, a membrana exterior é perdida por ser delicada e estar levemente aderida à parede, por isso, na maioria das vezes, esta está ausente nos oocistos isolados nas fezes, não sendo observada ao microscópio. A camada externa da parede do oocisto possui superfície áspera e aumenta em densidade conforme se aproxima da porção interna. A camada interna é mais densa e menos espessa do que a externa. Estas duas camadas podem ser visualizadas em microscópio óptico, entretanto, são dificilmente separadas.

A parede do oocisto é uma característica muito utilizada na diferenciação e identificação das espécies de *Eimeria*, pois muitos dos eimerídeos apresentam paredes distinguíveis, com espículas, rugas, micrópila, capuz polar e outras características. Em contrapartida, no gênero *Isospora* as paredes tendem a ser mais uniformes, e por isso, faz-se necessária à observação de outras características para que as espécies possam ser diferenciadas (CASAS et al., 1995).

Em função dos esporocistos de *Isospora* apresentarem corpos de stieda e substieda que seguem um padrão em cada espécie; esta característica é utilizada na diferenciação e identificação. No gênero *Eimeria* esta estrutura é menos comum (GRULET et al., 1982; BERTO et al., 2009a; 2009b; 2009c; 2009d).

3.2.2 Infecção

Coccidiose nas aves ocorre quando estas ingerem acidentalmente oocistos esporulados em seu ambiente (CONWAY e MCKENZIE, 1991). A duração da infecção pode variar, ser assintomática, com aparente harmonia entre o parasita e a ave, ou em formas insidiosas, com evolução lenta e sintomas discretos, e até na

forma aguda, com duração de quatro a 14 dias, caracterizada pelos sintomas clássicos de inflamação intestinal, desidratação e óbitos (MORAIS, 1998).

Sabe-se que baixos níveis de infecção podem exercer impacto econômico significativo sobre criações de frango de corte, através de uma série de mecanismos, reduzindo a eficiência metabólica e imunológica das aves (LILLEHOJ e LILLEHOJ, 2000).

3.2.3 Patogenia

As infecções por coccídios provocam uma modificação nas estruturas das vilosidades intestinais provocando o encurtamento na altura das mesmas, diminuindo a capacidade de absorção intestinal. Algumas vezes, pode ocorrer a destruição das células epiteliais do intestino, impedindo a renovação das vilosidades levando a perda de fluidos, hemorragias e significativo aumento da susceptibilidade a outras patologias (KAWAZOE, 2000).

Outro significativo dano causado por coccidioses em aves, em casos de espécies que acometem a região superior e mediana do intestino, é a diminuição da absorção de nutrientes como zinco, ácido oléico, metionina, histidina, cálcio, glicose e xantofila (LILLEHOJ e LILLEHOJ, 2000). A infecção por *Eimeria* spp. é autolimitante, em função do ciclo endógeno, a ave produz resposta imune, mas ela só será efetiva numa segunda infecção (KAWAZOE, 2000).

3.2.4 Sintomatologia

Os sinais clínicos da coccidiose variam conforme as espécies de coccídios envolvidos na infecção, algumas espécies patogênicas causam diarreia que pode variar de mucóide a sanguinolenta, desidratação em variados níveis, penas arrepiadas, anemias de graus variados, despigmentação da pele e prostração, dentre outros sinais clínicos (ALLEN e FETTERER, 2002).

3.2.5 Ciclo Biológico

O ciclo de vida dos coccídios envolve uma série de estágios no interior dos hospedeiros, gerando uma resposta imune bastante complexa que envolve tanto a imunidade mediada por células como a produção de anticorpos (ALLEN e FETTERER, 2002).

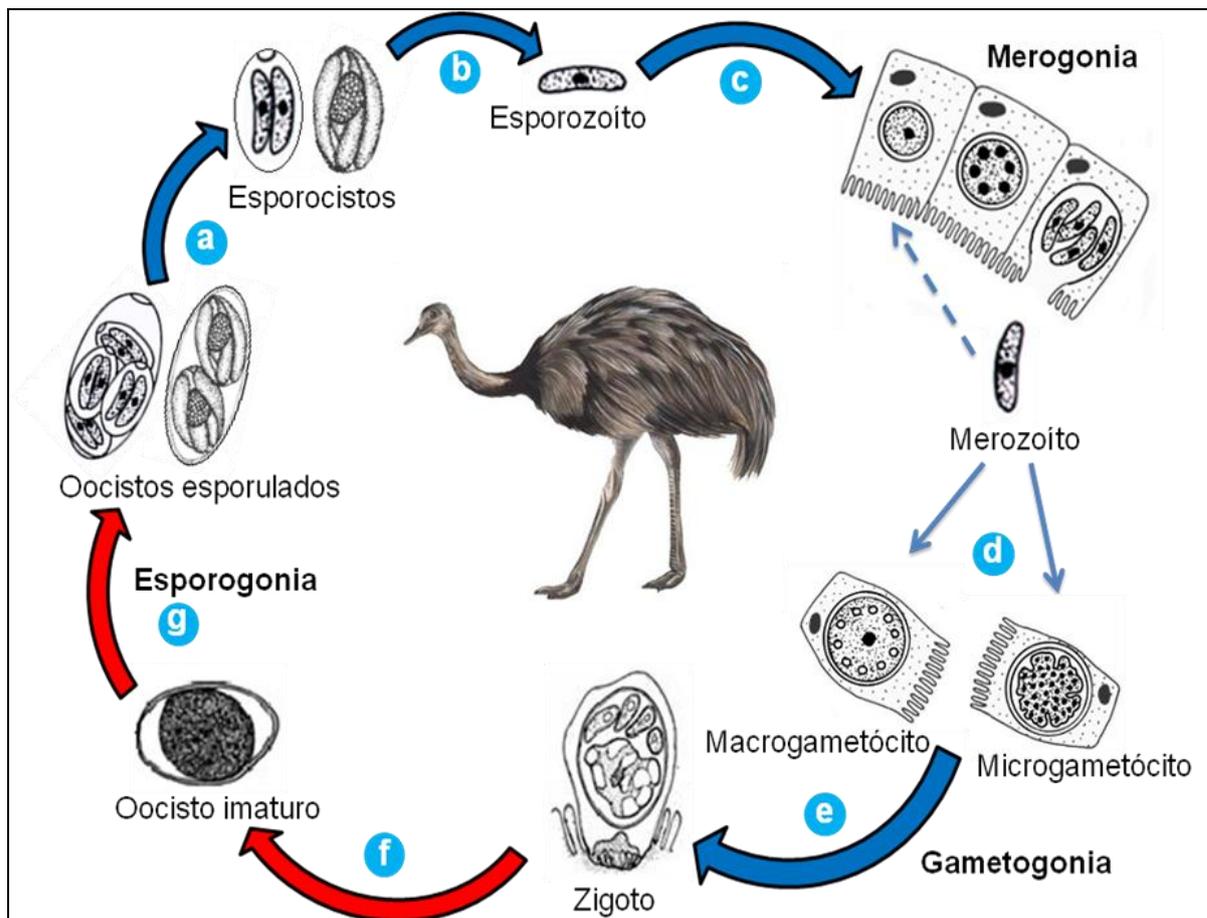


Figura 1. Ciclo biológico de *Isospora* spp. e *Eimeria* spp. A contaminação se dá pela ingestão de oocistos esporulados presentes na cama, alimentos ou água contaminada. Os oocistos tem sua parede rompida, liberando os esporocistos (a) que no estômago liberam seus esporozoítos (b) que invadem as células intestinais. O esporozoíto inicia o processo de reprodução assexuada chamada de esquizogonia ou merogonia (c), formando o esquizonte que é uma unidade repleta de merozoítos. Os merozoítos se diferenciam em macrogametócitos e microgametócitos (d). O macrogametócito é fecundado pelo microgametócito formando o zigoto (e) e finalizando a fase endógena a parede celular é formada, dando origem ao oocisto não esporulado ou imaturo (f) que posteriormente é liberado na luz intestinal e irá esporular no ambiente (g). Setas vermelhas – fase exógena. Setas azuis – fase endógena.

As aves infectam-se ao ingerir oocistos esporulados, presentes no ambiente, junto com cama, alimento ou água contaminada. Os oocistos têm sua parede rompida por meio da ação mecânica da moela, liberando os esporocistos (Figura 1; **a**) que após sofrerem ação da enzima tripsina quinase no estômago liberam seus esporozoítos (Figura 1; **b**) que invadem as células intestinais (ALLEN e FETTERER, 2002). Ocorre formação de um vacúolo parasitóforo ao redor do esporozoíto (SAM-YELLOWE, 1996). E dentro do vacúolo parasitóforo o esporozoíto inicia o processo de reprodução assexuada chamada de esquizogonia ou merogonia (Figura 1; **c**), formando o esquizonte que é uma unidade repleta de merozoítos (DANFORTH, 1999; DUSZYNSKI, 2001).

A fase sexuada ou gamogonia tem início ao final da fase assexuada quando a última geração de esquizontes penetra em novos enterócitos diferenciando-se em macrogametócitos (gametas femininos) e microgametócitos (gametas masculinos) (Figura 1; **d**), posteriormente o macrogametócito é fecundado pelo microgametócito, formando o zigoto (Figura 1; **e**) e finalizando a fase endógena a parede celular é formada, dando origem ao oocisto não esporulado ou imaturo (Figura 1; **f**) que posteriormente é liberado na luz intestinal (ALLEN e FETTERER, 2002).

A fase externa, também chamada de esporogonia (Figura 1; **g**) ocorre mediante algumas condições determinantes de temperatura, umidade e oxigênio e uma nova infecção depende da especificidade, ou seja, alguns oocistos parasitam apenas uma espécie de hospedeiro, todavia, várias espécies de coccídios podem estar envolvidas, direta ou indiretamente em um quadro de coccidiose (KAWAZOE, 2000).

3.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da doença pode ser feito ao nível de campo e laboratorialmente sendo o mesmo, baseado nos achados macroscópicos e confirmado microscopicamente em análises fecais (KAWAZOE, 2000). Também pode ser feito a técnica de centrífugo-flutuação com solução saturada de sacarose para investigação de oocistos nas fezes (GALHA et al., 2010). Em uma avicultura, deve-se selecionar ao acaso um grupo de animais do lote, os quais serão eutanasiados e submetidos à necropsia (KAWAZOE, 2000).

A seleção não deve se limitar a animais doentes e debilitados, assim como não se deve necropsiar animais já mortos, pois as alterações morfológicas do *post-mortem* nos intestinos dificultarão o diagnóstico (ALLEN e FETTERER, 2002).

Pode-se fazer também um exame direto do conteúdo intestinal por meio de um raspado de mucosa e observação ao microscópio procurando os oocistos não esporulados (imaturos) indicando infecção, embora isto não signifique a presença de doença clínica (LILLEHOJ e LILLEHOJ, 2000).

3.2.7 Profilaxia, Controle e Tratamento

A prevenção baseia-se nas principais causas de surtos de coccidiose, que estão relacionadas às falhas e dificuldades no sistema de desinfecção. Não há definições específicas relacionadas a tratamentos eficazes para as coccidioses, o que é observado são indicações medicamentosas, a maioria de caráter profilático, obtendo algumas vezes sucesso terapêutico (MUNHOZ et al., 2009).

A prevenção e o tratamento da coccidiose aviária são realizados por meio da adição de drogas anticoccídicas (nicarbazina e salinomicina) à ração fornecida aos animais (CONWAY e MCKENZIE, 1991; WILLIAMS, 1992; ROJAS et al., 1994).

A ocorrência, em proporções mundiais, de resistência às drogas anticoccídicas nas aves é considerada um problema de grande importância, acentuando, portanto, a necessidade de investigação dos mecanismos básicos dos anticoccídicos, bem como suas interações com seus respectivos hospedeiros (BEDRNIK et al., 1989).

Para a obtenção de prevenção e controle satisfatórios faz-se necessária a união de variados métodos profiláticos ao sistema integrado de manejo. Desta forma, desinfecção e limpeza isoladamente, não são suficientes para o controle. Para tal, é necessário lançar mão do uso de anticoccidianos nas rações ou usar vacinas existentes no mercado, em função de que os oocistos de *Eimeria* spp. permanecem viáveis por mais de um ano no ambiente em condições ideais de temperatura e umidade (ALLEN e FETTERER, 2002).

Estão disponíveis no mercado dois tipos de vacina contra a coccidiose, a vacina atenuada e a virulenta. As vacinas vivas atenuadas contra coccidiose oferecem uma vantagem significativa em termos de segurança em relação às

vacinas vivas virulentas, estas vacinas atenuadas, consideradas de segunda geração, possuem um mercado crescente desde o seu lançamento, porém o seu consumo é inferior ao da vacina de primeira geração (LILLEHOJ e LILLEHOJ, 2000).

A adoção do uso de vacinas vivas ainda está em uma escala relativamente pequena principalmente para frangos de corte. A tendência é que o impacto econômico, os benefícios produtivos, as limitações da vacinação e as estratégias de controle sejam melhorados ao longo do desenvolvimento técnico-científico (ALLEN e FETTERER, 2002).

3.3 O GÊNERO *Cryptosporidium*

Cryptosporidium é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Ordem Eucoccidiorida, Família Cryptosporidiidae e Gênero *Cryptosporidium* (FAYER, 2007).

Há muito tempo pensa-se que os membros do gênero *Cryptosporidium* no filo Apicomplexa estão intimamente relacionados com os coccídios. Entretanto, apesar de fortes similaridades morfológicas e biológicas com esses organismos, alguns autores acreditam que *Cryptosporidium* spp. possui diferenças notáveis com eles, e semelhança com os protozoários gregarinas. Com base na análise filogenética de dados moleculares, alguns autores alteram o táxon do *Cryptosporidium* spp. na base do filo Apicomplexa, outros consideram espécies desse gênero filogeneticamente muito distantes dos coccídios e não os inclui nesse grupo de protozoário, e outros pensam que *Cryptosporidium* spp. está intimamente relacionado a gregarinas. A taxonomia desse gênero e a nomenclatura das espécies estão passando por rápidas mudanças devido a novas e crescentes informações moleculares. A caracterização molecular de oocistos usando procedimentos baseados na PCR não só tem um grande impacto para resolver a taxonomia de *Cryptosporidium* spp. em nível de espécies, mas também sobre a epidemiologia molecular da criptosporidiose. A aplicação de técnicas moleculares para taxonomia e epidemiologia está ajudando a caracterizar novas e já existentes espécies e determinar as origens dos parasitas que irão facilitar a identificação de fontes de água contaminada com *Cryptosporidium* spp. (CHACÍN-BONILLA, 2007).

A infecção por *Cryptosporidium* spp. em aves foi descrita pela primeira vez por Tyzzer em 1929, no epitélio cecal de frangos jovens. Três espécies significativas de *Cryptosporidium* spp. que infectam aves são: *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Cryptosporidium galli* (SLAVIN, 1955; CURRENT et al., 1986; RYAN et al., 2003a). Há também muitos genótipos de *Cryptosporidium* spp. descritos em aves, incluindo genótipos aviários I a IV (identificado em muitas espécies de aves), o genótipo do pato preto, *Anas rubripes*, o genótipo da galinhola Euro-asiática, *Scolopax rusticola*, e genótipos I a IV de ganso, *Branta canadensis* (MORGAN et al., 2001; RYAN et al., 2003b; JELLISON et al., 2004; ZHOU et al., 2004; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006).

3.3.1 Morfologia de *Cryptosporidium* spp.

A forma infectante de *Cryptosporidium* spp., o oocisto esporulado, possui uma variação entre 3,3 a 8,4 μm de diâmetro e uma parede dupla com cerca de 49 nm de espessura (HARRIS e PETRY, 1999). Possui quatro esporozoítos no seu interior, sem a presença de esporocisto (TYZZER, 1907). Existem dois tipos de oocistos: os de parede espessa (80%) e os de parede delgada (20%) (AKIYOSHI et al., 2003).

Em torno de um dos pólos é observada uma sutura, similar à observada na parede do oocisto de *Sarcocystis* spp. e *Toxoplasma* spp. Esta sutura, que é sensível à tripsina e aos sais biliares, vai se romper durante o processo de desencistamento e é por onde os esporozoítos serão liberados de seu interior (SMITH et al., 2005). Além dos esporozoítos, são encontrados também o corpo residual, que contém um grande corpo lipídeo, muitos grânulos de amilopectinas, inclusões de proteínas cristalinas e ribossomos (HARRIS et al., 2004).

Os esporozoítos são similares aos encontrados em outros coccídios, possuem um formato de vírgula com duas extremidades claramente distintas, nas quais a apical é estreita e a posterior é arredondada (TYZZER, 1912). Em seu interior, são encontradas organelas típicas do filo ao qual pertencem. Os microtúbulos se originam no colar apical e têm fundamental importância no desencistamento e no ancoramento e invasão da célula alvo, no caso os enterócitos. O complexo apical consiste nos anéis polares, os conóides, roptrias, micronemas e grânulos densos (SMITH et al., 2005). Possuem um único núcleo em sua porção

posterior, onde também se localizam o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático, os grânulos de amilopectina, os ribossomos e os corpos cristalóides, cuja origem ou função não são completamente conhecidos (TETLEY et al., 1998).

3.3.2 Infecção e Patogenicidade

Os oocistos podem ser transmitidos entre hospedeiros suscetíveis por meio do contato fecal-oral ou ingestão de água e alimentos contaminados por formas esporuladas do agente (FAYER et al., 2000).

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais de emas ratifica que estes animais são hospedeiros e podem contribuir, juntamente com os oocistos encontrados na água, para a disseminação e contaminação ambiental (LUDWIG e MARQUES, 2008).

Cryptosporidium spp. é considerado um importante protozoário de infecção em aves com sinais clínicos relacionados principalmente ao trato digestivo ou respiratório (GOODWIN, 1989; SRÉTER e VARGA, 2000). *Cryptosporidium parvum* infecta células do epitélio intestinal em aves, já *C. baileyi* infecta o trato respiratório, bursa cloacal (bursa de Fabricius) e a cloaca da galinha doméstica, *Gallus gallus domesticus*, e outras espécies de aves (SRÉTER e VARGA, 2000). *Cryptosporidium meleagridis* é um parasita das células epiteliais intestinais em perus, *Meleagris gallopavo*, e outras aves (SLAVIN, 1955; MORGAN et al., 2000). O significado clínico da infecção de *C. galli* em aves ainda não é totalmente elucidado, embora ele se replique no proventrículo (RYAN et al., 2003a) ao longo do desenvolvimento de infecções crônicas (ANTUNES et al., 2008). As infecções por *Cryptosporidium* spp. em avestruzes são aparentemente subclínicas, sendo, muitas vezes, associadas ao prolapso do falo e cloaca (BEZUIDENHOUT et al., 1993; PENRITH e BURGER, 1993; PENRITH et al., 1994), enterite (HUCHZERMEYER, 1999) e necrose pancreática (JARDINE e VERWOERD, 1997).

Infecções por *Cryptosporidium* spp. já foram detectadas em mais de 30 espécies de aves de diferentes Ordens (O'DONOGHUE, 1995; FAYER et al., 1997). Em Ratitas, o gênero *Cryptosporidium* não teve ainda sua biologia e patogenicidade elucidadas (GAJADHAR, 1993; PONCE GORDO et al., 2002).

A duração da infecção e a patogenicidade da criptosporidiose são intimamente ligados à condição imunológica do hospedeiro, variando de uma diarreia severa, mas auto-limitada, nos indivíduos imunocompetentes, até uma prolongada infecção sem tratamento, nos pacientes com comprometimento imunológico (ABRAHAMSEN et al., 2004).

3.3.3 Sintomatologia

Criptosporidiose em aves manifesta-se principalmente em duas formas clínicas - doença respiratória e intestinal (LINDSAY e BLAGBURN, 1990). Porém *Cryptosporidium* spp. também já foi encontrado no trato urinário de frangos e tentilhões (LEY, 1987; GOODWIN e DAVIS, 1993; PATTON, 1993; GREINER e RITCHIE, 1994).

Sinais da doença no trato urinário ocorrem nas espécies onde as células epiteliais renais estão infectadas (LEY, 1987; PATTON, 1993; GREINER e RITCHIE, 1994).

Doença respiratória causada por *C. baileyi* tem sido relatada em galinhas, perus, patos, faisões, codornas, gaivotas e algumas espécies de aves de estimação (LINDSAY e BLAGBURN, 1990; GOODWIN e DAVIS, 1993; FAYER et al., 1997). Aves de corte inoculadas com *C. baileyi* pela via intratraqueal demonstraram sinais clínicos caracterizados por espirros e ronqueira (MEIRELES et al., 1998).

