

EFICÁCIA ANTI-HELMÍNTICA E ANATOMOPATOLOGIA EM
PROVENTRÍCULO E VENTRÍCULO DE AVESTRUZES INFECTADOS
POR *Libyostrongylus dentatus* e *L. douglassii*
(NEMATODA TRICHOSTRONGYLIDAE)

LARA PEREIRA DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO- UENF
Campos dos Goytacazes-RJ
ABRIL-2013

EFICÁCIA ANTI-HELMÍNTICA E ANATOMOPATOLOGIA EM
PROVENTRÍCULO E VENTRÍCULO DE AVESTRUZES INFECTADOS
POR *Libyostrongylus dentatus* e *L. douglassii*
(NEMATODA TRICHOSTRONGYLIDAE)

LARA PEREIRA DE SOUZA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular”.

Orientador: Prof. Clóvis de Paula Santos

Coorientador: Prof. Renato Augusto DaMatta

EFICÁCIA ANTI-HELMÍNTICA E ANATOMOPATOLOGIA EM
PROVENTRÍCULO E VENTRÍCULO DE AVESTRUZES INFECTADOS POR
Libyostrongylus dentatus e *L. douglassii*
(NEMATODA TRICHOSTRONGYLIDAE)

LARA PEREIRA DE SOUZA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular”.

APROVADA EM 03 DE ABRIL DE 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Carlos Wilson Gomes Lopes (Dr. Patologia) – UFRRJ



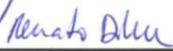
Leonardo Serafim da Silveira (Dr. Produção Animal) – UENF



Milton Masahiko Kanashiro (Dr. Biociências e Biotecnologia) – UENF



Clóvis de Paula Santos (Dr. Med. Vet. Parasit. Vet.) – UENF (orientador)



Renato Augusto DaMatta (Dr. Ciências) – UENF (Co-orientador)

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

509 / 2013

Souza, Lara Pereira de

Eficácia anti-helmintica e anatomopatologia em proventriculo e ventriculo de
avestruzes infectados por *Libyostrongylus dentatus* e *L. douglassii* (Nematoda
Trichostrongylidae) / Lara Pereira de Souza. -- Campos dos Goytacazes, 2013.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e
Biotecnologia. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual.

Área de concentração: Biologia celular

Orientador: Santos, Clóvis de Paula

Bibliografia: f. 42-47

1. *Libyostrongylus dentatus* 2. *Libyostrongylus douglassii* 3. Eficácia
anti-helmintica 4. Anatomopatologia I. Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro II. Título

571.6

S729e

Dedico esta dissertação à minha querida e amada avó Zizelda (*in memoriam*) por ter lutado por minha vida e me dedicado seu amor. Por ter me deixado a lição de garra, coragem e a sabedoria sobre importância do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Josiete Miranda Pereira e Fernando Alves de Souza por terem acreditado me incentivando continuar a caminhada e por entenderam minha ausência em reuniões familiares.

Ao meu avô José por sempre ter sido um grande incentivador dos meus estudos.

À Professora Dra. Nadir Sant'Ana do Centro de Biociências e Biotecnologia no (LBCT), por ter me recebido inicialmente no LBCT e as oportunidades que me ofereceu durante o tempo que trabalhei junto a sua equipe.

Ao Professor Dr. Clóvis de Paula Santos meu orientador, por ter me confiado este projeto e por ter me ajudado nas saídas de campo, além dos ensinamentos na bancada.

Ao Professor Dr. Renato Augusto DaMatta, pela coorientação, por tantos ensinamentos e por ter acreditado em minha força de vontade.

Ao Professor Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal no CCTA, pela agradável colaboração e pelos ensinamentos em patologia.

Ao médico veterinário Raphael Mansur Medina mestrando do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal no CCTA, por me ajudar com as lâminas e a compreender os resultados de patologia.

Ao Douglas Escocard pela ajuda nos cortes histológicos e pela amizade de anos.

Aos técnicos do LBCT e LSA, por muito terem me ajudado nos experimentos.

Aos meus colegas de trabalho e amigos da equipe que fiz durante esta caminhada, em especial à Pós-doutoranda Dra. Josiana Gomes de Andrade e à Doutoranda Letícia Oliveira da Rocha, pelos ensinamentos e pela grande amizade que nasceu neste período de trabalho intenso e que fez crescer ainda mais a admiração pela dedicação de vocês pelo trabalho.

Ao meu amado Alex Martins dos Santos pelo companheirismo e por dividir comigo grande parte deste processo, me encorajando e compreendendo.