Parece haver duas manifestações diferentes de doenças respiratórias em aves: um envolvimento do trato respiratório superior, que incluiu sinusite ("cabeça inchada"), e um comprometimento respiratório inferior que incluiu a colonização da traquéia, brônquios, alvéolos e pulmões. A forma respiratória inferior da doença causa aumento da mortalidade, depressão, letargia, anorexia, baixa desempenho, tosse, espirros, dispnéia e conjuntivite (DHILLON et al., 1981; RANDALL, 1982; THAM et al., 1982; ITAKURA et al., 1984; TARWID et al., 1985; WHITTINGTON e WILSON, 1985; CURRENT et al., 1986; GOODWIN e BROWN, 1988a,b; FERNANDEZ et al., 1990; GOODWIN et al., 1996).

Na doença gastrintestinal *Cryptosporidium* spp. pode invadir glândulas salivares e esôfago, proventrículo, intestino delgado, ceco, cólon, cloaca e bursa cloacal em aves. A doença clínica tem sido relatada em perus, codornas, pombos,

gaiivotas e aves de companhia (LINDSAY e BLAGBURN, 1990; FAYER et al., 1997). Letargia, diminuição do ganho de peso corporal, baixa pigmentação e diarreia são os sinais clínicos mais comuns (RANDALL, 1982; THAM et al., 1982; ITAKURA et al., 1984; CURRENT et al., 1986; RITTER et al., 1986; GORHAM et al., 1987; GOODWIN, 1988; GOODWIN e BROWN, 1988a,b).

3.3.4 Ciclo Biológico

A fase endógena do ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. se inicia após a ingestão do oocisto por um hospedeiro susceptível e, uma vez no interior do organismo deste, os quatro esporozoítos vão se desencistar através da sutura do oocisto, como descrito anteriormente e demonstrado a seguir (SMITH et al., 2005) (Figura 2; **a**, **b**).

Após o desencistamento, os esporozoítos vão se aproximar da superfície da célula do hospedeiro e iniciam o processo de infecção de forma ativa (WETZEL et al., 2005). Os esporozoítos ligados à membrana, inicialmente em formato de vírgula, vão se tornando ovais ou esféricos e é observada a formação de vacúolos que se agrupam e circundam o parasito, formando o vacúolo pré-parasitóforo. Este se funde com a membrana da célula do hospedeiro, formando uma interface hospedeiro-parasito (HUANG et al., 2004). A membrana celular circunda este vacúolo, dando origem ao vacúolo parasitóforo (UMEMIYA et al., 2005). Importante ressaltar que este vacúolo não está em contato direto com o citoplasma da célula; dessa forma ele é intracelular e extracitoplasmático. Durante este processo de infecção, que em cultura celular transcorre em cerca de 15 minutos (LUMB et al., 1988), o esporozoíto vai se tornando esférico e passa a ser chamado de trofozoíto (Figura 2; **c**).

Os trofozoítos vão entrar em processo de multiplicação assexua, também chamado de esquizogonia, a partir da divisão nuclear, originando merontes do Tipo I com seis a oito merozoítos em seu interior (Figura 2; **d**, **e**). Estes merozoítos vão infectar novas células adjacentes e vão se desenvolver em novos merontes do Tipo I, ou em merontes do Tipo II (Figura 2; **f**), que por sua vez possuem apenas quatro merozoítos (SMITH et al., 2005).

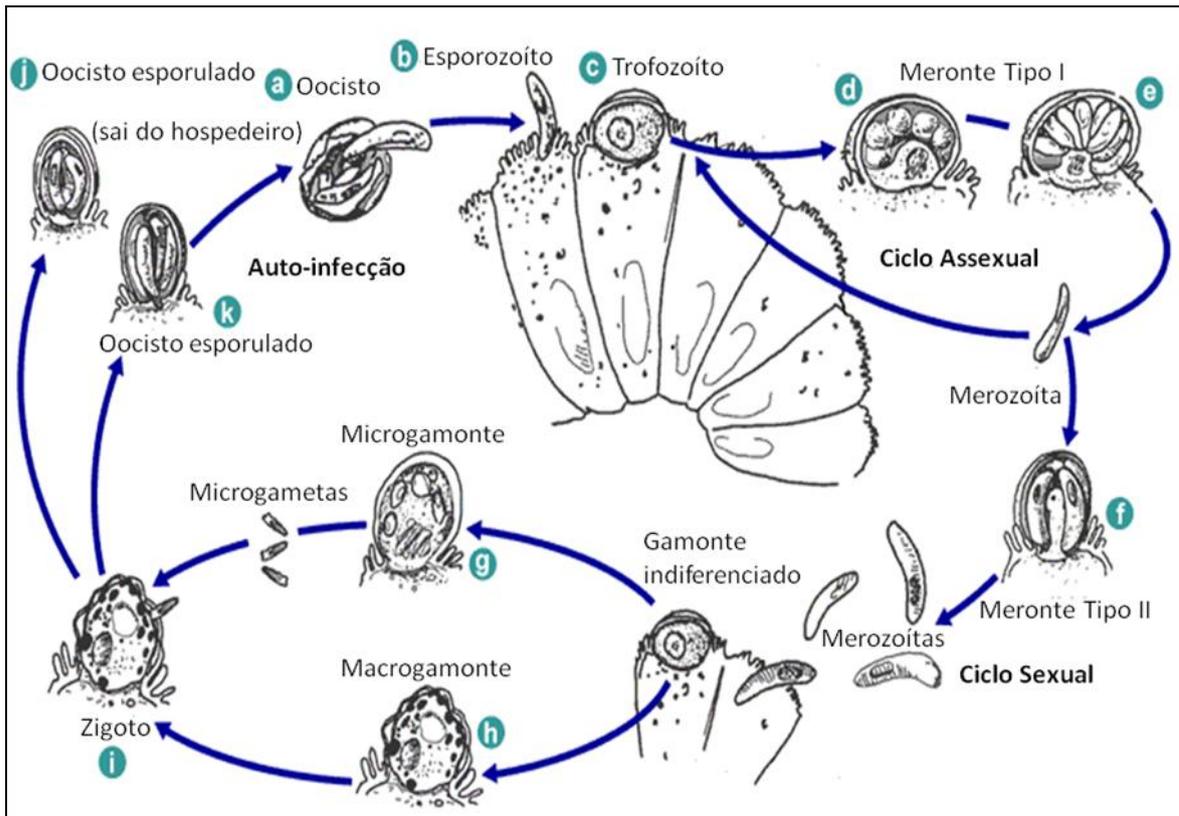


Figura 2. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. Após a contaminação de um hospedeiro adequado, ocorre excitação (a). Os esporozoítos são liberados e parasitam as células epiteliais (b) do trato gastrointestinal ou de outros tecidos, tais como o trato respiratório. Os esporozoítos vão se tornando esféricos e passam a ser chamados de trofozoítos (c). Nessas células, os parasitas sofrem multiplicação assexuada (esquizogonia ou merogonia) (d, e) e depois a multiplicação sexual (gametogonia) (f) produzindo microgamontes (g) e macrogamontes (h). Após a fertilização dos macrogamontes pelos microgamontes (i), dois tipos diferentes de oocistos são produzidos: o de parede espessa (j), que é comumente excretado a partir do hospedeiro, e o oocisto de parede fina (k), que é principalmente envolvido na auto-infecção. Os oocistos são infectivos na excreção, permitindo assim transmissão direta (CDC modificado, 2012).

Os merozoítos formados a partir dos merontes do Tipo II iniciarão o estágio de reprodução sexual, ou gametogonia, ao infectar novas células hospedeiras, nas quais vão se diferenciar em microgamontes e macrogamontes (TYZZER, 1910). Os microgamontes (Figura 2; g) se tornam multinucleados e cada núcleo é incorporado a um microgameta (gameta masculino). Os macrogamontes (gameta feminino) continuam uninucleados (Figura 2; h). Os microgametas liberados precisam se ligar e penetrar em um macrogametócito para dar início ao processo de fertilização (Figura 2; i) (TYZZER, 1910). Após a fecundação, o zigoto sofre meiose e dá origem

ao oocisto esporulado, o qual é eliminado para o exterior nas fezes do hospedeiro (FAYER et al., 1997). O oocisto esporulado é a única forma exógena e já se torna infectante ao ser eliminado (OKHUYSEN et al., 1999).

Os oocistos poderão ter parede espessa, que são eliminados para o meio externo juntamente com as fezes do hospedeiro reiniciando a fase exógena do ciclo (Figura 2; j), ou de parede delgada, que podem romper-se no próprio intestino do hospedeiro, causando uma auto-infecção (Figura 2; k) (FAYER et al., 2000; TYZZER, 1910). Dessa forma, em pacientes imunossuprimidos, nos quais o sistema imunológico não tem mecanismos para combater a doença, o parasitismo pode permanecer por um longo período de tempo sem que o indivíduo precise ser exposto novamente a um oocisto (de GRAAF et al., 1999). Os oocistos formados no trato respiratório vão ser eliminados através da respiração ou nas secreções nasais (RYAN e XIAO, 2007).

O ciclo biológico completa-se geralmente entre 12 e 14 horas e pode variar de acordo com o hospedeiro e a espécie de *Cryptosporidium* (FAYER et al., 1997). O período pré-patente é de 7 a 10 dias, podendo variar de 5 a 28 dias (PEREIRA et al., 2009).

3.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico da criptosporidiose é realizado rotineiramente por meio de exame coprológico (YODER e BEACH, 2010). A princípio, utilizavam-se apenas técnicas de microscopia, nas quais eram realizados esfregaços diretos com coloração de Ziehl Nielsen (SMITH e NICHOLS, 2010). Com o avanço dos métodos de diagnóstico, as amostras eram submetidas a técnicas de concentração de oocistos com soluções hiper concentradas, com a finalidade de aumentar a sensibilidade de detecção. Posteriormente, técnicas de IFAT se tornaram o método de eleição e eram mais sensíveis que os métodos tradicionais, além de facilitar a visualização do oocisto (QUÍLEZ et al., 1996). Entretanto, a execução dos métodos baseados em microscopia necessita de treinamento, são tediosos e têm sensibilidade geralmente baixa (SANTÍN et al., 2004). Além disso, a identificação da espécie se torna mais difícil devido ao reduzido tamanho e morfologia dos oocistos,

além da grande semelhança morfométrica entre oocistos de espécies diferentes (SUNNOTEL et al., 2006).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos tais como ELISA e Western Blot, além de não possibilitarem a identificação das espécies envolvidas na infecção, indicam apenas exposições passadas. O teste de ELISA em amostras fecais também pode ser utilizado para identificar infecções correntes sem, no entanto, realizar a identificação da espécie (SANTÍN et al., 2007).

Apesar de restritos a laboratórios especializados, os atuais métodos de diagnóstico baseados em técnicas moleculares tais como nested PCR, Multiplex PCR, PCR-RFLP e sequenciamento de DNA são altamente sensíveis, apresentando resultados de alta confiabilidade (SANTÍN et al., 2004; SMITH, 2007). São capazes de detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras em que normalmente seriam perdidos pelos métodos tradicionais de microscopia (SCORZA et al., 2003; McGLADE et al., 2003; SANTÍN et al., 2004).

3.3.6 Profilaxia, Controle e Tratamento

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são altamente resistentes as intempéries naturais e a muitos desinfetantes sintéticos e, portanto, são de difícil eliminação ambiental (YODER e BEACH, 2010). A prevenção deve ser realizada com base no conhecimento da biologia, do ciclo biológico e dos métodos de transmissão da criptosporidiose. Os animais sabidamente infectados devem ser mantidos em locais afastados dos demais, e estas instalações devem ser de fácil desinfecção; os fômites utilizados no manejo destes animais devem ser completamente higienizados ou até mesmo descartados; os tratadores destes animais devem ter bons hábitos de higiene e utilizar roupas que possam ser limpas de forma regular; e cuidados no fornecimento de comida e de água limpas são de fundamental importância, uma vez que a transmissão pela via alimentar ou hídrica é considerada como uma das principais na transmissão da criptosporidiose (CHALMERS e DAVIES, 2010). O acesso de animais selvagens ou de roedores no alojamento dos animais deve ser restringido e mamíferos neonatais devem receber quantidade adequada de colostro o mais cedo e nos primeiros dias de vida (YODER e BEACH, 2010).

O tratamento deverá ser de suporte, tanto em humanos quanto em animais, com reidratação e reposição de eletrólitos oral ou parenteral, além de administração de antidiarréicos. Esta reidratação é ainda mais importante em pacientes jovens ou imunodeprimidos. Em casos de doenças concomitantes, o tratamento específico da doença também deve ser realizado (CHALMERS e DAVIES, 2010).

Atualmente ainda não existem drogas completamente efetivas para o tratamento da criptosporidiose nem em humanos nem em animais (CHALMERS e DAVIES, 2010). Um dos objetivos atuais no tratamento da criptosporidiose é identificar alvos moleculares que possam ser explorados para o combate às infecções. O mapeamento do genoma de *C. parvum* revelou que existe uma grande divergência bioquímica evolucionária entre o gênero *Cryptosporidium* quando comparado aos outros apicomplexas. Muitos alvos de drogas encontrados nestes outros organismos, não são observados em *Cryptosporidium* spp., tais como o ciclo do manitol, ODC e HXGPRT, o que ajuda a explicar o porquê destes parasitos serem insensíveis a várias drogas efetivas contra outros coccídios (RYAN e XIAO, 2007).

3.4 O GÊNERO *Giardia*

Giardia spp. é um protozoário entérico que afeta humanos, animais domésticos e silvestres (THOMPSON et al., 2000). Pertencem ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida, Subordem Diplomonadina, Família Hexamitidae (RIVERA et al., 2002).

O gênero *Giardia* foi descrito por Kunstler em 1882, ao observar um flagelado presente no intestino de girinos de anfíbios anuros. Este gênero é constituído por protozoários cosmopolitas que ocorrem principalmente em regiões tropicais, mas pode ser encontrado em temperaturas variadas (SOGAYAR e GUIMARÃES, 2000).

As espécies de *Giardia* isoladas de mamíferos apresentam aspectos morfológicos e propriedades antigênicas, genéticas e bioquímicas similares (LEIB e ZAJAC, 1999).

Existem evidências de que *Giardia duodenalis* (sinóníma *G. lamblia*, *G. intestinalis*) não apresenta especificidade quanto ao hospedeiro e pode parasitar

seres humanos, assim como uma variedade de outros animais, sendo considerada uma importante zoonose (SOGAYAR e GUIMARÃES, 2000).

Animais menores de um ano de idade são mais susceptíveis do que os adultos o que sugere o desenvolvimento de certo grau de resistência com o aumento da idade (KIRKPATRICK e FARREL, 1984).

3.4.1 Morfologia de *Giardia* spp.

O ciclo de vida consiste em dois estágios: trofozoítos e cistos viáveis, os quais contaminam alimentos e água (BECK et al., 2005).

O trofozoíto possui motilidade sendo um organismo bilateralmente simétrico, piriforme, tendo aproximadamente 10 x 15 µm, encontrado principalmente nas fezes diarreicas (ETTINGER e FELDMAN, 1997). Apresenta uma região dorsal convexa e dois axostilos centrais. Sua região ventral é côncava possuindo um grande disco de sucção, sendo o órgão mais importante para a aderência com a mucosa intestinal do hospedeiro (RIVERA et al., 2002).

O cisto tem uma forma oval ou arredondada, mede 10 x 8 µm (15 x 5 µm) e possui de dois a quatro núcleos. O citoplasma contém axonemas flagelares, vacúolos, ribossomos e fragmentos do disco ventral (RIVERA et al., 2002).

O cisto viável ingerido é a forma infectante sendo capaz de sobreviver em ambiente externo adequado por longos períodos. Os trofozoítos, formas que causam a doença, apenas aderem ao epitélio do enterócito, não apresentando capacidade invasora ou destrutiva direta (MOTTA e da SILVA, 2002).

3.4.2 Infecção e Patogenicidade

Os cistos podem ser ingeridos através da água e de alimentos contaminados, mas a transmissão direta também é possível, especialmente em áreas em que os animais se encontram aglomerados (LEIB e ZAJAC, 1999).

O período de incubação da giardíase intestinal é de uma a três semanas. A duração do período de incubação está relacionada com o tamanho do inóculo. A

infecção pode iniciar após a ingestão de um só cisto. A fase aguda dura três ou quatro dias (RIVERA et al., 2002).

Os mecanismos pelos quais os enteropatógenos produzem diarreia são diversos, mas pode-se dividi-los entre os que promovem resposta inflamatória sem causar dano morfológico e os que alteram a estrutura da mucosa intestinal, com ou sem invasão tecidual. A magnitude e o significado funcional dessas respostas locais são, geralmente, relacionadas ao número de parasitos: as infecções causadas por poucos parasitas são comumente assintomáticas, enquanto grande carga parasitária causa manifestações intestinais que podem incluir a diarreia (MOTTA e da SILVA, 2002).

As espécies de *Giardia* causam alterações na ultraestrutura das vilosidades intestinais, com encurtamento dos microvilos, esfoliação acelerada e diferenciação incompleta dos enterócitos com redução de aproximadamente 50% da área de superfície de absorção (GENNARI e SOUZA, 2002). Em condições *in vitro*, isolados de trofozoítos de *Giardia* spp., oriundos de pacientes sintomáticos ou assintomáticos, prejudicam o epitélio em cultivo celular principalmente por depleção de suas vilosidades. Com isso a digestão e absorção de nutrientes e água ficam prejudicadas, ocorrendo decréscimo no tempo de trânsito, devido a um aumento da motilidade intestinal. Ocorre então a síndrome da má-absorção e digestão (CHÁVEZ et al., 1995). Um dos mecanismos mais aceitos para explicar a diarreia e má-absorção são as alterações funcionais e morfológicas da mucosa, provavelmente ocasionadas pelo processo inflamatório induzido pelo parasita, devido à reação imune do hospedeiro (SOGAYAR, 2001). *Giardia* spp. contém várias proteases, algumas delas capazes de agir sobre as glicoproteínas da superfície das células epiteliais e romper a integridade da membrana. A normalidade da mucosa se restabelece com a erradicação dos parasitas (SOGAYAR e GUIMARÃES, 2000).

3.4.3 Sintomatologia

Dos protozoários que frequentemente acometem os animais e o homem, a *Giardia* spp. tem despertado maior interesse dos pesquisadores, possivelmente por seu potencial como agente de zoonose, além de causar, em animais jovens, diarreia

intermitente com comprometimento da digestão e absorção de alimentos, acarretando desidratação, perda de peso e morte (MUNDIM et al., 2003).

A infecção por *Giardia lamblia* pode causar doença clínica moderada a severa ou permanecer assintomática (BECK et al., 2005). Em alguns casos pode causar diarreias disenteriformes, duodenites, jejunites, podendo colonizar a vesícula biliar, não sendo ainda relacionada diretamente nos quadros de colecistites. (RIVERA et al., 2002).

Comumente as fezes são pálidas, com odores fétidos e moles. Dificilmente apresenta-se na forma aquosa ou hemorrágica. Raramente é encontrado febre e outros sinais sistêmicos. Ocasionalmente, os animais são apresentados com sinais indicativos de afecção do intestino grosso (ETTINGER e FELDMAN, 1997).

De acordo com Rivera et al. (2002) as fezes podem se apresentar também pastosas ou líquidas, amareladas, espumosas, mucosas, fétidas, e a diarreia pode ser, permanente ou intermitente. Em certos casos observa-se intolerância à lactose com amostras de fezes contendo leite.

O início dos sintomas pode preceder a excreção de cistos nas fezes por mais de uma semana (JOKIPII, A.M. e JOKIPII, L., 1977) e a infecção pode desaparecer espontaneamente dentro de seis semanas, ou persistir por vários meses (RENDTORFF, 1954; SAGI et al., 1983; PICKERIING et al., 1984).

A influência de fatores como a cepa do parasita, a duração da infecção, a dieta ou imunidade, pode ser importante para explicar a diversidade de sintomas associados à infecção (BECK et al., 2005).

3.4.4 Ciclo biológico

A infecção ocorre ao ingerir os cistos (Figura 3; **a**). A dose infectante oscila de 1 a 10 cistos. No intestino delgado ocorre o desencistamento, o qual se inicia no estômago (pH 2) e termina no duodeno e jejuno com a influência das secreções pancreáticas (RIVERA et al., 2002).

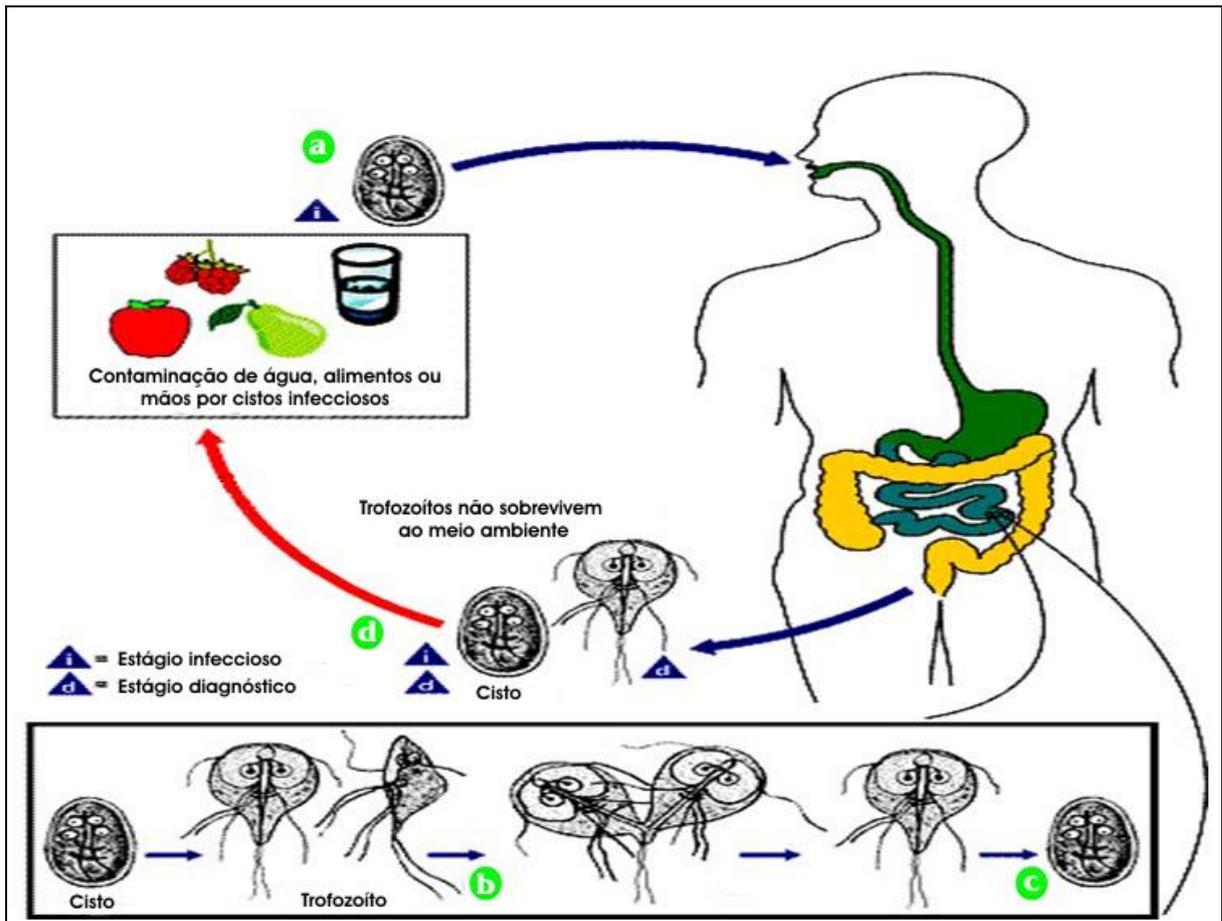


Figura 3. Ciclo biológico de *Giardia* spp. Cistos são formas resistentes e são responsáveis pela transmissão da giardíase. Os cistos são resistentes e podem sobreviver vários meses na água fria. A infecção ocorre pela ingestão de cistos em água contaminada, alimentos ou por via fecal-oral (mãos ou fômites) (a). No intestino delgado, a excitação libera os trofozoítos (cada cisto produz dois trofozoítos) (b). Trofozoítos se multiplicam por fissão binária longitudinal, mantendo-se no lúmen do intestino delgado proximal, onde eles podem ser livres ou ligados à mucosa por um disco de sucção ventral. Encistação ocorre com o trânsito dos parasitas para o cólon (c). Tanto cistos como trofozoítos podem ser encontrados nas fezes (d) (CDC modificado, 2012).

De cada cisto são produzidos dois trofozoítos (Figura 3; b), os quais vivem nas vilosidades intestinais, colonizando o duodeno e jejuno. Os trofozoítos se reproduzem de imediato por fissão binária até alcançar um enorme número. O trofozoíto se adere nas células cilíndricas das vilosidades intestinais mediante uma depressão circular que tem sua superfície ventral e que atua como uma ventosa. O encistamento (Figura 3; c) ocorre na luz do intestino delgado, produzindo-se um cisto tetranucleado que representa a forma infectante. Os cistos tetranucleados são

eliminados ao meio ambiente pelas fezes (Figura 3; **d**) e podem sobreviver durante longos períodos de tempo, sendo pouco resistente à dessecação ao calor e resistentes aos métodos habituais de tratamento da água, ainda que sejam eliminados mediante a ebulição e filtração (RIVERA et al., 2002).

3.4.5 Diagnóstico

O método tradicional de diagnóstico é a pesquisa de cistos e trofozoítos, sendo que as fezes, após a coleta, devem ser examinadas imediatamente a fresco e coradas pelo iodo. Quando se utiliza um método de preservação como álcool polivinil, as fezes são coradas pelo tricrômio ou pela hematoxilina e os cistos podem ser detectados. O exame seriado das fezes é necessário e aumenta a sensibilidade do método. Uma única amostra de fezes pode detectar cerca de 70% dos casos, aumentando para 85% quando três amostras distintas são analisadas. A excreção de cistos é variável a cada dia, sendo por isso importante que fezes coletadas em dias diferentes sejam examinadas. Para detectar trofozoítos, é preciso examinar fezes aquosas logo após a sua eliminação (MOTTA e da SILVA, 2002).

Apesar de existir uma tendência nos últimos anos à aplicação de técnicas de imunodiagnóstico, como a detecção de antígenos em fezes por meio de imunoenensaio enzimático (OLIVA et al., 1987; BAUMAN e GOTTSTEIN, 1987; MERINO et al., 1990), estas são mais aplicáveis na investigação e não na prática diária de diagnóstico nos laboratórios clínicos, pois a relação custo-benefício não justifica seu emprego (NÚÑEZ et al., 1997). Além do mais, as técnicas de diagnóstico coparassitológico são as mais utilizadas em programas de controle do parasitismo intestinal por seu baixo custo, simplicidade e sensibilidade (NÚÑEZ et al., 1997).

Outros métodos de diagnóstico de *Giardia* são: exame dos aspirados duodenais, biópsia intestinal e PCR (ETTINGER e FELDMAN, 1997; RIVERA et al., 2002).

3.4.6 Profilaxia, controle e tratamento

A imediata remoção das fezes do ambiente de animais infectados e confinados em locais aglomerados, a limpeza com desinfetantes ou água sanitária diluída, e a não utilização dos caminhos e outras áreas geralmente utilizadas pelos animais até que estejam completamente secas, são medidas que podem ser tomadas, para a inibição da transmissão dos cistos de *Giardia*. Os animais recém-ingressados numa colônia devem ser examinados para este parasito (ETTINGER e FELDMAN, 1997).

A giardíase pode ser evitada com o tratamento adequado de água e comida e com boa higiene pessoal nas comunidades. Em regiões endêmicas, alimentos não cozidos que são preparados ou lavados com água contaminada devem ser evitados. O abastecimento público de água deve ser submetido à cloração, floculação, sedimentação e filtração (JAKUBOWSKI, 1988). *Giardia* e *Cryptosporidium* são relativamente resistentes ao tratamento com cloro ou iodo (HUANG e WHITE, 2006).

O tratamento farmacológico da giardíase com nitroimidazóis como o metronidazol, o tinidazol, secnidazol e o ornidazol em suas formas reduzidas provocam a modificação na estrutura helicoidal do DNA do parasito havendo perda de suas funções. Outros fármacos utilizados são a paromomicina e a furazolidona. Drogas como a cloroquina e a quinacrina se encontram hoje em dia em desuso (RIVERA et al., 2002).

3.5 O GÊNERO *Entamoeba*

A amebíase é uma infecção cosmopolita, com distribuição mundial, principalmente em países subdesenvolvidos de clima quentes, tropicais e subtropicais, onde o saneamento básico é inadequado e o abastecimento de água é precário (VERONESI, 1997; COURA, 2008; SANTOS e SOARES, 2008). Os cistos no meio externo podem sobreviver dias, semanas ou meses, especialmente sob condições úmidas e são responsáveis pela transmissão da doença (SANTOS e SOARES, 2008).

Segundo o Comitê de Sistemática da Sociedade Internacional de Protozoologia, as espécies do gênero *Entamoeba* pertencem ao Reino Protozoa,

Filo Sarcomastigophora, Subfilo Sarcodina, Superclasse Rhizopoda, Classe Loboza, Ordem Amoebida e Família Entamoebidae (SILVA, 2005).

As espécies de ameba do gênero *Entamoeba* estão incluídas em cinco grupos (LEVINE, 1985), três dos quais são de espécies formadoras de cistos, a saber, grupos de cistos maduros com um núcleo, quatro núcleos e oito núcleos. Apenas o grupo de cistos maduros com quatro núcleos (também conhecido como grupo *E. histolytica*-like) inclui espécies patogênicas conhecidas, das quais *E. anatis* foi encontrado em patos e abetardas (LEVINE, 1985; SILVANOSE et al., 1998). Os outros dois grupos de *Entamoeba* formadores de cistos incluem espécies não patogênicas, algumas delas descritas em aves: *E. gallinarum*, do grupo de cistos maduros com oito núcleos (ou grupo *E. coli*-like), habita o ceco de galinha, peru e perdiz (LEVINE, 1985; CORDERO DEL CAMPILLO et al., 1994); e uma espécie não determinada do grupo de cistos com um núcleo (ou grupo *E. bovis*-like) foi encontrado no ceco e intestino grosso de avestruzes (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2000). Esta ameba também já foi encontrada em emas. É comumente presente não só em aves de origem espanhola, mas também em avestruzes criadas em Portugal e aquelas importadas da Espanha para a Bélgica, França, Grã-Bretanha e Holanda. Cistos de um núcleo de 10-15 µm de diâmetro também foram encontrados em avestruzes da Grécia (SOTIRAKI et al., 2001) e Escócia (PENNYCOTT e PATTERSON, 2001). Sotiraki et al. (2001) identificaram esses cistos como *E. histolytica*, mas isso pode ser uma identificação errônea, uma vez que a descrição dada por esses autores corresponde a espécie *E. bovis*-like descritas por Martínez-Díaz et al. (2000). Jansson e Christensson (2000) indicam a presença de *Entamoeba* spp. em avestruzes na Suécia, no entanto, eles não dão dados suficientes para permitir uma identificação mais precisa.

Ponce Gordo et al. (2002) fez o primeiro relato da presença de cistos com oito núcleos em ratitas, porém, avestruzes criados na mesma fazenda foram negativos para este parasito. Não encontraram trofozoítos, as amostras não foram diarreicas e não foi possível investigar o conteúdo do ceco e intestino grosso proximal das emas parasitadas. O tamanho dos cistos encontrados (20 µm em média) era ligeiramente maior que os cistos de *E. gallinarum* (12-15 µm), e estava dentro da média de cistos de *E. coli* e *E. muris* (10-33 e 9-20 µm, respectivamente; dados de LEVINE, 1985).

Outras amebas encontradas em ratitas foram *Endolimax* e *Iodamoeba*. A primeira tem sido frequentemente encontrada em amostras de fezes de avestruzes

e, em menor grau, em emas de diferentes fazendas, e trofozoítos dessa ameba foram também encontrados no conteúdo intestinal de alguns avestruzes em matadouros. *Iodamoeba* é muito menos frequente, e apenas cistos foram encontrados em algumas amostras de avestruz. Ambas as amebas parecem não serem patogênicas para ratitas (PONCE GORDO et al., 2002). *Endolimax gregariniformis* já foi encontrada em diferentes aves domésticas e selvagens (LEVINE, 1985), mas não em ratitas, e *Iodamoeba butschlii* tem sido descrita apenas em mamíferos, embora Sotiraki et al. (2001) indicaram a presença de cistos de *Iodamoeba*-like em avestruzes.

3.5.1 Morfologia de *Entamoeba* spp.

As diferentes espécies de amebas se distinguem uma das outras pelo tamanho do trofozoíto e do cisto, pela estrutura e números dos núcleos nos cistos e pela forma das inclusões citoplasmática como vacúolos nos trofozoítos e corpos cromatóides nos cistos (NEVES et al., 2005).

Como *E. histolytica* é morfologicamente indistinguível de *E. dispar* não invasiva, a microscopia por si só não pode dar uma resposta definitiva quanto à presença de cistos e trofozoítos de *E. histolytica*, portanto, métodos adicionais tais como detecção de antígenos ou PCR são importantes para distinção dessas espécies. Além disso, muitas das infecções não são detectadas por causa da sensibilidade da microscopia ser baixa (RAVDIN, 1994; HAQUE et al., 1997; VERWEIJ et al., 2003).

3.5.2 Infecção e Patogenicidade

Quando o hospedeiro entra em contato com os protozoários, o resultado final, na maioria dos casos, será o estabelecimento de uma infecção não invasiva (GATHARIM e JACKSON, 1987). No entanto, algumas pessoas vão adquirir doença invasiva predominantemente na forma de colite amebiana ou abscesso hepático amebiano (STAUFFER e RAVDIN, 2003).

A infecção amebiana ocorre quando os cistos maduros de *Entamoeba* spp. são ingeridos através de alimentos ou água contaminada por um indivíduo suscetível, pois nem todos desenvolvem a doença (REY, 2002). Excitação ocorre no lúmen intestinal para produzir trofozoítos. A proteína de superfície do trofozoíto (lectina) reconhece os açúcares galactose e GalNAc sobre a superfície da célula hospedeira (RAVDIN e GUERRANT, 1981; PETRI et al., 1987).

A interface da lectina-galactose/GalNAc com as mucinas hospedeiras que revestem o intestino é o momento definido da infecção (CHADEE et al., 1987). Se a lectina do parasita se liga às glicoproteínas mucina hospedeiras no lúmen intestinal, resultará em uma infecção do intestino não invasivo. O ciclo de vida, em seguida, continua com a reprodução dos trofozoítos por expansão clonal na camada de mucina. Subsequentemente, a lectina galactose/GalNAc, juntamente com as glicoproteínas mucina ou outras bactérias intestinais, iniciam a via de desenvolvimento que conduz ao encistamento (EICHINGER, 2001).

Por outro lado, se o trofozoíto penetra na camada de mucina e a lectina se liga diretamente a uma superfície N-acetil-D-galactosamina da célula hospedeira, uma cascata de eventos ocorre, em última análise conduzindo à morte da célula hospedeira e progressão da doença invasiva (RAVDIN e GUERRANT, 1981). Uma vez que o trofozoíto tem o compromisso de replicação, a invasão e encistamento não ocorrerão e o ciclo de vida não será concluído com êxito. Assim, a doença invasiva, tal como determinado pela proteína lectina, deve ser considerada uma má adaptação do organismo, uma vez que é desvantajoso para a sobrevivência dos protozoários (STAUFFER e RAVDIN, 2003).

3.5.3 Sintomatologia

As três formas comuns de amebíase intestinal clinicamente grave são colite amebiana fulminante, ameboma do cólon e apendicite amebiana e ocorrem mais em adultos do que em crianças. Colite amebiana fulminante é caracterizada pela eliminação de fezes com sangue, desconforto abdominal generalizado, cólicas precedendo evacuação e tenesmo retal, que tende a ser constante e intenso. Manifestações gerais incluem febre, desidratação e prostração rapidamente

progressiva. Lesões avançadas frequentemente produzem hemorragias intestinais ou perfuração seguida por peritonite (SEPULVEDA e MARTINEZ-PALOMO, 1984).

Amebomas são lesões pseudotumorais que ocorrem predominantemente nas regiões verticais do cólon, ceco e reto e estão associados com sintomas abdominais vagos, ocasional diarreia sanguinolenta e uma massa palpável (GILLES et al., 1985).

As manifestações clínicas de apendicite amebiana são similares aos de apendicite bacteriana. Diarreia com fezes manchadas de sangue é um acompanhamento frequente e uma característica distintiva (GILLES et al., 1985).

O período de incubação é muito variável, tendo sido registrado casos com sete dias até quatro meses. Esse período aparentemente depende da quantidade de material infectante ingerido pelo hospedeiro e as condições de seu aparelho digestório (REY, 2002; SILVA et al., 2005).

3.5.4 Ciclo biológico

O organismo existe em duas formas: o trofozoíto que é a forma que se divide e o cisto que é a forma latente. A infecção geralmente começa com a ingestão do cisto, o qual está presente em alimentos ou água contaminada com fezes (Figura 4; **1 e 2**) (SEHGAL et al., 1996).

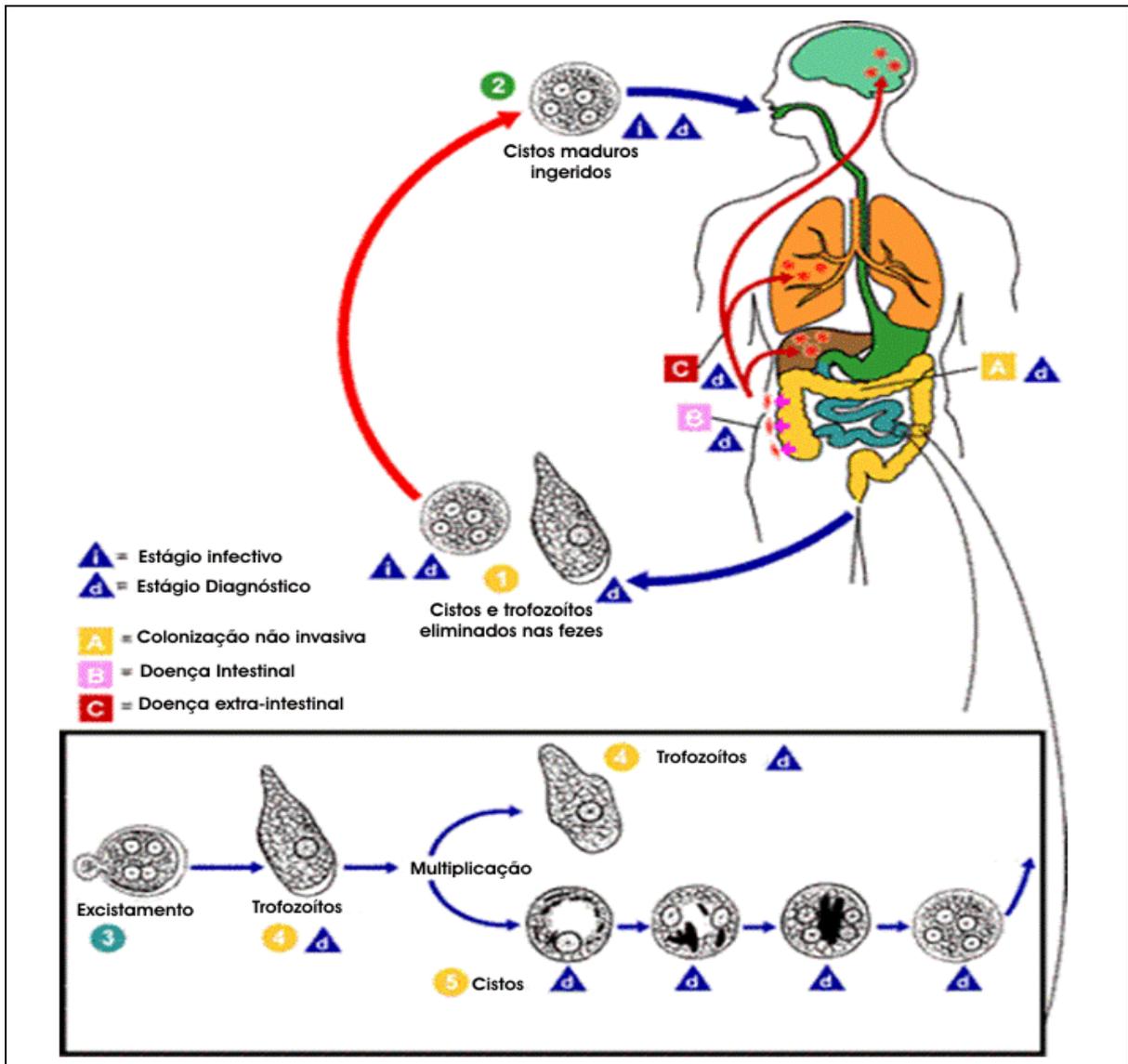


Figura 4. Ciclo biológico de *Entamoeba* spp. Cistos e trofozoítos são passados nas fezes (1). A infecção ocorre pela ingestão de cistos maduros (2) em alimentos contaminados com fezes, água ou mãos. Excistância (3) ocorre no intestino delgado e trofozoítos (4) são liberados e migram para o intestino grosso. Os trofozoítos multiplicam por fissão binária e produzem cistos (5), e ambas as fases são passadas nas fezes. Por causa da proteção conferida pelas suas paredes, os cistos podem sobreviver dias a semanas no ambiente externo e são responsáveis pela transmissão da doença. Trofozoítos passados nas fezes são rapidamente destruídos uma vez fora do corpo, e em caso de ingestão não sobrevivem à exposição ao ambiente gástrico. Em muitos casos, os trofozoítos permanecem confinados a luz intestinal (A: infecção não invasiva) de indivíduos que são portadores assintomáticos, passando cistos em suas fezes. Em alguns pacientes, os trofozoítos invadem a mucosa intestinal (B: doença intestinal), ou, através da circulação sanguínea vão para locais extra-intestinais tais como o fígado, pulmões e cérebro (C: doença extra-intestinal), com manifestações patológicas resultantes (CDC modificado, 2012).

Cistos sobrevivem ao pH ácido do estômago e passam para o intestino. Na região íleo-cecal, cistos são submetidos ao excistamento (Figura 4; **3**) e cada cisto dá origem a oito trofozoítos. Estes migram e se multiplicam no cólon (Figura 4; **4**). Na maioria dos casos, os trofozoítos no intestino vivem como comensais. Ocasionalmente, no entanto, trofozoítos atacam e invadem a mucosa intestinal causando disenteria e podem ir através dos vasos sanguíneos para locais extra-intestinais como cérebro, fígado e pulmões, onde podem formar abscessos. No intestino, muitos dos trofozoítos encistam-se e produzem cistos quadrinucleados (Figura 4; **5**). Tanto os trofozoítos como os cistos são excretados junto com as fezes. Cistos podem sobreviver por longos períodos fora do hospedeiro, enquanto os trofozoítos sobrevivem apenas durante algumas horas. Trofozoítos desempenham nenhum papel na transmissão da doença, mas são responsáveis pela produção de patologias teciduais (SEHGAL et al., 1996).

3.5.5 Diagnóstico

Diagnóstico de cisto *Entamoeba* se baseia principalmente em investigação morfológica em um microscópio de luz. No entanto, esta técnica não é capaz de distinguir entre *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii*, que possuem morfologia idêntica. Ensaio baseado em PCR foram desenvolvidos e amplamente utilizados para a detecção de espécies de *Entamoeba* devido à sua alta sensibilidade (HECKENDORN et al., 2002; MORAN et al., 2005; HAMZAH et al., 2006; FOTEDAR et al., 2007), sendo 100 vezes mais sensível que o teste de ELISA (MIRELMAN et al., 1997).

Muitos testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos foram introduzidos como adjuntos para apoiar o diagnóstico de amebíase. Os vários testes atualmente empregados incluem hemaglutinação indireta, ensaio imunoenzimático, imunofluorescência indireta, contraímunoeletroforese e difusão em gel de ágar. Estes testes sorológicos são particularmente úteis na detecção de amebíases extra-intestinais tais como abscesso hepático amebiano, uma vez que a examinação de fezes é frequentemente negativa para *E. histolytica* em tais casos (SEPULVEDA e MARTINEZ-PALOMO, 1982).

3.5.6 Profilaxia, controle e tratamento

Os cistos de *Entamoeba* são notavelmente resistentes aos desinfetantes químicos, incluindo a cloração, e podem sobreviver a uma vasta gama de valores de pH e pressões osmóticas. Morrem rapidamente em ambientes secos, aquecidos (a cerca de 55 °C) ou congelados (FEACHEM et al., 1983). A transmissão fecal-oral através das mãos ou alimentos contaminados é muito comum. Portanto, saneamento e higiene pessoal tem prioridade na prevenção e controle da amebíase. A disponibilidade de água suficiente para a lavagem das mãos e dos alimentos pode ser mais importante do que a qualidade da água por si só (GILLES et al., 1985).

A droga de escolha para o tratamento da doença amebiana invasiva é o nitroimidazol, tais como o metronidazol, mas o tratamento é relativamente caro. (GILLES et al., 1985).

3.6 BIOLOGIA MOLECULAR

A biologia molecular é uma ferramenta valiosa dos cientistas, podendo fornecer aos epidemiologistas informações muito além das oferecidas pela microscopia tradicional, pela cultura e imunologia, auxiliando na vigilância de agentes infecciosos e na determinação das fontes de infecção (THOMPSON et al., 1998; MORGAN et al., 2000).

Os métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção dos parasitas, visando superar as limitações encontradas nos métodos microscópicos convencionais (CARVALHO-ALMEIDA, 2004).

A identificação e caracterização genotípica, por técnica de biologia molecular, das amostras de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Entamoeba* spp. isoladas a partir de material fecal, é ferramenta fundamental para se entender melhor o papel do homem e dos animais como reservatórios e fontes de infecção humana, bem como identificar outras fontes de infecção, como a hídrica, por exemplo (CARVALHO-ALMEIDA, 2004).

Métodos moleculares têm sido cada vez mais utilizados para proporcionar alta acurácia e especificidade na detecção dos oocistos em amostras clínicas e

ambientais, para definir a posição taxonômica das várias espécies de parasitos (HIGGINS et al., 2001; THOMPSON e CHALMERS, 2002).

3.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase

O problema da baixa sensibilidade das reações de hibridização de DNA do parasita presente na amostra, foi melhorado por um método capaz de amplificar milhares de vezes uma molécula de DNA alvo, com o uso de uma enzima, a Reação em Cadeia pela Polimerase. Na PCR, regiões específicas do DNA de interesse são amplificadas enzimaticamente. Durante a PCR, um segmento específico de DNA de fita dupla ou de fita simples, pode ser amplificado, através de sucessivos ciclos. Com a utilização da transcriptase reversa o RNA também pode ser amplificado (CARVALHO-ALMEIDA, 2004).

A técnica da PCR consiste basicamente em fazer cópias de uma sequência específica do DNA de um organismo *in vitro*, utilizando para isso, os elementos básicos de replicação natural do DNA (POWLEDGE, 2004). O resultado desta amplificação é facilmente visualizado através da eletroforese em gel de agarose (BRODY e KERN, 2004).

A especificidade e sensibilidade da PCR são ferramentas úteis para detecção e caracterização de grande variedade de patógenos. Em termos práticos, essas técnicas podem ser usadas como simples testes de “presença/ausência” de determinados agentes. Em adição à detecção do parasita, a PCR pode ser usada para determinação da estrutura populacional e na caracterização de organismos que não podem ser cultivados ou purificados, como é o caso dos parasitas intracelulares (MONIS et al., 2002). Diversificados protocolos têm sido descritos no processamento dos parasitas para obtenção de amostra de DNA apropriada para a PCR.

O processo inicial geralmente envolve a lise do parasita por choque térmico (congelamento/aquecimento), por fervura ou por meios químicos. O passo seguinte consiste na remoção dos inibidores da PCR (SINGH, 1997). Os métodos de PCR podem não somente ser aplicados a pequeno número de oocistos, como também, a extração de DNA de amostra fecal e ambiental pode ser analisada diretamente sem a necessidade de isolar oocistos intactos (WIDMER et al., 2002).

As vantagens da PCR incluem alta sensibilidade, análise rápida de grande número de amostras, relativamente baixo custo, detecção de múltiplos patógenos, e capacidade de discriminar entre espécie e cepa, se houver *primers* específicos (ROCHELLE et al., 1997).

3.6.1.1 Nested PCR

A técnica de Nested PCR consiste em utilizar os produtos da reação da PCR em uma segunda reação de PCR (SAMBROOK et al., 2001). Dessa forma, são utilizados os produtos da amplificação realizada pelos primeiros iniciadores, como um molde para uma segunda amplificação, realizado com outro par de iniciadores que se anelam com seqüências internas ao primeiro amplificado. A utilização desta técnica no diagnóstico de *Cryptosporidium* é recomendada, pois aumenta ainda mais a sensibilidade da PCR, conseguindo detectar oocistos mesmo em amostras que contém quantidade muito pequena destes (SANTÍN et al., 2004).

3.6.1.2 Multiplex PCR

A Multiplex PCR consiste na utilização de mais de um par de iniciadores em uma mesma PCR. Desta forma, vários segmentos de DNA alvo são amplificados simultaneamente, economizando tempo, diminuindo gastos e sendo capaz de detectar mais de uma espécie no caso de infecções mistas, pois cada par de iniciador vai amplificar uma seqüência específica de cada espécie (SAMBROOK et al., 2001). Entretanto, esta técnica ainda está sendo aperfeiçoada no diagnóstico de parasitos devido a sua dificuldade de aplicação, uma vez que exige que todos os iniciadores tenham temperaturas de anelamento aproximadas, não interajam entre si e que os fragmentos amplificados tenham tamanhos próximos (SANTÍN e ZARLENGA, 2009).

3.6.1.3 PCR-RFLP

A PCR-RFLP utiliza enzimas específicas na reação da PCR, que são capazes de clivar uma sequência de nucleotídeos em determinados pontos e, a partir destas clivagens, a espécie do parasita pode ser identificada em eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK et al., 2001; SPANO et al., 1997). Uma das grandes vantagens da PCR-RFLP, é a capacidade de diferenciar espécies sem a necessidade do sequenciamento (SPANO et al., 1997). Por outro lado, ainda é incapaz de diferenciar algumas espécies, por possuírem o mesmo sítio de restrição e permanecendo, portanto, com o mesmo padrão no gel (TROTZ-WILLIAMS et al., 2006).

3.6.1.4 Sequenciamento

O sequenciamento tem como objetivo determinar a ordem exata dos nucleotídeos de um determinado segmento de DNA e vem sendo utilizado no diagnóstico da espécie envolvida na infecção (SMITH e NICHOLS, 2010). Antes de iniciar as etapas do sequenciamento, as amostras, que já foram previamente submetidas à PCR, deverão ser purificadas. Este procedimento é de extrema importância, pois remove os dNTPs e iniciadores que restaram das reações anteriores, e que poderiam causar interferência nas reações seguintes (SAMBROOK et al., 2001). As amostras são então submetidas a uma nova PCR com formulação específica, sendo que os iniciadores são utilizados em reações independentes para que as duas sequências obtidas possam ser posteriormente alinhadas, visto que são complementares, aumentando dessa forma a acurácia do resultado final (SAMBROOK et al., 2001). A sequência obtida poderá ser submetida ao GenBank (Genetic Sequence Data Bank) pelo BLAST e a identificação da espécie em questão é realizada em apenas alguns segundos (ALTSCHUL et al., 1997).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada em instalação destinada a criação de emas da UENF e as análises laboratoriais realizadas no NUPAP/LSA/CCTA situados no HVET. Foram utilizadas sete emas adultas sendo quatro fêmeas e três machos, mantidas em um mesmo piquete. Todos os animais foram identificados para que fosse possível a diferenciação das amostras coletadas.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras fecais recém-eliminadas pelas aves tendo-se o cuidado de só coletar parte das fezes que não tinham tido contato com o solo. As coletas foram realizadas em intervalos bimestrais durante o período compreendido entre maio e dezembro de 2012. Para cada amostra foram utilizados sacos plásticos individuais, que foram identificados, acondicionados em caixas isotérmicas (8-10°C) e imediatamente transportados ao laboratório.

4.3 DIAGNÓSTICO DE OVOS, CISTOS E OOCISTOS NAS FEZES

Foi utilizado o método de Sheather modificado descrito a seguir. De cada amostra de fezes coletadas três gramas foram acondicionadas em um béquer que foi completado com água até 50 mL. Depois de homogeneizado o material presente no béquer foi passado em tamis com gaze dobrada para um copo de 300 mL descartável. O conteúdo do copo foi passado para um tubo plástico de fundo cônico de 50 mL com tampa rosqueável e em seguida o volume completado com água até 50 mL. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 1713g (3000 rpm) a 25 °C (Centrifuga Refrigerada NT815, Novatecnica, Brasil). O sobrenadante obtido foi descartado e ao sedimento acrescentado cinco mL de solução concentrada de sacarose (1,1 g/mL) dissolvendo-se bem o sedimento aderido no fundo do tubo. Este material foi passado para um tubo plástico de fundo cônico e tampa rosqueável de

15 mL completando-se o mesmo com sacarose até 14 mL. Esse tubo foi centrifugado por 5 minutos a 1713g (3000 rpm) na mesma centrífuga. Após centrifugação ao tubo foi colocado sacarose até a formação de um menisco convexo. Uma lamínula 18x18mm foi acondicionada sobre o menisco por dez minutos e depois a mesma foi retirada e colocada em cima de uma lâmina de vidro de 25,4 x 76,2 mm com espessura de 1 a 1,2 mm e analisada em microscópio óptico (objetiva 20x e 40x).

4.4 ESPORULAÇÃO

Todo o restante das amostras fecais coletadas que demonstraram a presença de oocistos foram submetidas à esporulação. Para tanto, todo o material fecal foi diluído em solução de dicromato de potássio 2,5% até se obter consistência líquida e passada em tamis com gase dupla. Estas foram acondicionadas em pissetes plásticos de 250 mL devidamente identificados. Para facilitar a esporulação as amostras foram submetidas à aeração através do bombeamento de ar no fundo dos pissetes auxiliados por bomba de aquário acoplada a mangueiras (Figura 5). Diariamente, amostras foram colhidas para verificar o tempo de esporulação sendo a aeração interrompida após esporulação de 80% dos oocistos.



Figura 5. Pissetes ligados à bomba de aquário por meio de mangueiras.

4.5 CONCENTRAÇÃO DOS OOCISTOS

Foi utilizado o método de Sheather modificado, para tanto, toda a amostra esporulada foi colocada em tubo plástico rosqueável com fundo cônico de 50 mL. As amostras que tinham mais de 50 mL foram divididas na quantidade de tubos necessários. Estas foram centrifugadas a 1713g (3000 rpm) em centrífuga refrigerada (NT815, Novatecnica, Brasil) por 10 minutos a 25°C e descartados o sobrenadante ressuspensando o sedimento em água destilada por três vezes para retirada do dicromato de potássio, após a última centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em solução saturada de sacarose (1,1 g/mL) e transferido para um tubo de 15 mL. Este foi preenchido com solução saturada de sacarose até os 14 mL e centrifugado por 10 min a 1713g (3000 rpm)/25°C. Após centrifugação ao tubo foi colocada sacarose até a formação de um menisco convexo. Uma lamínula 18x18mm foi acondicionada sobre o menisco por dez minutos e depois a mesma foi colocada em cima de uma lâmina que foi analisada em microscópio óptico (objetiva 20x e 40x) para observação dos oocistos esporulados.

4.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

A observação dos oocistos para a diferenciação morfológica e morfométrica foi feita utilizando-se microscópio óptico binocular modelo Axiostar Plus® (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha) equipado com contraste de fase e em objetivas de 40x e de 100x com óleo de imersão, para melhor visualização e, conseqüentemente, maior detalhamento das formas e tamanhos das estruturas presentes no interior do oocisto esporulado. Buscou-se, nesse sentido, caracterizar morfometricamente cada oocisto esporulado conforme proposta de Duszynski e Wilber (1997). O desenho do oocisto de *Isospora* esporulado foi realizado com auxílio do programa Corel Photo Paint versão 11.

Para a captura de imagens, foi utilizada câmera digital (Canon PowerShot A640, USA) acoplada ao microscópio e para mensuração dos oocistos o Software Zeiss Axion Vision Sample Images com as medidas dadas em μm . Na análise morfológica e morfométrica foi dada atenção as seguintes estruturas destacadas por Duszynski e Wilber (1997): diâmetros maior (DM) e menor (dm) do oocisto; diâmetros maior (EM) e menor (em) do esporocisto; altura e largura dos corpos de stieda (CS), substieda (CSS) e parastieda (CPS); índices morfométricos (diâmetro menor/diâmetro maior) do oocisto (IM) e do esporocisto (IME); espessura da parede do oocisto (PO); presença e ausência de micrúpila (M), grânulo polar (GP), resíduo do oocisto (RO), resíduo do esporocisto (RE) e corpos refráteis (CR) e núcleo (N) nos esporozoítos.

4.7 ANÁLISE MOLECULAR

De cada amostra fecal foram pesados 15 gramas para a etapa de concentração dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., cistos de *Giardia* spp. e *Entamoeba* spp. Todas as amostras foram processadas de acordo com as técnicas de centrífugo-flutuação com sacarose, extração do DNA e nested PCR e PCR como a seguir.

4.7.1 Técnica de centrífugo-flutuação

Foi adicionada água destilada à 15 gramas fecais até completar os 50 mL do tubo plástico de fundo cônico de 50 mL com tampa rosqueável. Os tubos foram deixados em repouso por 20 minutos e após agitação foram filtrados em tamises com malha de aço de 45 μm de porosidade. Os filtrados foram transferidos para um novo tubo de 50 mL, no qual também foi adicionada quantidade suficiente de água destilada até completar 50 mL de volume final. Estes tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1190g (2500 rpm) e o sobrenadante foi descartado logo após. O sedimento foi então ressuspensionado em água destilada até alcançar um volume de 25 mL, logo em seguida foram adicionados 25 mL de solução de sacarose (1,1 g/mL) e, depois de realizada a homogeneização da solução, os tubos foram novamente centrifugados a 190g (1000 rpm) por 20 minutos à 4°C. Foram aspirados 4 mL do sobrenadante e pipetados em tubos cônicos de 15 mL, onde foi adicionado 11 mL de água destilada para que fosse obtido o volume final de 15 mL em cada tubo. Esta solução foi centrifugada a 1190g (2500 rpm) por 10 minutos com o sobrenadante descartado logo em seguida. O sedimento foi então ressuspensionado em 500 μL de água destilada, e transferido para um tubo Eppendorf, onde foi congelado para posterior extração do DNA. Todas as centrifugações foram feitas na Centrífuga Refrigerada NT815 Novatecnica, Brasil.

4.7.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o DNeasy Tissue Kit (Qiagen®), com algumas modificações em relação ao protocolo sugerido pelo fabricante (SANTÍN et al., 2004). Para cada alíquota de amostra (50-100 μL) foram adicionados 180 μL de Tampão ATL e 20 μL de proteinase K e, após homogeneização em um agitador vortex (Biomixer QL-901, EUA), o material era incubado a 55°C *overnight*. Após esta etapa as amostras foram novamente homogeneizadas em vortex durante 15 segundos e, em seguida, foram adicionados 200 μL de Tampão AL. Cada amostra foi submetida a uma nova homogeneização e incubada a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 μL de etanol (96–100%) em cada tubo de amostra, que foram homogeneizados e o conteúdo transferido para uma coluna

DNeasy Mini spin, colocada em tubo de 2 mL. Cada coluna foi centrifugada a 6000g (8000 rpm) por um minuto e logo após todo o conteúdo do tubo de 2 mL foi descartado. As colunas DNeasy Mini spin foram então colocadas em um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 µL de Tampão AW1, e submetidas a nova centrifugação por um minuto a 6000g (8000 rpm) e novamente descartado o conteúdo do tubo de 2 mL. Cada coluna foi colocada em um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 µL de Tampão AW2, e centrifugados dessa vez por três minutos a 20000g (14000 rpm) com a finalidade de secar a membrana da coluna DNeasy. O conteúdo do tubo de 2 mL foi então descartado.

As colunas DNeasy Mini spin foram colocadas em um novo tubo de 1,5 mL, e foram adicionados 100 µL de Tampão AE diretamente da membrana da coluna DNeasy com a finalidade de aumentar a concentração de DNA. Após um minuto de incubação em temperatura ambiente, foram então centrifugadas por um minuto a 6000g (8000 rpm) e levadas para refrigeração. Todas as centrifugações foram feitas na microcentrífuga Eppendorf MiniSpin®/Alemanha.

4.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase

Para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foi utilizada a técnica de nested PCR, com amplificação em duas etapas de um fragmento do gene 18S rRNA e para *Entamoeba* spp. foi feita apenas uma amplificação do mesmo fragmento.

As sequências de iniciadores utilizadas estão representadas no Quadro 1.

Quadro 1. Sequências dos iniciadores específicos para protozoários de potencial patogênico e zoonótico e seus tamanhos de fragmentos amplificados.

Protozoários	Iniciadores	Sequências	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1ª PCR	CRYPTOF CRYPTOR 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' ¹ 5'-CCCATTTCTTCGAAACAGGA-3' ¹	~1300
	2ª PCR	AL1598 AL3032 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' ¹ 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' ¹	~800
<i>Giardia</i> spp.	1ª PCR	GiaF GiaR 5'- AAGTGTGGTGCAGACGGACTC-3' ² 5'- CTGCTGCCGTCCTTGGATGT-3' ²	~500
	2ª PCR	RH11 RH4 5'- CATCCGGTTCGATCCTGCC-3' ³ 5'- AGTCGAACCCTEATTCTCCGCCAGG-3' ³	~300
<i>Entamoeba</i> spp.	PCR	ENTAM1 ENTAM2 5'-GTTGATCCTGCCAGTATTATATG-3' ⁴ 5'-CACTAT TGGAGCTGGAATTAC-3' ⁴	~550

¹XIAO et al., 1999; ²APPELBEE et al., 2003; ³HOPKINS et al., 1997; ⁴SUKPRASERT et al., 2008

4.7.3.1 *Cryptosporidium* spp.

O procedimento de amplificação foi realizado com os seguintes componentes para a amplificação primária: tampão PCR 1x; MgCl₂ (3 mM); dNTP (0,2 mM), Taq (2,5 U) (Qbiogene®) e 1 mM de cada um dos iniciadores, em um volume final de 50 µL. A amplificação secundária contém: tampão PCR 1x; MgCl₂ (1,5 mM); dNTP (0,2 mM); Taq (2,5 U) e 1 µM de cada um dos iniciadores, em um volume final de 50 µL. Para a amplificação primária foram realizados os seguintes ciclos no termociclador: 94 °C/3 min; 35 ciclos de 94 °C/45s, 59 °C/45 s e 72 °C/1 min e uma extensão final de 72 °C/7 min. Para a amplificação secundária: 94 °C/3 min; 40 ciclos de 94 °C/30s, 58 °C/90s e 72 °C/2 min e uma extensão final de 72 °C/7 min (XIAO et al., 1999).

4.7.3.2 *Giardia* spp.

Para a primeira reação de amplificação em PCR foram utilizados, em um volume final de 50µl: tampão PCR 1x; MgCl₂ (1,5mM); dNTP (0,2mM); Taq (2 U); Dimetilsulfóxido (DMSO) (2,5µL) e 0,5µL de cada um dos iniciadores. A amplificação secundária possui os mesmos reagentes e concentrações que a primeira reação. Para a amplificação primária foram realizados os seguintes ciclos no termociclador: 96 °C/2 min; um total de 35 ciclos, cada um consistindo de 96 °C/45s, 58 °C/30s e 72 °C/45s e uma extensão final de 72 °C/4 min. Para a amplificação secundária: 96 °C/2 min; 35 ciclos de 96 °C/45s, 55 °C/30s e 72 °C/45s e uma extensão final de 72 °C/4 min (HOPKINS et al., 1997).

4.7.3.3 *Entamoeba* spp.

O procedimento de amplificação foi realizado com os seguintes componentes: tampão PCR 1x; MgCl₂ (1,5 mM); dNTP (0,2 mM), Taq (2,5 U) (Qbiogene®) e 1 mM de cada um dos iniciadores, em um volume final de 50 µL. Para a amplificação foram realizados os seguintes ciclos no termociclador: 94 °C/5 min; 35 ciclos de 94 °C/1 min, 55 °C/1 min e 72 °C/1 min e uma extensão final de 72 °C/7 min (SUKPRASERT et al., 2008).

4.7.4 Análise da PCR

Os produtos da PCR e nested PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1% corado com gel red e imerso em tampão TAE 1X em cuba horizontal. A fonte foi regulada em 180 volts, 400 miliamperes e 20 minutos.

A visualização das bandas foi realizada em um transiluminador (UVTRANS UVT-312) após a corrida eletroforética, e os tamanhos dos fragmentos comparados com marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®) e com controles positivo e negativo. Esses controles foram originados de outro experimento, portanto, já existem no laboratório.

5. RESULTADOS

5.1 MICROSCOPIA

A análise das fezes das emas revelou a presença de diversos cistos e oocistos de protozoários parasitas e ovos de nematóides. O parasito mais frequentemente encontrado foi *Entamoeba* sp., com a observação de cistos em todas as amostras coletadas, na maioria das vezes uninucleados (Figura 6) que mediram em média de diâmetro maior e menor 41,00 μm e 37,75 μm , respectivamente (Tabela 1). Oocistos de *Isospora* sp. com diâmetro maior e menor medindo em média 23,64 μm e 22,32 μm , respectivamente (Tabela 2), foram observados (Figura 7) durante o período reprodutivo nas fezes de cinco emas sendo quatro fêmeas e um macho. Em outros dois animais machos, não foram encontrados oocistos em suas fezes. Também foram observados oocistos de *Eimeria* sp. (Figura 8) em um dos animais do experimento e tanto para oocistos de *Eimeria* quanto para os de *Isospora* o período de esporulação se estendeu de 10 a 15 dias. Ovos de helmintos identificados como do tipo Strongylida (Figura 9), *Capillaria* sp. (Figura 10), *Baylisascaris* sp. (Figura 11), *Sicarius* sp. (Figura 12) e do tipo *Sicarius* sp. (Figura 13) também foram encontrados nas fezes das emas examinadas e os valores médios, desvio-padrão, valor mínimo e máximo e o índice morfométrico do comprimento e largura dos ovos observados nas fezes das emas estão na tabela 1.

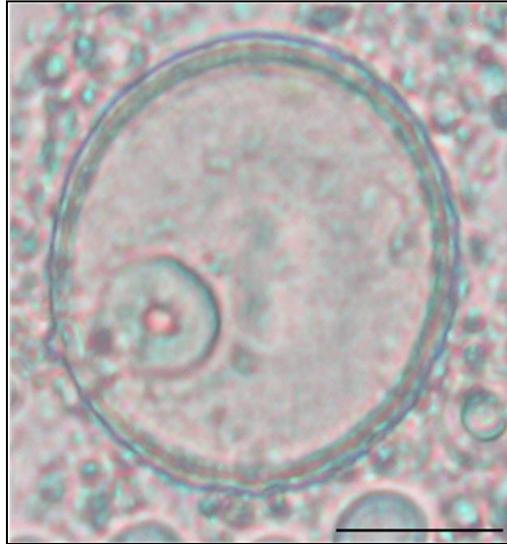


Figura 6. Cisto de *Entamoeba* sp. com um núcleo bem visível, observado em fezes de ema, *Rhea americana* (Barra de 10 μ m).

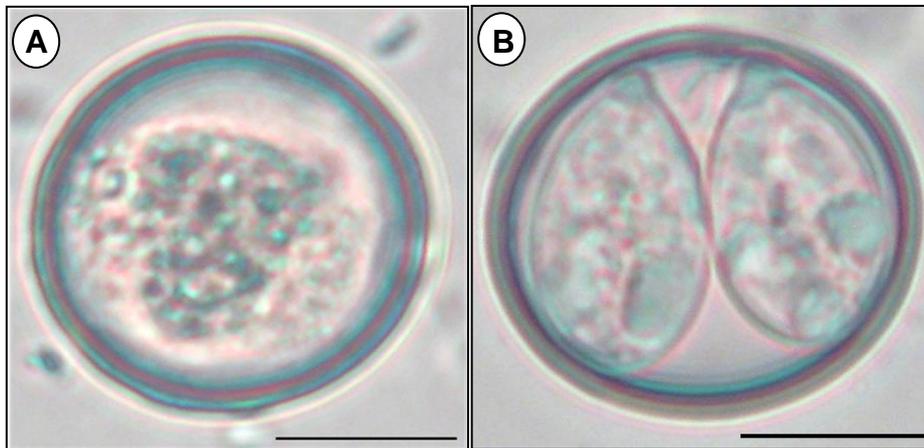


Figura 7. *Isospora* sp. observada em fezes de ema, *Rhea americana*. Em A e B oocisto não esporulado e esporulado respectivamente (Barra de 10 μ m).

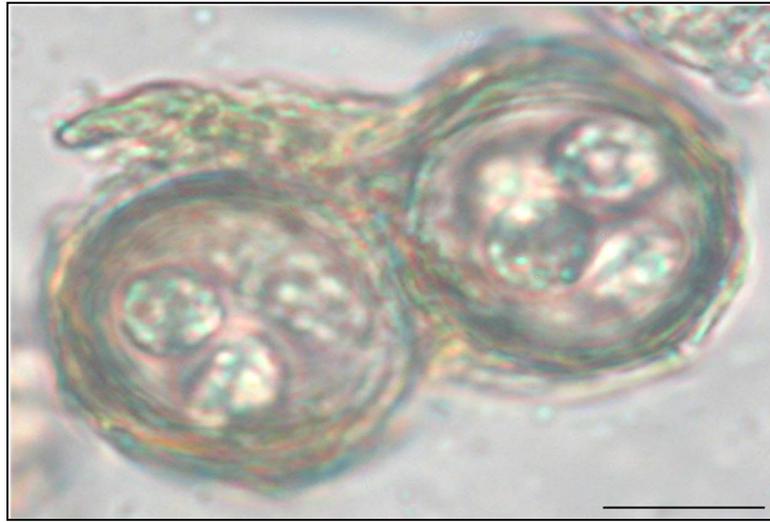


Figura 8. Formas semelhantes à *Eimeria* sp. com quatro esporocistos visíveis no interior do oocisto, observado em fezes de ema, *Rhea americana*. (Barra de 10 μ m).



Figura 9. Ovo do tipo Strongylida observado em fezes de ema, *Rhea americana* (Barra de 20 μ m).



Figura 10. Ovo de *Capillaria* sp. observado em fezes de ema, *Rhea americana* (Barra de 10 μ m).

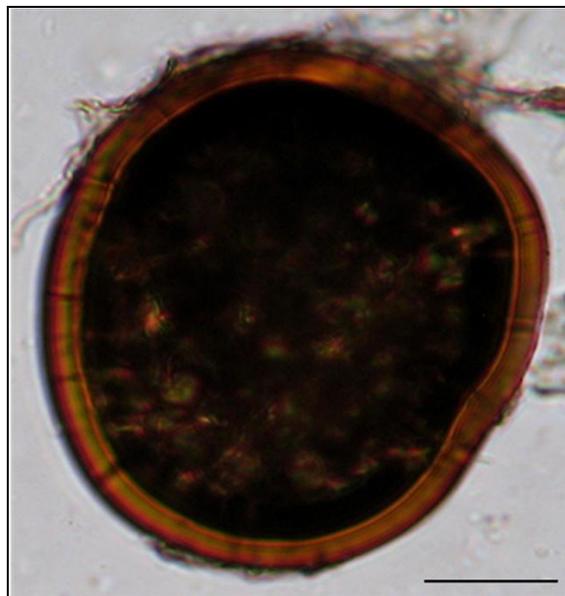


Figura 11. Ovo de *Baylisascaris* sp. observado em fezes de ema, *Rhea americana* (Barra de 20 μ m).



Figura 12. Ovo de *Sicarius* sp. observado em fezes de ema, *Rhea americana* (Barra de 20 μ m).

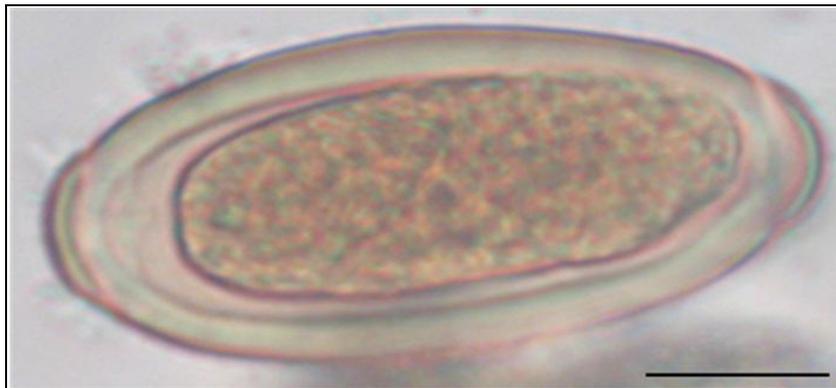


Figura 13. Ovo não larvado do tipo *Sicarius* sp. observado em fezes de ema, *Rhea americana* (Barra de 10 μ m).

Tabela 1. Morfometria em micrômetros dos cistos de *Entamoeba* e ovos de nematóides isolados em fezes de emas, *Rhea americana*.

Cistos e Ovos	n ¹	Diâmetro maior ²	Diâmetro menor ²	Índice Morfométrico ²
<i>Entamoeba</i> spp.	13	41,00 \pm 7,76 (30,50-57,31)	37,75 \pm 5,54 (29,43-46,83)	0,93 \pm 0,06 (0,82-1,00)
<i>Strongylus</i> spp.	12	119,58 \pm 11,16 (95,98-140,66)	69,64 \pm 5,81 (55,53-77,90)	0,58 \pm 0,03 (0,52-0,63)
<i>Capillaria</i> spp.	29	30,63 \pm 8,74 (16,44-48,22)	16,83 \pm 4,17 (9,02-23,99)	0,56 \pm 0,06 (0,48-0,69)
<i>Baylisascaris</i> spp.	04	91,45 \pm 1,67 (89,25-93,07)	86,67 \pm 8,26 (74,69-92,59)	0,95 \pm 0,08 (0,82-0,99)
<i>Sicarius</i> spp.	17	44,13 \pm 2,93 (38,21-49,48)	26,06 \pm 2,70 (22,61-32,96)	0,59 \pm 0,06 (0,49-0,69)

¹Número de cistos e ovos mensurados.

²Média; desvio padrão; menor e maior medidas observadas.

5.2 MORFOLOGIA E MORFOMETRIA

As formas exógenas (Figuras 14) de *Isospora* foram caracterizadas morfológicamente e morfometricamente da seguinte forma: oocistos esféricos a subesféricos com medida média de diâmetro maior e menor de 23,64 μm e 22,32 μm , respectivamente e índice morfométrico médio de 0,94 μm , com parede dupla e lisa e medida média de 1,57 μm (Tabela 2), com micrópila, resíduo do oocisto e grânulo polar ausentes; esporocistos levemente ovóides com medida média de diâmetro maior e menor de 13,92 μm e 9,58 μm , respectivamente e índice morfométrico médio de 0,69 μm (Tabela 3); corpo de stieda achatado de medida média de comprimento e largura de 0,79 μm e 1,31 μm , respectivamente (Tabela 4); e corpo de substieda irregular e proeminente, com medida média de comprimento e largura de 1,20 μm e 2,11 μm , respectivamente (Tabela 4); corpo de parastieda ausente; resíduo do esporocisto formado por grânulos dispersos de variados tamanhos; e esporozoítos com um corpo refrátil oblongo e um núcleo.

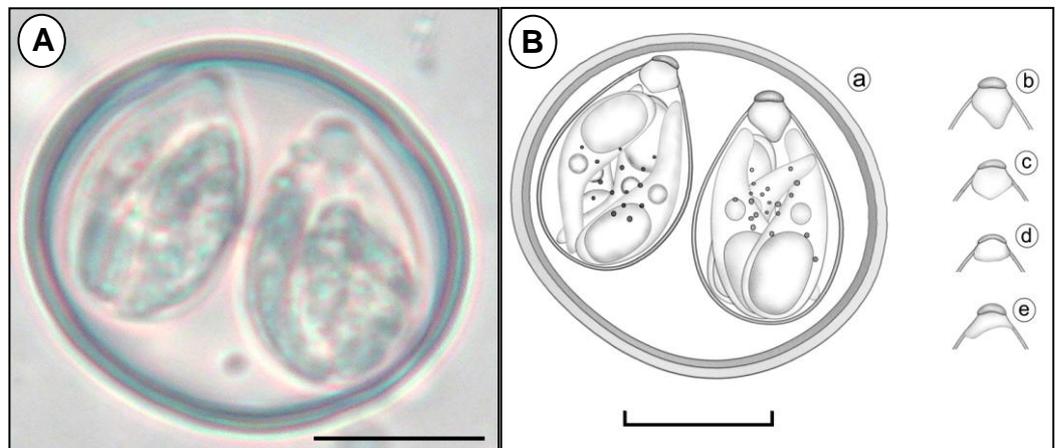


Figura 14. Oocisto de *Isospora* observado em fezes de ema, *Rhea americana*. Em **A** fotomicrografia de um oocisto esporulado onde observa-se um oocisto subsférico com parede dupla e lisa sem micrópila, resíduo do oocisto e grânulo polar, esporocistos levemente ovóides com corpo de stieda presente e parastieda ausente, esporozoítos com um corpo refrátil oblongo e núcleo e em **B** desenho esquemático das características morfológicas do oocisto (a) e esporocistos com corpo de stieda achatado e substieda (b,c,d,e) em formato irregular e proeminente.

Tabela 2. Morfometria em micrômetros de oocistos de *Isospora* isolados em fezes de ema, *Rhea americana*.

Ave	n ¹	Parede ²	DIÂMETROS ²		Índice Morfométrico ²
			Maior	Menor	
1	-	-	-	-	-
2	5	1,73±0,16 (1,19-2,07)	27,30±2,07 (23,02-34,78)	25,80±2,48 (20,78-34,66)	0,94±0,03 (0,86-1,00)
3	11	1,65±0,08 (1,34-2,14)	24,52±1,13 (18,86-29,42)	22,46±0,93 (18,00-27,18)	0,92±0,02 (0,83-1,00)
4	43	1,52±0,02 (1,15-1,88)	23,55±0,44 (18,71-29,67)	22,48±0,44 (17,33-28,84)	0,95±0,005 (0,86-1,00)
5	-	-	-	-	-
6	36	1,58±0,04 (1,20-2,14)	22,73±0,55 (16,38-34,54)	21,51±0,52 (15,53-30,98)	0,95±0,007 (0,85-1,00)
7	5	1,62±0,08 (1,46-1,92)	25,30±1,04 (21,55-27,64)	22,97±1,48 (18,67-26,27)	0,90±0,03 (0,79-0,98)
Total	100	1,57±0,02 (1,15-2,14)	23,64±0,33 (16,38-34,78)	22,32±0,32 (15,53-34,66)	0,94±0,004 (0,79-1,00)

¹Número de oocistos mensurados.

²Média; desvio padrão; menor e maior medidas observadas.

Tabela 3. Morfometria em micrômetros de esporocistos contidos em oocistos esporulados de *Isospora* em fezes de ema, *Rhea americana*.

AVE	n ¹	DIÂMETROS ²		Índice Morfométrico ²
		Maior	Menor	
1	-	-	-	-
2	5	12,90±0,64 (10,79-14,16)	9,09±0,40 (7,61-9,81)	0,71±0,02 (0,63-0,79)
3	5	13,73±0,59 (12,14-15,76)	9,49±0,36 (8,46-10,51)	0,69±0,03 (0,62-0,79)
4	5	14,12±0,55 (12,58-15,72)	9,78±0,24 (9,02-10,40)	0,69±0,02 (0,61-0,72)
5	-	-	-	-
6	5	14,18±1,33 (10,79-18,95)	9,42±0,56 (7,61-10,85)	0,67±0,03 (0,57-0,73)
7	5	14,68±0,47 (13,35-15,76)	10,11±0,34 (9,60-11,39)	0,69±0,03 (0,61-0,79)
TOTAL	25	13,92±0,34 (10,79-18,95)	9,58±0,17 (7,61-11,39)	0,69±0,01 (0,57-0,79)

¹Número de esporocistos mensurados.

²Média; desvio padrão; menor e maior medidas observadas.

Tabela 4. Morfometria em micrômetros de corpo de stieda e substieda contidos em esporocistos de oocistos de *Isospora* isolados em fezes de ema, *Rhea americana*.

AVE	n ¹	CORPO DE STIEDA ²		CORPO DE SUBSTIEDA ²	
		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
1	-	-	-	-	-
2	5	0,74±0,10 (0,48-1,11)	1,37±0,11 (0,96-1,60)	1,18±0,08 (0,98-1,48)	2,11±0,18 (1,61-2,59)
3	5	0,80±0,08 (0,65-1,07)	1,37±0,12 (0,92-1,57)	1,27±0,06 (1,11-1,45)	2,16±0,13 (1,76-2,44)
4	5	0,81±0,08 (0,67-1,09)	1,23±0,08 (0,98-1,41)	1,17±0,08 (0,97-1,37)	2,04±0,13 (1,74-2,51)
5	-	-	-	-	-
6	5	0,81±0,06 (0,66-1,04)	1,31±0,10 (0,97-1,52)	1,20±0,09 (0,89-1,42)	2,10±0,16 (1,73-2,56)
7	5	0,78±0,07 (0,64-1,02)	1,24±0,11 (0,86-1,54)	1,19±0,09 (0,96-1,42)	2,12±0,22 (1,32-2,53)
TOTAL	25	0,79±0,03 (0,48-1,11)	1,31±0,04 (0,86-1,60)	1,20±0,03 (0,89-1,48)	2,11±0,07 (1,32-2,59)

¹Número de corpo de stieda e substieda mensurados.

²Média; desvio padrão; menor e maior medidas observadas.

5.3 BIOLOGIA MOLECULAR

Das sete emas, seis amostras de fezes (85,7%) foram diagnosticadas como positivas para *Entamoeba* utilizando-se a técnica da PCR (Figura 17). Nas sete amostras de fezes examinadas pela nested PCR, não foram diagnosticadas amostras positivas para *Cryptosporidium* e *Giardia* (Figuras 15 e 16).

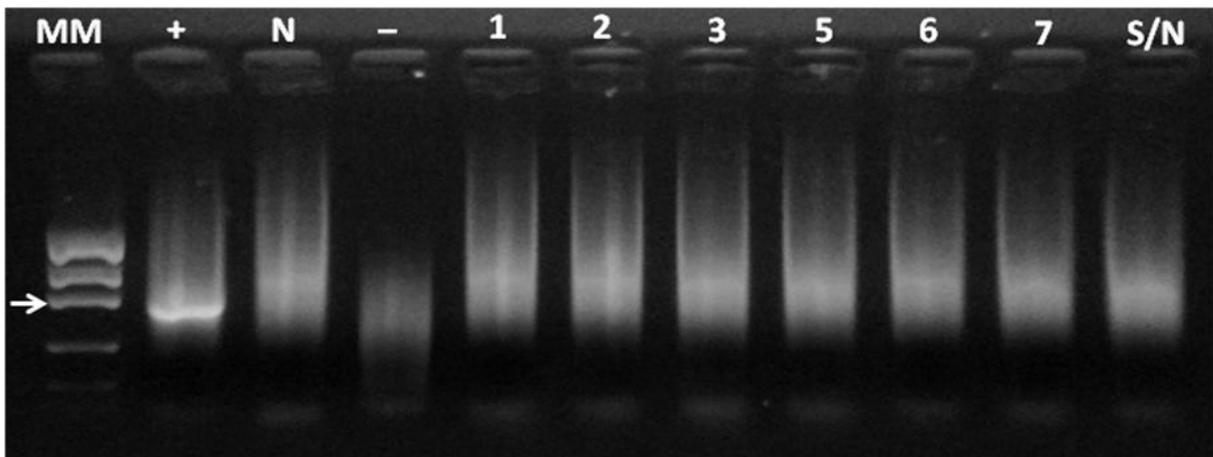


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da nested PCR do gene 18S rRNA de oocistos de *Cryptosporidium*. Marcador de peso molecular (**MM**); controle positivo (**+**); controle (nested) negativo (**N**); controle negativo (-) e amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 negativas. A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb.

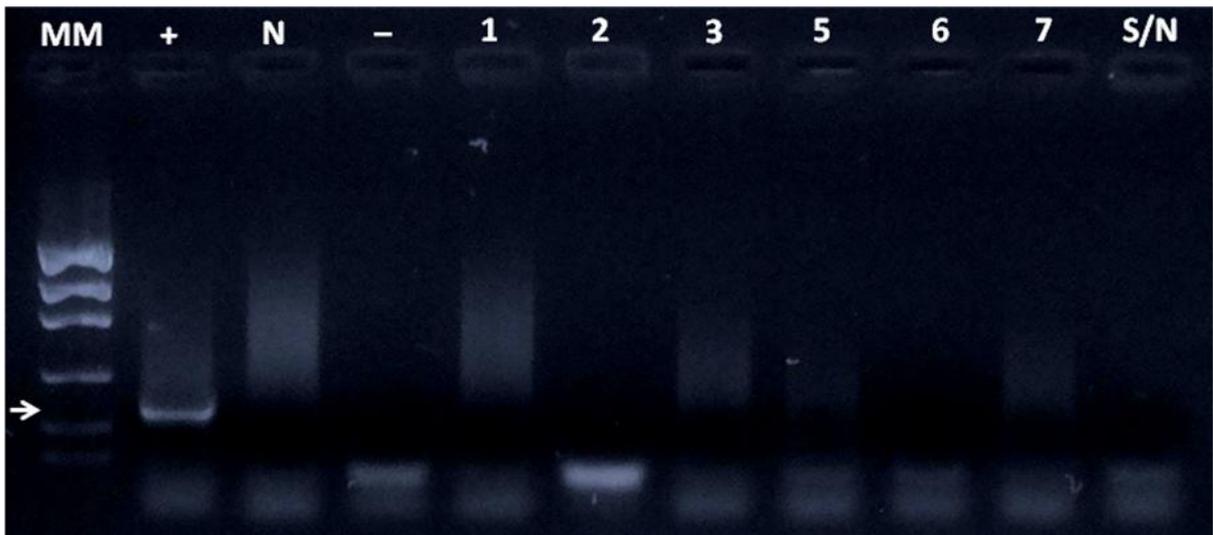


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de cistos de *Giardia*. Marcador de peso molecular (**MM**); controle positivo (+); controle (nested) negativo (**N**); controle negativo (-) e amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 negativas. A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 300 pb.

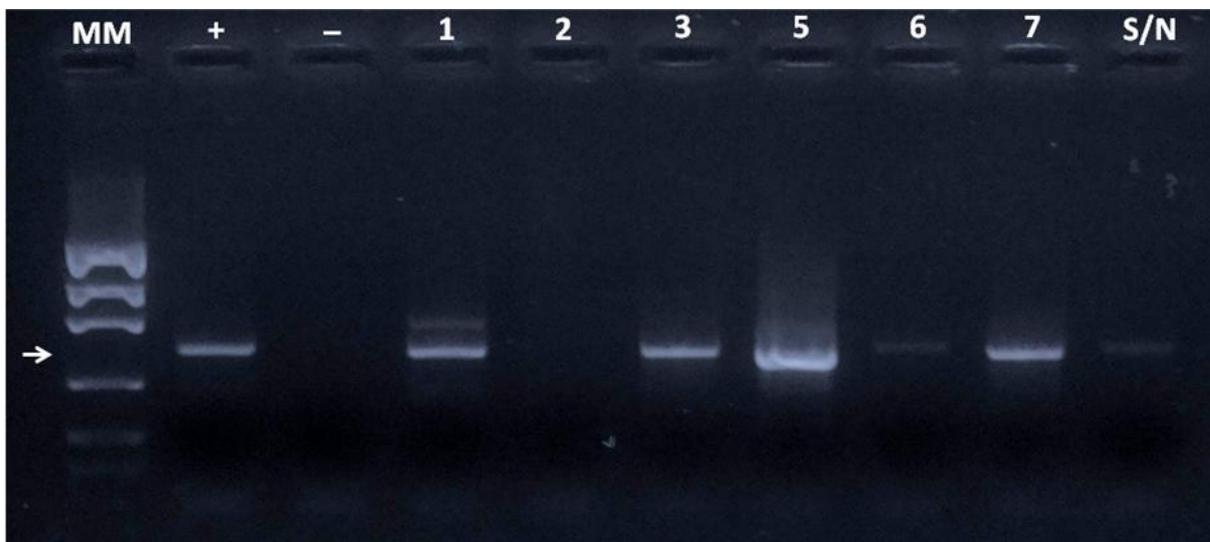


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de cistos de *Entamoeba*. Marcador de peso molecular (**MM**); controle positivo (+); controle negativo (-) e amostras 1, 3, 4, 5, 6 e 7 positivas e amostra 2 negativa. A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 550 pb.

6. DISCUSSÃO

A diversidade de espécies de parasitas que infectam as ratitas foi evidenciada apenas nos últimos anos. No entanto, há poucos dados sobre os parasitas que infectam essas aves, e o que se encontra na literatura geralmente se refere às avestruzes, *Struthio camelus*. Desta forma, observou-se nas fezes das emas a presença de diversos cistos e oocistos de protozoários parasitas, além de ovos de nematóides (Figuras 6 a 13). Devido, provavelmente as boas condições de higiene das instalações as aves encontravam-se com baixa carga de parasitas, no entanto com uma diversidade de espécies presentes em suas fezes, isto pode ser explicado pelo fato das emas terem o hábito de se alimentar de quase tudo que está à disposição, devido ao seu paladar pouco desenvolvido e ao hábito de engolir direto o alimento (GIANNONI, 2004). Esta autora também cita como comum o hábito desta ave se alimentar de suas próprias fezes (coprofagia) e algumas vezes de fezes de outros animais. Como a infecção parasitária nas ratitas, na maioria das vezes, se dá de forma direta, ou seja, no momento em que a ave ingere cistos, oocistos, ovos e larvas infectantes, estas larvas podem estar presentes em hospedeiro intermediário, geralmente insetos, também ingeridos diretamente ou presentes em folhagens, fezes ou qualquer outra matéria que as aves tenham contato possibilitando maior risco de infecção por parasitas. Desta forma, o tipo de manejo e sistema de criação adotado influencia de maneira direta nos níveis de infestação por parasitas do trato gastrointestinal (GIANNONI, 2004) o que pode explicar a baixa carga parasitária observada.

Alguns estudos já mostraram que as ratitas são aves bastante vulneráveis a diversos tipos de parasitoses, principalmente as gastrointestinais (OLIVEIRA et al. 2009), uma vez que outros órgãos não parecem albergar taxas significativas de parasitas (PONCE GORDO et al., 2002; FOREYT, 2005). Estes autores também relatam que mesmo quando em grande quantidade, a presença de parasitas nestas aves pode não ser acompanhada de sinais clínicos característicos, o que torna ainda mais interessante e importante a análise das amostras de fezes.

Nas fezes das sete emas foram encontradas formas císticas de *Entamoeba*, em todas as amostras examinadas. Martínez-Díaz et al. (2013) observaram em amostras de fezes de pintos de ema, *R. americana*, em fazendas na Argentina,

formas císticas mononucleadas e cisto com oito núcleos em emas adultas, *Rhea pennata*, e caracterizou como *E. bovis*-like e *E. coli*-like, respectivamente. Assim como os autores citados as formas encontradas nas sete emas eram na maioria mononucleadas (Figura 6) e mais raramente verificou-se formas com até dois núcleos, no entanto, a identificação de espécies dos gêneros *Entamoeba* ou até espécies de outros gêneros como *Iodamoeba* e *Endolimax* não podem ser feita com confiabilidade apenas pelos caracteres morfológicos (RAVDIN, 1994; HAQUE et al., 1997; VERWEIJ et al., 2003). Das sete aves onde se verificou morfológicamente formas císticas mononucleadas (Figura 6), em seis foram confirmadas a presença de *Entamoeba* pela PCR (Figura 17), no entanto, a confirmação da espécie presente nas fezes das emas só poderá ser feita através do sequenciamento dos produtos da PCR. Vários protozoários já foram descritos em fezes de ratitas, *Cryptosporidium* spp., oocistos compatíveis com *Isospora* spp. e *Eimeria* spp., *Balantidium struthionis*, *Entamoeba* spp., *Endolimax* sp., *Iodamoeba* sp., *Histomonas meleagridis*, *Monocercomonas* sp., *Tetratrichomonas gallinarum*, *Trichomonas gallinae*, *Giardia* spp., *Spironucleus meleagridis*, *Chilomastix gallinarum*, *Retortamonas* sp., *Pleuromonas jaculans*, Euglenoidea e *Blastocystis* sp. (PONCE GORDO et al., 2002). No entanto, em nenhum destes foi confirmado molecularmente a espécie observada.

Cistos de *Entamoeba* com média e desvio-padrão de $13,47 \pm 1,98$ μm , respectivamente, foram observados em avestruzes da Espanha (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2000). Sotiraki et al. (2001) e Pennycott e Patterson (2001) também observaram cistos de um núcleo com 10-15 μm de diâmetro em avestruzes da Europa. Posteriormente, Ponce Gordo et al. (2002) também observaram cistos uninucleados em ratitas. O mesmo autor propôs uma nova espécie, de 8 a 20 μm de diâmetro, e designou como *E. struthionis* (PONCE GORDO et al., 2004). Os cistos de *Entamoeba* sp. encontrados nesse estudo tiveram valores médios mensurados de 41 μm e 37,75 μm de diâmetro maior e menor respectivamente (Tabela 1), estes valores foram maiores que aqueles já encontrados para o grupo de *E. bovis* descritos pelos autores anteriormente citados, e isto pode ser considerada uma característica diferencial morfológica peculiar, no entanto, confirmação necessita de sequenciamento do produto da PCR (Figura 17).

Do ponto de vista econômico e sanitário, o grupo dos coccídios é o mais importante entre os protozoários. A maior prevalência de oocistos em fêmeas pode

ser explicada pela baixa do sistema imunológico durante o período de postura ficando mais susceptíveis às doenças. Existem poucos relatos referentes a presença de *Isospora* e *Eimeria* em ratitas. Há apenas uma espécie descrita nessas aves, *Isospora struthionis* de um avestruz em um zoológico russo (YAKIMOFF, 1940). Outras espécimes foram designadas como *Isospora* sp. (JANSSON e CHRISTENSSON, 2000; CHANG REISSIG et al., 2001) ou *Eimeria* sp. (SOTIRAKI et al., 2001; CHANG REISSIG et al., 2001). A escassez de relatos sobre a morfologia desses coccídios pode ser justificado pela demora no tempo de esporulação dos oocistos isolados o que dificulta sua identificação.

Formas semelhantes a oocistos de *Eimeria* foram observados (Figura 8) em uma das aves, sem que fosse possível sua mensuração. Oocistos de *Eimeria* observados em emas, *R. pennata*, na Argentina possuíam valor médio de diâmetro maior de 26 μm e valor médio de diâmetro menor de 23,7 μm (CHANG REISSIG et al., 2001), no entanto, estes pesquisadores não relatam se os oocistos mensurados estavam esporulados e nem descrevem morfologicamente o coccídio observado o que impossibilita uma comparação, uma vez que pode haver erro de diagnóstico dos oocistos quando estes não estão esporulados.

Ovos do tipo Strongylida encontrados nas fezes das emas (Figura 9) teve diâmetro maior médio (119,58 μm) um pouco menor que os descritos para *Deletrocephalus dimidiatus* 150-160 μm (VAZ, 1936; TAYLOR et al, 2000) e bem menor que o diâmetro maior dos ovos parecidos com os do tipo Strongylida encontrados em *R. americana* da Argentina 170 μm (MARTÍNEZ-DÍAZ, 2013), assim como, os ovos descritos de *Paradeletrocephalus minor* 190-200 μm por Acomolli et al. (2006), no entanto, foi observado que a média do diâmetro menor dos ovos 69,64 μm , foi semelhante ao diâmetro menor dos ovos de *D. dimidiatus* 70 μm (VAZ, 1936; TAYLOR et al, 2000), dos ovos parecidos com estrongilídeos observados por Martínez-Díaz (2013) em *R. americana* (65 μm) e dos ovos de *P. minor* 60-70 μm (ACOMOLLI et al, 2006). De acordo com esses dados, principalmente, pelo diâmetro maior dos ovos do tipo Strongylida das emas (Tabela 1), pode-se inferir que estes são de *Deletrocephalus* sp.. O nematóide intestinal mais frequente em *R. americana* é *D. dimidiatus* (ZETTERMANN et al., 2005), que é considerado de importância por ser responsável em, infecções elevadas, pelo aparecimento de uma síndrome de anemia em emas devido ao hábito deste nematóide se alimentar com sangue do hospedeiro (CRAIG e DIAMOND, 1996). No entanto, a diferenciação de *D.*

dimidiatus e *D. cesarpinto* não pode ser feita apenas pelas diferenças morfológicas e morfométricas dos ovos.

Ovos de helmintos identificados como de *Capillaria* sp. (Figura 10) com valor médio de diâmetro maior de 30,63 μm e valor médio de diâmetro menor de 16,83 μm , foram observados nas fezes das emas. Em ratitas, a espécie *Capillaria parvumspinosa* foi descrita em emas da Europa (YAMAGUTI, 1961). Ovos identificados como *Capillaria* sp. foram encontrados em *Rhea pennata* por Chang Reissig et al. (2001), por Uhart et al. (2006) em *Rhea americana*, por Jansson e Christensson (2000) em amostras de emu (*Dromaius novaehollandiae*) e por Ponce Gordo et al. (2002) em fezes de avestruz. No entanto, espécies do gênero *Capillaria* não podem ser identificadas pela morfologia do ovo (YABSLEY, 2008), portanto, prefere-se identificar este ovo como pertencente a um nematóide da subfamília Capillariinae até que um diagnóstico com base na morfologia de larvas infectantes deste parasita ou da análise molecular do mesmo seja feita.

Ovos de nematóide semelhantes aos ovos de *Baylisascaris* sp. foram encontrados nas emas (Figura 11) e estes tinham em média 91,45 μm de diâmetro maior e 86,67 μm de diâmetro menor (Tabela 1). Nematóides deste gênero já foram descritos em outras ratitas (KAZACOS et al., 1982; KAZACOS et al., 1991). Este foi transmitido para avestruzes nos EUA por gambás e guaxinins através de material fecal em que os ovos permaneceram viáveis no solo durante anos e provocaram lesões no sistema nervoso central (COOPER, 2005), no entanto, até a presente data, esses vermes não foram descritos em emas e este é o primeiro relato de ovo deste parasita em fezes de *R. americana*. Por este parasita ter potencial de acometer o homem, se faz necessária a realização de mais estudos sobre este e a adoção de medidas de controle e erradicação (WILLIAMS et al., 1997; KOHEK JUNIOR, 1998) em emas criadas em cativeiro.

Ovos descritos por Ederli (2012) como ovos pequenos, com casca espessa e lisa, contendo uma larva com um pequeno opérculo em ambos os lados, foram observados nas fezes das aves investigadas. Esta pesquisadora observou estes ovos dentro de fêmeas de *Sicarius uncinipenis* que parasitavam a moela de uma ema necropsiada. Além da semelhança morfológica as medidas médias de diâmetro maior e menor (Tabela 1) foram bastante semelhantes aos ovos mensurados por Ederli (2012), que tiveram dimensões $44,56 \pm 3,17$ (35,50–50,69) de diâmetro maior por $25,58 \pm 1,92$ (20,81–31,56) de diâmetro menor, confirmando assim o diagnóstico

da presença de ovos de *S. uncinipenis* nas fezes das emas. Medidas semelhantes também foram citadas por outros autores para ovos semelhantes aos de *Sicarius* sp. (VAZ, 1936; FREITAS e LENT, 1947). Ovos não larvados e com as mesmas medidas e forma foram encontrados nas fezes das emas e caracterizados como semelhantes aos de *Sicarius* sp. (Figura 13) que provavelmente foram expelidos não fecundados, visto que nesta espécie a formação da larva ocorre ainda no interior do útero do nematóide como descrito por Ederli (2012). Realça-se a hipótese de eliminação de ovos inférteis com a baixa carga parasitária observada nos exames realizados que podem estar influenciando na capacidade de machos fertilizarem o grande número de ovos produzidos pelas fêmeas como observado por Ederli (2012).

Oocistos de coccídios foram encontrados nas fezes de praticamente todas as aves analisadas e todos os animais se mostravam aparentemente saudáveis, uma vez que nenhuma doença clínica ou patologia foi observada durante o período de coleta. Desta forma, pode-se considerar que em infecções com a carga parasitária observada estes protozoários não são patogênicos para emas, no entanto, a patogenicidade de coccídios encontrados em emas adultas exigem investigações experimentais para uma real avaliação dos possíveis danos causados a esta ave. Geralmente coccídios mostram variação na patogenicidade na maioria dos hospedeiros (SOULSBY, 1986) e a não observação de sinais clínicos pode ser devido ao fato de que foram obtidos baixos valores nas contagens dos oocistos, visto que geralmente sinais clínicos são observados em contagens altas de oocistos principalmente de estirpes patogênicas (SOULSBY, 1986). Outra hipótese seria atribuído ao caráter não patogênico da espécie observada. Segundo Mushi et al. (1998) avestruzes jovens tiveram uma maior proporção de infecção aparente e, similarmente, a contagem de oocistos foi maior nos filhotes dessas aves sendo observado sinais mais característicos da doença nesta faixa de idade. Concordando com este autor as emas adultas deste experimento podem ter desenvolvido uma resistência aos coccídios diagnosticados.

Os oocistos de *Isospora* encontrados nas fezes das emas do presente estudo (Figura 13) não possuíam grânulo polar, os esporocistos ovóides tinham corpo de stieda achatado e corpo de substieda em formato pontiagudo, proeminente ou ondulado e resíduo formado por grânulos dispersos de variados tamanhos. Os esporozoítos possuíam um corpo refrátil oblongo e um núcleo. Já oocistos encontrados em avestruzes por Yakimoff (1940) e denominados *Isospora struthionis*,

possuíam formato redondo com parede dupla e dois esporocistos, sem corpo residual, porém, presença de dois grânulos polares. Esporocistos em forma de limão com quatro esporozoítos cuja estrutura era difícil de definir e presença de corpo de stieda pontiagudo. Devido as diferenças morfológicas dos oocistos podemos inferir que a espécie de *Isospora* da ema é diferente da observada em avestruzes e este é o primeiro trabalho de descrição morfológica de *Isospora* sp. em emas, *R americana*.

Através das medidas dos oocistos (Tabela 2) de *Isospora* sp. isolados em fezes das emas, *R. americana*, principalmente pelo valor médio do índice morfométrico foi confirmando a descrição de oocistos como de esféricos a subesféricos. Além da morfometria dos oocistos, foi realizado também a morfometria dos esporocistos (Tabela 3), indicando o aspecto ovóide dos mesmos observando-se o índice morfométrico. Embora aferidos as medidas para o corpo de stieda e corpo de substieda (Tabela 4), estes valores servem somente para futuras análises morfológicas e morfométricas comparativas de oocistos em ratitas uma vez que não há dados na literatura a respeito destas medidas em oocistos nestas aves. A única espécie de isospora descrita em ratitas, *Isospora struthionis*, foi isolada de avestruzes e as medidas de diâmetro 30,6 µm e de seus esporocistos 18 x 10,8 µm foi relatado por Yakimoff (1940). Os valores médios de oocistos e esporocistos encontrados nas emas são menores que o valor citado por Yakimoff (1940), porém, oocistos menores e maiores foram observados o que caracteriza um dimorfismo, principalmente, relacionado ao tamanho dos oocistos dessas aves. Em avestruzes jovens de Botswana na África foram encontrados oocistos elipsóides com média do diâmetro maior de 28 µm e média do diâmetro menor de 22 µm (MUSHI et al., 1998). Estes autores também observaram oocistos esféricos a subesféricos com média do diâmetro maior e menor de 21 x 21 µm. Os oocistos das emas tiveram valores médios de diâmetros um pouco maiores que os oocistos esféricos/subesféricos encontrados por Mushi et al. (1998). Oocistos observados em avestruzes, *S. camelus* e emas, *R. americana*, da Europa possuíam tamanho de 12-15 µm (PONCE GORDO et al., 2002), ou seja bem menor do que os observados nas emas do presente estudo e os observados nas avestruzes da África o que pode caracterizar que as *Isospora* dos avestruzes são espécies distintas das das emas e que pode haver espécies diferentes infectando emas criadas na Europa e América do Sul.

Não foram diagnosticadas amostras positivas para *Cryptosporidium* nas amostras de fezes examinadas pela nested PCR (Figura 15). Existe na literatura relatos da presença de *Cryptosporidium* em fezes de emas e avestruzes (PONCE GORDO et al., 2002; PENRITH e BURGER, 1993). Em avestruzes, *Cryptosporidium* tem sido indicado como causa de prolapso de falo e cloaca (BEZUIDENHOUT et al., 1993; PENRITH e BURGER, 1993; PENRITH et al., 1994), enterite (HUCHZERMEYER, 1999) e necrose pancreática (JARDINE e VERWOERD, 1997). Embora tenha dado resultado negativo para *Cryptosporidium* tanto na microscopia quanto na análise molecular, uma das emas do experimento teve prolapso cloacal sugerindo que este parasita não está relacionado ao prolapso de cloaca dessa ema.

Giardia foi encontrada por Ponce Gordo et al. (2002) em emas nascidas e criadas na Europa. Nas emas do presente estudo não foram diagnosticadas amostras positivas para *Giardia* nas amostras de fezes examinadas pela nested PCR (Figura 16).

7. CONCLUSÕES

- As emas, *R. americana*, do criatório científico da UENF estavam parasitadas de forma enzooótica por espécies de nematóides dos gêneros *Capillaria*, *Baylisascaris*, *Sicarius* e outros da ordem Strongylida, além de coccídios dos gêneros *Eimeria* e *Isospora*;
- Através da caracterização morfológica e morfométrica de oocistos esporulados isolados de fezes de emas, *R. americana*, pode-se inferir que estas aves são parasitadas por pelo menos uma espécie de *Isospora* ainda não descrita em emas e que a falta de descrição da morfologia desse coccídio na literatura científica, provavelmente seja devido ao longo tempo que os oocistos levam para esporular;
- Emas, *R. americana*, albergam em seus tratos gastrointestinais e eliminam *Entamoeba* spp. nas fezes confirmado pela PCR, no entanto, a identificação da espécie presente nas fezes dessas aves, se faz necessário, através do sequenciamento do fragmento de DNA amplificado, para se estabelecer a real relação deste protozoário e o seu potencial hospedeiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRACE, 2008. Disponível em <www.abrace-emas.com.br>. Acesso em: 18 de maio de 2008.

ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRANTE, J.E.; ZHU, G.; LANCTO, C.A.; DENG, M.; LIU, C.; WIDMER, G.; TZIPORI, S.; BUCKQ, G.A.; XU, P.; BANKIER, A.T.; DEAR, P.H.; KONFORTOV, B.A.; SPRIGGS, H.F.; IYER, L.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KAPUR, V. Complete genome sequence of the Apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. **Department of Veterinary and Biomedical Science, College of Veterinary Medicine**, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA., v. 304, n. 5669, p. 441-445, 2004.

ACOMOLLI, J.; OCAYO, D.; SANTA CRUZ, A.C.; MILANO, F.; ROUX, J.P. Aspectos morfológicos de *Paradeletrocephalus minor* (Molin, 1861) Freitas & Lentz, 1947, en ñandú (*Rhea americana*), por medio de microscopio de luz y microscopio electrónico de barrido. **Parasitología Latinoamericana**, v. 61, n. 3-4, p. 183-187, 2006.

AGUIAR, L.M.S.; MAURO, R.A. Ema – Rhea americana. Fauna e Flora do Cerrado, Campo Grande, Junho 2004. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/~rodiney/series/ema/Ema.htm>>. Acesso em: 20 fevereiro de 2012.

AKIYOSHI, D.E.; DILO, J.; PEARSON, C.; CHAPMAN, S.; TUMWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 1828-1832, 2003.

ALLEN, P.C.; FETTERER R.H. Recent advances in biology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 58-65, 2002.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ANTUNES, R.G.; SIMÕES, D.C.; NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, M.V. Natural infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. **Avian Diseases**, v. 52, n. 4, p. 702-705, 2008.

APPELBEE, A.J.; FREDERICK, L.M.; HEITMAN, T.L.; OLSON, M.E.. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 4, p. 289-294, 2003.

BAUMANN, D.; GOTTSTEIN, B. A double-antibody sandwich ELISA for the detection of *Entamoeba histolytica* antigen in stool samples of humans. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 38, n. 2, p. 81-85, 1987.

BECK, C; ARAÚJO DE, F.A.P.; OLICHESKI, A.T.; BREYER, A.S. Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo Método de Faust e cols. (1939) e pela Coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, 2005.

BEDRNIK, P.; JURKOVIC, P.; KUCERA, J.; FIRMANOVA, A. Cross resistance to the iono-phorous polyether anticoccidial drugs in *Eimeria tenella* isolates from Czechoslovakia. **Poultry Science**, v. 68, n. 1, p. 89-93, 1989.

BELLI, S.I.; SMITH, N.C.; FERGUSON, D.J.P. The coccidian: oocyst a tough nut to crack! **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 416-423, 2006.

BERTO, B.P.; BALTHAZAR, L.M.C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. New isosporoid coccidian parasites of sayaca tanager, *Thraupis sayaca*, from South America. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 2, p. 90–94, 2009a.

BERTO, B.P.; FLAUSINO, W.; LUZ, H.B., FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. Two new *Isospora* species from Brazilian tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) of South America. **Parasitology Research**, v. 105, n. 3, p. 635–639, 2009b.

BERTO, B.P.; FLAUSINO, W.; LUZ, H.R.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G.. *Isospora mionectesi* sp. nov. (Apicomplexa, Eimeriidae) from the grey-hooded flycatcher, *Mionectes rufiventris* in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 4, p. 301-304, 2009c.

BERTO, B.P.; LUZ; H.B.; FLAUSINO, W.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. **Systematic Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 75–80, 2009d.

BEZUIDENHOUT, A.J.; PENRITH, M.L.; BURGER, W.P. Prolapse of the phallus and sewer in the ostrich (*Struthio camelus*). **Journal of South African Veterinary Association**, v. 64, p. 156-168, 1993.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 333, n. 1, p. 1-13, 2004.

BRUNING, D.F. Social structure and reproductive behavior of the Gheather Rhea. **Living Bird**, v. 13, p. 251-294, 1974.

CARVALHO-ALMEIDA, T.T. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium spp* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)** São Paulo, Tese de Doutorado-Faculdade de Saúde Pública da USP, 2004.

CASAS, M.C.; DUSZYNSKI, D.W.; ZALLES, L.M. Three new Eimerians in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) populations from eastern Bolivia and southern Venezuela. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 247-251, 1995.

CDC-Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/>>. Acesso em: 15 de março de 2012.

CHACÍN-BONILLA, L. *Cryptosporidium*: phylogeny and taxonomy. **Investigación Clínica**, v. 48, n. 1, p. 1-4, 2007.

CHADEE, K., PETRI, W.A.; INNES, D.J.; RAVDIN, J.I. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 80, n. 5, p. 1245-1254, 1987.

CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 138-146, 2010.

CHANG REISSIG, E.; OLAECHEA, F.; ROBLES, C.A. Parasitological findings of lesser rhea, *Pterocnemia Pennata* (D'orbigny) in faeces from northern Patagonia, Argentina. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 33, n. 2, p. 247-251, 2001.

CHÁVEZ, B.; GONZALEZ-MARISCAL, L.; CEDILLO-RIVERA, R.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.. *Giardia lamblia*: in vitro cytopathic effect of human isolates. **Experimental Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 133-138, 1995.

CONWAY, D.P.; MCKENZIE, M.E. **Coccidiose das aves: diagnóstico e Procedimentos de testes**. 2. ed., São Paulo, 1991.

COOPER, R.G. Bacterial, Fungal and Parasitic Infections in the Ostrich (*Struthio camelus* var. *domesticus*). **Animal Science Journal**, v. 76, n. 2, p. 97-106, 2005.

CORDERO DEL CAMPILLO, M.; CASTAÑÓN, O.I.; REGUERA, F.A.. **Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos**, 2ª Ed., Universidad de León, 650 p., Secretariado de Publicaciones, 1994.

COURA, J.R. **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1ª Ed., 314 p., 2008.

CRAIG, T.M.; DIAMOND, P.L. Parasites of ratites. In: TULLY JR, T.N.; SHANE, S.M., (Eds.), **Ratite Management Medicine and Surgery**, Malabar, Krieger Publishing Company, p. 115-126, 1996.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; DIAS, J.L.C. **Tratado de Animais Silvestres-Medicina Veterinária**, São Paulo, Editora Roca, p. 335-336, 2007.

CURRENT, W.L.; UPTON S.J.; HAYNES T.B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**, v. 33, n. 2, p. 289-296, 1986.

DANFORTH H. In: **Simpósio Internacional sobre Coccidiose Aviária II**, Foz do Iguaçu, Brasil. Proceedings, FACTA, p. 45-52, 1999.

DANI, S.; ANDRADE, M.A.; AZEREDO, R.; SILVA, E.A.; SILVEIRA, J.A. **A ema (*Rhea americana*) biologia, manejo e conservação**, Coleção Manejo de Vida Silvestre, Belo Horizonte: Fundação Acangaú, v. 1, 136 p., 1993.

de GRAAF, D.C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L.M.; ABBASSI, H.; PEETERS, J.E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1269-1287, 1999.

DHILLON, A.S.; THACKER, H.L.; DIETZEL, A.V., WINTERFIELD, R.W. Respiratory cryptosporidiosis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 25, n. 3, p. 747-751, 1981.

DUNNING, J.S.; BELTON, W. **Aves silvestres do Rio Grande do Sul**. 3ª Ed. Porto Alegre, Editora Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, v. 22, n. 3, 1993.

DUSZYNSKI, D.W.; WILBER, P.G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 333-336, 1997.

DUSZYNSKI, D.W. Eimeria. **Encyclopedia of Life Sciences**®, John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

EDERLI, N.B. **Nematoides parasitas de avestruzes, *Struthio camelus* LINNAEUS, 1758 e emas, *Rhea americana* L., 1758: Diagnóstico, Patologia, Taxonomia e Análise Filogenética.** Tese de Doutorado-UENF, 191 p., 2012.

EICHINGER, D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 17-21, 2001.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de medicina interna veterinária, São Paulo, Manole Ltda, 4 ed, v. 1, p. 556-557, 1997.

FAYER, R. General biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, CRC Press, cap. 1, p. 1-42, 2007.

FAYER, R.; SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. Avian cryptosporidiosis. In: Fayer, R. editor. ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**. CRP Press (Boca Raton, FL), p. 1-33, 1997.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D.J.; GARELICK, H.; MARA, D.D. Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management, Washington, DC, **World Bank**, v. 1, 501 p., 1983.

FERNANDEZ, A.; QUEZADA, M.; GOMEZ, M.A.; NAVARRO, J.A.; RODRIGUEZ, J.; SIERRA, M.A. Cryptosporidiosis in chickens from southern Spain. **Avian Diseases**, v. 34, n. 1, p. 224–227, 1990.

FOLCH, A. Order Struthioniformes. In: DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL, J. (Eds.). **Handbook of the birds of the world, Ostrich to Ducks**. Lynx Edit. Barcelona, v. 1, p. 75–110, 1992.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4^a ed. São Paulo: Ícone, p. 67-69, 2004.

FOREYT, W.J. **Parasitologia veterinária—manual de referência**. São Paulo, Editora Roca, 326 p., 2005.

FOTEDAR, R.; STARK, D.; BEEBE, N.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J.; HARKNESS, J. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 1035-1037, 2007.

FREITAS, J.F.T.; LENT, H. 'Spiruroidea' parasitos de 'Rheiformes' (Nematoda). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 45, n. 4, p. 743–760, 1947.

FRIEND, M.; FRANSON, J.C. **Field Manual of Wildlife Diseases**, Madison, Ed. USGS, p. 209-210, 1999.

GAJADHAR, A.A. *Cryptosporidium* species in imported ostriches and consideration of possible implications for birds in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, n. 2, p. 115-116, 1993.

GALHA, V.; BONDAN, E.F.; BONAMIN, L.V.; LALLO, M.A. Coccidiose clínica em frangos de corte infectados naturalmente e imunossuprimidos com dexametasona. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 1, p. 25-31, 2010.

GATHARIM, V.; JACKSON, T.F. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. **South African Medical Journal**, v. 72, n. 10, p. 669-672, 1987.

GENNARI, S.M.; SOUZA, S. Giardíase. **Boletim Técnico**, [s.n.], 2002.

GIANNONI, M.L. **Emas & avestruzes. Uma alternativa para o produtor rural.** Jaboticabal: FUNEP, 49 p., 1996.

GIANNONI, M.L. **Criação de Avestruz.** Viçosa, UFV-UOV, 195 p., 2004.

GILLES, H.M.; JALAN, K.N.; MARTINEZ-PALOMO, A.; MEEROVITCH, E. Amoebiasis and its control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 3, p. 417-426, 1985.

GOODWIN, M.A. Small-intestinal cryptosporidiosis in a chicken. **Avian Diseases**, v. 32, n. 4, p. 844–848, 1988.

GOODWIN, M.A. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Avian Pathology**, v. 18, n. 3, p. 365–384, 1989.

GOODWIN, M.A., BROWN, J., Histologic incidence and distribution of *Cryptosporidium* sp. infection in chickens. **Avian Diseases**, v. 32, n. 2, p. 365–369, 1988a.

GOODWIN, M.A., BROWN, J. Light-microscopic lesions associated with naturally occurring bursal cryptosporidiosis in chickens. **Avian Diseases**, v. 33, n. 1, p. 74–78, 1988b.

GOODWIN, M.A.; DAVIS, J.F. Fatal bronchopneumonia associated with *Cryptosporidium* sp. in a wood duck (*Aix sponsa*). **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v. 7, p. 77–78, 1993.

GOODWIN, M.A.; BROWN, J.; RESURRECCION, R.S.; SMITH, J.A., Respiratory coccidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) among northern Georgia broilers in one company. **Avian Diseases**, v. 40, n. 3, p. 572–575, 1996.

GORHAM, S.L.; MALLINSON, E.T.; SNYDER, D.B. Cryptosporidiosis in the bursa of Fabricius — a correlation with mortality rates in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 16, n. 2, p. 205–211, 1987.

GREINER, E.C.; RITCHIE, B.W. Parasites. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.I.; HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth, FL, Wingers Publishing, p. 1014-1019, 1994.

GRULET, O.; LANDAU, I.; BACCAM, D. Les *Isospora* Du Moineau domestique; multiplicité des espèces. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 57, n. 3, p. 209-233, 1982.

HAMZAH, Z.; PETMITR, S.; MUNGTHIN, M.; LEELAYOOVA, S.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3196- 3200, 2006.

HAQUE, R.; FARUQUE, A.S.; HAHN, P.; LYERLY, D.M.; PETRI JR, W.A. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 3, p. 734-736, 1997.

HARRIS, J.R.; PETRY, F. *Cryptosporidium parvum*, structural components of the oocysts wall. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 839-849, 1999.

HARRIS, J.R.; ADRIAN, M.; PETRY, F. Amylopectin, a major constituent of the residual body in *Cryptosporidium* oocysts. **Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 269-282, 2004.

HECKENDORN, F.; GORAN, E.K.N.; FELGER, I.; VOUNATSOU, P.; YAPI, A.; OETTLI, A., MARTI, H.P.; DOBLER, M.; TRAORÉ, M.; LOHOURIGNON, K,L.; LENGELER, C. Species-specific field-testing of *Entamoeba* spp in an area of high endemicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 521-528, 2002.

HIGGINS, J.Á.; JENKINS, M.C.; SHELTON, D.R.; FAYER, R.; KARNS, J.S. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5321-5324, 2001.

HOPKINS, R.M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 44-51, 1997.

HUANG, B.Q.; CHEN, X.M.; LaRUSSO, N.F. *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro, a morphological study. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 212-221, 2004.

HUANG, D.B.; WHITE, A.C. An Updated Review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 291-314, 2006.

HUCHZERMEYER, F.W. **Patología de avestruces y otras ratites**. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 284 p., 1999.

ITAKURA, C.; GORYO, M.; UNEMURA, T. Cryptosporidial infection in chickens. **Avian Pathology**, v. 13, n. 3, p. 487–499, 1984.

JAKUBOWSKI, W.S. Purple burps and the filtration of drinking water supplies. **American Journal of Public Health**, v. 78, n. 2, p. 123-125, 1988.

JANSSON, D.S.; CHRISTENSSON, D. Gastrointestinala parasiter hos strutsfåglar i Sverige. **Svensk Veterinärtidning**, v. 52, n. 12, p. 621-626, 2000.

JARDINE, J.E.; VERWOERD, D.J. Pancreatic cryptosporidiosis in ostriches. **Avian Pathology**, v. 26, n. 3, p. 665- 670, 1997.

JELLISON, K.L.; DISTEL, D.L.; HEMOND H.F.; SCHAUER, D.B. Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 452-458, 2004.

JOKIPII, A.M.; JOKIPII, L. Prepatency of giardiasis. **Lancet**, v. 1, n. 8021, p. 1095-1097, 1977.

KAWAZOE, U. Coccidiose In: **Doença das Aves**, Campinas: FACTA, p. 391-405, 2000.

KAZACOS, K.R.; WINTERFIELD, R.W.; THACKER, H.L. Etiology and epidemiology of verminous encephalitis in an emu. **Avian Diseases**, v. 26, n. 2, p. 389-391, 1982.

KAZACOS, K.R.; FITZGERALD, S.D.; REED, W.M. *Baylisascaris procyonis* as a cause of cerebrospinal nematodiasis in ratites. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 22, n. 4, p. 460-465, 1991.

KIRKPATRICK, C.E.; FARREL, J.P. Feline giardiasis: observations on natural and induced infections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 10, p. 2182-2188, 1984.

KOHEK JUNIOR, I. **Guia de controle de parasitas internos em animais domésticos**. Nobel (Rio de Janeiro), 111 p., 1998.

LEIB, M.S.; ZAJAC, A.M. Giardiasis infection in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, v. 94, p. 793-802, 1999.

LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology**. 1^a ed. Ames:Iowa State University Press, 414 p., 1985

LEY, D.H. Avian cryptosporidiosis -- An emerging disease. **Scientific Proceedings of the First International Conference**, Zoological and Avian Medicine, Oahu, HI, p. 299-303, 1987.

LILLEHOJ, H.S.; LILLEHOJ, E.P. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. **Avian Diseases**, v. 44, n. 2, p. 408-425, 2000.

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L., Cryptosporidiosis in birds. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. (Eds.), **Cryptosporidiosis of Man and Animals**, CRC Press, Boca Raton, p. 133-148, 1990.

LUDWIG, R.; MARQUES, S.M.T. Primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. em emas (*Rhea americana*) cativas de zoológico no Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 63, n. 1-4, p. 76-80, 2008.

LUMB, R.; SMITH, K.; O'DONOGHUE, P.J.; LANSER, J.A. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. **Parasitology Research**, v. 74, n. 6, p. 531-536, 1988.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R.; HERRERA, S.; CASTRO, A.; PONCE, F. *Entamoeba* sp. (Sarcomastigophora: Endamoebidae) from ostriches (*Struthio camelus*) (Aves: Struthionidae). **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 173-179, 2000.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R.A.; MARTELLA, M.B.; NAVARRO, J.L.; PONCE-GORDO F. Gastrointestinal parasites in greater rheas (*Rhea americana*) and lesser rheas (*Rhea pennata*) from Argentina. **Veterinary Parasitology**, 2013.

McGLADE, T.R.; ROBERTSON, I.D.; ELLIOT, A.D.; READ, C.; THOMPSON, R.C.A. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 251-262, 2003.

MEIRELES, M.V.; PAULILO, A.C.; DA SILVA, G.S.; DA COSTA, A.J.; JÚNIOR, L.D.; MACHADO, R.Z. Infecção experimental por *Cryptosporidium baileyi* em aves de corte I – Aspectos clínicos, parasitológicos e zootécnicos **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 11-14, 1998.

MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M.; dos SANTOS, M.M.; GENNARI, S.M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 623-626, 2006.

MERINO, E.; GLENDER, W.; DEL MURO, R.; ORTIZ-ORTIZ, L. Evaluation of the ELISA test for detection of *Entamoeba histolytica* in feces. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 4, n. 1, p. 39-42, 1990.

MIRELMAN, D.N.; UCHAMOWITZ, Y.; STOLARSKY, T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2405-2407, 1997.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; SAINT, C.P. Molecular biology techniques in parasite ecology. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 551-562, 2002.

MORAIS, M.B. Coccídios: Pequenos parasitas que podem causar grandes problemas. **Melopsittacus. A revista do periquito australiano**, n. 3, 1998.

MORAN, P.; RAMOS, F.; RAMIRO, M.; CURIEL, O.; GONZÁLEZ, E.; GÓMEZ, A., GARCÍA, G.; MELENDRO, E.I.; XIMÉNEZ, C. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*: infection frequency in HIV/AIDS patients in Mexico City. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 3, p. 331-334, 2005.

MORGAN, U.M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S.R.; FAYER, R.; LAL, A.A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-neck parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 3, p. 182-183, 2000.

MORGAN, U.M.; MONIS, P.T.; XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.R.; O'DONOGHUE, P.; GASSER, R.; MURRAY, A.; FAYER, R.; BLAGBURN, B.L.; LAL, A.A.; THOMPSON, R.C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 289-296, 2001.

MOTTA, M.E.F.A.; da SILVA, G.A.P. Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, n. 2, p. 117-127, 2002.

MUNDIM, M.J.S.; SOUZA, S.Z.; HORTÊNCIO, S.M.; CURY, M.C. Freqüência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 6, p. 770-773, 2003.

MUNHOZ, L.; [RUAS, J.L.](#); [FISCHER, G.](#); [HÜBNER, S.O.](#); SALLIS, E.S.; RAFFI, M.B.; ALBANO, A.P.; MINELLO, L.F.; NUNES, C.F.; VARGAS, G.D. Coccidiose em cardeais (*Poroaria coronata*) oriundos de apreensão na cidade de Pelotas- RS. In: **XVIII Congresso de Iniciação Científica**, 2009, Pelotas. Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica. Pelotas:Editora da UFPel, 2009.

MUSHI, E.Z.; ISA, J.F.W.; CHABO, R.G.; BINTA, M.G.; KAPAATA, R.W.; NDEBELE, R.T.; CHAKALIS, K.C. *Coccidia* oocysts in the faeces of farmed ostrich (*Struthio camelus*) chicks in Botswana. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 4, p. 281-284, 1998.

NAROSKY, T.; YZURIETA, D. **Guía para la identificación de las aves de Argentina y Uruguay**. Edição de Ouro. Editora Vázquez Mazzini, 346p., 2003.

NEVES, D.P.; MELO, A.L. DE; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**. 11ª Ed., 494 p., São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7548-7553, 2006.

NÚÑEZ, F.A.; GINORIO, D.E.; FINLAY, C.M. Control de la calidad Del diagnóstico coproparasitológico en la provincia de Ciudad de La Habana, Cuba. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, 1997.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L.; CRABB, J.H.; STERLING, C.R., DUPONT, H.L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1275-1281, 1999.

OLIVA, A.; HERION, P.; CAPIN, R.; ORTIZ-ORTIZ, L.; DEL MURO, R. Diagnosis of *Entamoeba histolytica* in feces by ELISA. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 1, n. 2, p. 322-325, 1987.

OLIVEIRA, F.C.; EDERLI, N.B.; LOPES, C.W.; RODRIGUES, M. de L. Pathological findings in the caeca of naturally infected ostriches, *Struthio camelus* Linnaeus, 1758 (Aves, Struthionidae) parasitized by *Codiostomum struthionis* (Horst, 1885) Railliet and Henry, 1911 (Nematoda, Strongylidae). **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 174-178, 2009.

PARIZZI, R.C.; SANTOS, J.M.; OLIVEIRA, M.F.; MAIA, M.O.; SOUSA, J.A.; MIGLINO, M.A.; SANTOS, T.C. Macroscopic and microscopic anatomy of the oviduct in the sexually mature Rhea (*Rhea americana*). **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 37, n. 3, p. 169-176, 2008.

PATTON, S. An overview of avian coccidia. **Scientific Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians**, Nashville, TN, p. 47-51, 1993.

PENNYCOTT, T.; PATTERSON, T. Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*). **Veterinary Record**, v. 148, n. 5, p. 155-156, 2001.

PENRITH, M.L.; BURGER, W.P. A *Cryptosporidium* sp. in an ostrich. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 64, n. 2, p. 60–61, 1993.

PENRITH, M.L.; BEZUIDENHOUT, A.J.; BURGER, W.P.; PUTTERILL, J.F. Evidence for cryptosporidial infection as a cause of prolapse of the phallus and cloaca in ostrich chicks (*Struthio camelus*). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 4, p. 283–289, 1994.

PEREIRA, J.T.; SOCCOL, V.T.; COSTA, A.O.; CASTRO, E.A.; OSAKI, S.C.; PAULINO, R.C. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 13-25, 2009.

PETRI, W.A.; SMITH, R.D.; SCHLESINGER, P.H.; MURPHY, C.F.; RAVDIN, J.I. Isolation of the galactosebinding lectin which mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*, **Journal of Clinical Investigation**, v. 80, n. 5, p. 1238-1244, 1987.

PICKERING, L.K.; WOODWARD, W.E.; DUPONT, H.L.; SULLIVAN, P. Occurrence of *Giardia lamblia* in children in daycare centers. **Journal of Pediatrics**, v. 104, n. 4, p. 522-526, 1984.

PONCE GORDO, F.; HERRERA, S.; CASTRO, A.T.; GARCÍA DURÁN, B.; MARTÍNEZ DÍAZ, R.A. Parasites from ostriches (*Strutio camelus*) and rheas (*Rhea Americana*) in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 1-2, p. 137-60, 2002.

PONCE GORDO, F.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R.A.; HERRERA, S. *Entamoeba struthionis* n.sp. (Sarcomastigophora: Endamoebidae) from ostriches (*Struthio camelus*). **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 4, p. 327-335, 2004.

POWLEDGE T.M. The polymerase chain reaction. **Advances in Physiology Education**, v. 28, p. 44-50, 2004.

QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E.; CLAVEL, A.; CAUSAPÉ, A.C. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 66, n. 3-4, p. 139–146, 1996.

RAMOS, A.; CABRERA, M.C.; DEL PUERTO, M.; SAADOUN A. Minerals, haem and non-haem iron contents of rhea meat. **Meat Science**, v. 81, n. 1, p. 116-119, 2009.

RANDALL, C.J. Cryptosporidiosis of the bursa of Fabricius and trachea in broilers. **Avian Pathology**, v. 11, n. 1, p. 95-100, 1982.

RAVDIN, J.I. Diagnosis of invasive amoebiasis-time to end the morphology era. **Gut**, v. 35, n. 8, p. 1018–1021, 1994.

RAVDIN, J.I.; GUERRANT, R.L. The role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 68, n. 5, p. 1305-1313, 1981.

REINHARDT, J. Bidrag til Kundskab om Fuglefaunaen i Brasiliens Campos. **Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening**, v. 22, 267 p., 1870.

RENDTORFF, R.C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **American Journal of Hygiene**, v. 59, n. 2, p. 209-220, 1954.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Guanabara Koogam Editora, Rio de Janeiro, 2 Ed., 379 p., 2002.

RITTER, G.D.; LEY, D.H.; LEVY, M.G.; GUY, J.S.; BARNES, H.J. Intestinal cryptosporidiosis and reovirus isolation from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) with enteritis. **Avian Diseases**, v. 30, n. 3, p. 603-608, 1986.

RIVERA, M.; PARTE DE LA, M.A.; HURTADO, P.; MAGALDI, L.; COLLAZO, M. Giardiasis intestinal, Mini-Revisión, **Investigación Clínica**, v. 43, n. 2, 2002.

ROCHELLE, P.A.; DE LEON, R.; STEWART, M.H., WOLFE, R.L. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 106-114, 1997.

ROJAS, M.L.; SÁNCHEZ, H.F.; RAMÍREZ, E.R.; CASTRO, L.T.; ALBARRÁN, A.S.; HERNÁNDEZ, I.G.; ROMERO, H.Q.; KIELMAN, C.A. Comparación del efecto protector de una vacuna y un ionóforo contra la coccidiosis en pollos. **Veterinaria México**, v. 3, n. 25, p. 215-219, 1994.

RYAN, U.M.; XIAO, L. Birds. In: FAYER, R.; XIAO, L. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, cap. 15, p. 395-418, 2007.

RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A.A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4302-4307, 2003a.

RYAN, U.M.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, J.R.; ROBERTSON, I.D.; THOMPSON, R.C.A. Identification of a Novel *Cryptosporidium* Genotype in Pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3970-3974, 2003b.

SAGI, E.F.; SHAPIRO, A.M.; DECKELBAUM, R.J. *Giardia lamblia*: prevalence, influence on growth and symptomatology in healthv nursery children. **Israel Journal of Medical Sciences**, v.19, n. 9, p. 815-817, 1983.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, Vol. 1 e 2, 2001.

SAM-YELLOWE, T.Y. Rhoptry organelles of the Apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. **Parasitology Today**, v. 12, n. 8, p. 308–316, 1996.

SANTÍN, M.; ZARLENGA, D.S. A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 32-37, 2009.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 103–117, 2004.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 1-2, p. 17-24, 2007.

SANTOS, F.L.N.; SOARES, N.M. Mecanismo Fisiopatogênico e Diagnóstico Laboratorial da Infecção pela *Entamoeba histolytica*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 4, p. 249-261, 2008.

SARASQUETA, D.V. Aspectos de la biología reproductiva del Ñandu Petiso (*Pterocnemia pennata*). **Comunicacion Tecnica**, n. 1, Estación Experimental Agropecuaria S.C. de Bariloche, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1990.

SCORZA, A.V.; BREWER, M.M.; LAPPIN, M.R. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* in cat feces. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 423-426, 2003.

SEHGAL, D.; BHATTACHARYA, A.; BHATTACHARYA, S. Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. **Journal of Biosciences**, v. 21, n. 3, p. 423-432, 1996.

SEPULVEDA, B.; MARTINEZ-PALOMO, A. The immunology of amoebiasis produced by *Entamoeba histolytica*. In: COHEN, S.; WARREN, K.S., ed., **Immunology of parasitic infections**, Oxford, Blackwell, p. 170-191, 1982.

SEPULVEDA, B.; MARTINEZ-PALOMO, A. Amoebiasis In: WARREN, K.S.; MAHMOUD, A.A.F., ed., **Tropical and geographical medicine**, New York, McGraw-Hill, p. 305-318, 1984.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira, Uma Introdução**. Editora Universidade de Brasília (UNB), Brasil, v. 1, 482p., 1985.

SILVA, J.B.G. **Rheacultura criação de emas: manual prático nutrição, reprodução, manejo e enfermidades**, 144p., 2001.

SILVA, M.C.M. **Estudo epidemiológico da amebíase no estado do Pará utilizando diferentes metodologias para diagnóstico**. Tese em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará, 150 p., 2005.

SILVA, M.C.M.; MONTEIRO, C.S.P.; ARAÚJO, B.A.V.; SILVA, J.V.; POVOA, M.M. Determinação da infecção por *Entamoeba histolytica* em residentes da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, 2005.

SILVANOSE, C.D.; SAMOUR, J.H.; NALDO, J.I.; BAILEY, T.A. Oro-pharyngeal protozoa in captive bustards: clinical and pathological considerations. **Avian Pathology**, v. 27, n. 5, 526–530, 1998.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp.nov.). **Journal of Comparative Pathology**, v. 65, n. 3, p. 262-266, 1955.

SMITH, H. Diagnostics. In: FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, cap. 6, p. 173-208, 2007.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B.; GRIMASON, A.M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 133- 142, 2005.

SOGAYAR, R. Giardíase. In: FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, cap 23, p. 250-254, 2001.

SOGAYAR, M.I.T.L.; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D.P., et al. **Parasitologia humana**. 10.ed. São Paulo : Atheneu, cap. 14, p.107–113, 2000.

SOTIRAKI, S.T.; GEORGIADES, G.; ANTONIADOU-SOTIRIADOU, K.; HIMONAS, C.A. Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*). **The Veterinary Record**, v. 148, n. 3, p. 84-86, 2001.

SOULSBY, E.J.L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**. Bailliere Tindall London, v. 655, p. 766-791, 1986.

SOULSBY, E.J.L. **Parasitología y enfermedades parasitarias**. 7ª Ed. México: Interamericana, 823 p., 1987.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; McLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D.P.; CRISANTI, A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, n. 2, p. 209-217, 1997.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds - a review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 261-279, 2000.

STAUFFER, W.; RAVDIN, J.I. *Entamoeba histolytica*: an update. **Current opinion in infectious diseases**, v. 16, n. 5, p. 479-485, 2003.

SUKPRASERT, S; RATTAPRASERT, P.; HAMZAH, Z.; SHIPIN, O.V.; CHAVALITSEWINKOON-PETMITR, P. PCR detection of *Entamoeba* spp from surface and waste water samples using genus-specific primers. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 39 (suppl 1), p. 6-9, 2008.

SUNNOTEL, O.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G.; XIAO, L.; MILLAR, B.C.; ROONEY, P.J.; SNELLING, W.J. *Cryptosporidium*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 7-16, 2006.

TARWID, J.N.; CAWTHORN, R.J.; RIDDEL, C. Cryptosporidiosis in the respiratory tract of turkeys in Saskatchewan. **Avian Diseases**, v. 29, n. 2, p. 528-532, 1985.

TAYLOR, M.A.; HUNT, K.R.; SMITH, G.; OTTER, A. *Deletrocephalus dimidiatus* in greater rheas (*Rhea americana*) in the UK. **The Veterinary Record**, v. 146, n. 1, p. 19-20, 2000.

TENTER, A.M.; BARTA, J.R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D.W.; MEHLHORN, H.; MRRISON, D.A.; THOMPSON, R.C.A.; CONRAD, P.A. The conceptual basis for a new classification of the coccidian. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 595-616, 2002.

TETLEY, L.; BROWN, S.M.; McDONALD, V.; COOMBS, G.H. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. **Microbiology**, v. 144, n. 12, p. 3249-3255, 1998.

THAM, V.L.; KINESBERG, S.; DIXON, B.R. Cryptosporidiosis in quails. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A.**, v. 11, n. 4, p. 619–626, 1982.

THOMPSON, R.C.A.; CONSTANTINE, C.C.; MORGAN, U.M. Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology? **Parasitology**, v. 117, S.161-175, 1998.

THOMPSON, R.C.; CHALMERS, R.M. *Cryptosporidium*: from molecules to disease. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 98-100, 2002.

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 210-213, 2000.

TROTZ-WILLIAMS, L.A.; MARTIN, D.; GATEI, W.; CAMA, V.; PEREGRINE, A.S.; MARTIN, S.W.; NYDAM, D.V.; JAMIESON, F.; XIAO, L. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 346-352, 2006.

TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 12-13, 1907.

TYZZER, E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v. 23, n. 3, p. 487-511, 1910.

TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archiv für Protistenkunde**, v. 26, p. 394-412, 1912.

UHART, M.; APRILE, G.; BELDOMENICO, P.; SOLÍS, G.; MARULL, C.; BEADE, M.; CARMINATI, A.; MORENO, D. Evaluation of the Health of Free-Ranging Greater Rheas (*Rhea americana*) in Argentina. **Veterinary Record**, v. 158, n. 9, p. 297-303, 2006.

UMEMIYA, R.; FUKUDA, M.; FUJISAKI, K.; MATSUI, T. Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1034-1039, 2005.

UPTON, S.J. Suborder Eimeriorina Léger, 1911. In: LEE, J.J.; LEEDALE, G.F.; BRADBURY, P. **An illustrated Guide to the Protozoa**, 2 ed. London: Society of Protozoologists, p. 318-339, 2000.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 197- 203, 1998.

VERONESI, R.; FOCACCIAR, R. **Tratado de infectologia**. Editora Atheneu, 4ª Ed., São Paulo, 2320 p., 1997.

VAZ, Z. Estudos sobre nematoides parasitas da ema (*Rhea americana*). **Archivos del Instituto de Biología**, v. 7, n. 21, p. 253-266, 1936.

VERWEIJ, J.J.; OOSTVOGEL, F.; BRIENEN, E.A.T.; NANG-NEIFUBAH, A.; ZIEM, J.; POLDERMAN, A.M. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana. **Tropical Medicine & International Health**, v. 8, n. 12, p. 1153-1156, 2003.

WETZEL, D.M.; SCHMIDT, J.; KUHLENSCHMIDT, M.S.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5379-5387, 2005.

WIDMER, G.; LIN, L.; KAPUR, V.; FENG, X.; ABRAHAMSEN, M.S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and Infections**, v. 4, n. 10, p. 1081-1090, 2002.

WHITTINGTON, R.J., WILSON, J.M. Cryptosporidiosis of the respiratory tract in a pheasant. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, p. 284–285, 1985.

WILLIAMS, C.K.; MCKOWM, R.D.; VEATCH, J.K.; APPLGATE, R.D. *Baylisascaris* sp. found in a wild northern bobwhite (*Colinus virginianus*). **Journal of Wildlife diseases**, v. 33, n. 1, p. 158-160, 1997.

WILLIAMS, R.. **The development, efficacy and epidemiological aspect of Paracox, a new Coccidiosis vaccine for chickens**. Coccidiosis Section, Editora Pitman-Moore Europe, Breakspear Road South, Harefield, Uxbridge UB 9, GLS, United Kingdom, 16 p., 1992.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J.; FAYER, R.; LAL, A.A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999.

YABSLEY, M.J. Capillarid Nematodes. In: ATKINSON, C.T.; THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B. (Eds.), **Parasitic Diseases of Wild Birds**. John Wiley & Sons, Inc., p. 463-497, 2008.

YAKIMOFF, W.L. *Isospora struthionis* n. sp., coccidie de l'autruche africaine, **Annates de la Societe beige de Medecine Tropicale**, v. 20, p. 137-138, 1940.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum**, Vol. III: The Nematodes of Vertebrates, Part 1, Interscience, New York, 1261 p., 1961.

YODER, J.S.; BEACH, M.J. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 31-39, 2010.

ZETTERMANN, C.D.; NASCIMENTO, A.A.; TEBALDI, J.A.; SZABO, M.J.P. Observations on helminth infections of free-living and captive rheas (*Rhea americana*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n.1-2, p. 169-172, 2005.

ZHOU, L.; KASSA, H.; TISCHLER, M.L.; XIAO, L. Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4211-4215, 2004.