SUMÁRIO

	Págs.
I- Introdução	12
II- Revisão de literatura	13
2.1- Avestruzes	13
2.2- Estrutocultura	15
2.3- Parasitos	16
2.4- Gênero <i>Libyostrogylus</i>	17
2.4.1- Distribuição Geográfica	21
2.4.2- Patogenicidade	22
2.4.3- Tratamento anti-helmíntico	22
III- Objetivos	24
IV- Material e métodos	25
4.1- Avestruzes	25
4.2- Teste anti-helmíntico	25
4.3- Coproculturas	26
4.4- Histopatologia	26
4.5- Coleta e quantificação de nematóides adultos	28
V- Resultados	28
5.1- Eficácia anti-helmíntica	29
5.2- Quantificação de nematóides no proventrículo e ventrículo de avestruz.	29
5.3- Anatomopatologia de proventrículos e ventrículos infectados por <i>Libyostrogylus dentatus</i> e <i>L. douglassii</i> .	31
VI- Discussão	38
VII- Conclusões	41
VIII- Referências bibliográficas	42
IX- Apêndice	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pags.
Figura 1- Esquema do proventrículo e ventrículo de avestruzes.	15
Proventrículo (Pr) e ventrículo (V) de avestruzes, região da área glandular (A), do duodeno (B) e esôfago (C). Fonte: Fowler, 1991.	
Figura 2- Ciclo de vida do gênero <i>Libyostrongylus</i> ssp	18
Figura 3. Imagem de <i>Libyostrongylus</i> por microscopia de contraste de interferência.	19
(A-D) <i>L. douglassii</i> : (A) extremidade cefálica, ausência de dente esofágico; Barra: 50µm; (B) ovijector curto mostrando a região dos esfíncteres e vestibulo (entre setas) e a posição da vulva (ponta de seta) Barra: 260µm; (C) ausência de inflação cuticular da fêmea ao nível do ânus e com a ponta da cauda arredondada; Barra: 30µm. (D) espículos com extremidade final pontiaguda; Barra: 40µm. (E-H) <i>L. dentatus</i> . (E) Demonstra extremidade cefálica e proeminente dente esofágico (seta); Barra: 30µm. (F) ovijector longo mostrando a região dos esfíncteres e vestibulo (entre setas) e a posição da vulva (ponta de seta); Barra: 260µm. (G) Inflação cuticular na cauda da fêmea no nível do ânus (seta) e ponta da cauda digitada; Barra: 30µm. (H) espículos com extremidade final arredondada. Fonte: Ederli et al., 2008 ^a	
Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Libyostrongylus</i>.	20
(A e B) <i>L. dentatus</i> . (A) Vista apical da extremidade cefálica da fêmea exibindo papilas exteriores (setas grandes), papilas interiores (setas), anfídios (ponta de seta) dente esofágico (T). (B) Vista ventro-lateral da extremidade caudal de uma fêmea com inflação cuticular proeminente no nível do ânus (a) e ponta digitada; Barra: 5 e 20 µm respectivamente. (C e D) <i>L. douglassii</i> . (C) Vista apical da extremidade cefálica da fêmea, exibindo papilas exteriores (seta grande), papilas interiores (seta), anfídios (ponta de seta) e abertura oral (Ao) centralmente localizada; (D) Cauda da fêmea com ponta arredondada sem inflação cuticular próximo ao ânus (a). Barra: 5 e 20 µm respectivamente. Fonte: Ederli et al., 2008a.	
Figura 5. Microscopia eletrônica de contraste de fase, desenho esquemático e microscopia eletrônica de varredura de larvas infectantes de <i>Libyostrongylus</i>.	21
(a e b) microscopia eletrônica de contraste de fase de <i>Libyostrongylus dentatus</i> (a) e <i>L. douglassii</i> (b). desenho feito a mão evidenciando ao final da cauda o botão, o que identifica o gênero e a diferença entre o comprimento da bainha de <i>L. dentatus</i> (c) e <i>L. douglassii</i> (d) demonstrando a diferença entre larvas de <i>L. dentatus</i> e <i>L. douglassii</i> (e) <i>L. dentatus</i> e (f) <i>L. douglassii</i> respectivamente em microscopia eletrônica de varredura. Barra: 30µm. Fonte: Ederli et al., 2008b.	
Figura 6- Estômago de avestruz com as áreas analisadas demarcadas.	27
(A) Região anterior do proventrículo, (B) região glandular do proventrículo, (C) região distal do proventrículo, (D) região anterior do ventrículo, (E) região média do ventrículo, (F) região distal do ventrículo. Barra: 7 cm.	

Figura 7. Proventrículos de animais sob alta e baixa infecção de *Libyostrongylus dentatus* e *L. douglassii*. (A) Proventrículo de um animal sob baixa infecção, sem lesão aparente entre papilas. (B) Proventrículo de animal sob alta infecção, demonstrando áreas vermelhas e aparentes lesões entre papilas (setas). (C) Proventrículo de animal sob alta infecção demonstrando lesão entre papilas (seta). (D) Aumento da imagem “C” demonstrando lesão provocada por nematóides (seta). Barra:7 cm. 32

Figura 8. Cortes histológicos do proventrículo de animais sob baixa e alta infecção de *Libyostrongylus dentatus* e *L. douglassii*. (A) Imagem demonstra hiperemia moderada (setas). (B) Imagem demonstra lesões erosivas/ulcerativas (setas). Coloração em H&E. Barras: 100µm. 33

Figura 9. Adenômeros na região glandular do proventrículo e suas células epiteliais.(A) Imagem de adenômero normal (setas grossas) e adenômeros parasitados (setas finas) com arquitetura danificada e aumento de secreção (asterísco). Barra = 600µm. (B) Adenômero não parasitado com ducto secretor normal. Barra = 500µm. (C) Epitélio não danificado com clara preservação do glicocálix (setas). Barra = 10µm. (D) Epitélio danificado (seta) próximo ao nematóide (seta longa). (E) Epitélio danificado com glicocálix destruído (setas). Coloração H&E. Barra: = 10µm. 34

Figura 10: Marcação de peroxidase em esfregaço sanguíneo e proventrículo de avestruzes infectadas com *Libyostrongylus douglassii* e *L. dentatus*. (A) Esfregaço sanguíneo corados com H&E demonstrando a presença de granulócitos (setas). Barra: 10µm. (B) Marcação por peroxidase demonstrando eosinófilo peroxidase positivo (seta fina) e heterófilo peroxidase negativo (seta). Barra: 10 µm. (C) Região anterior do proventrículo corado com H&E demonstrando granulócitos (setas)no interior da glândula (círculo). Barra: 10µm. (D) Marcação para peroxidase em corte subsequente da imagem “A” confirmando a presença de heterófilos (granulos peroxidase negativos - setas). Barra: 10µm. 35

Figura 11- Análises anatomopatológicas de proventrículo e ventrículo de avestruz. (A) Região glandular do proventrículo, nematóide inserido na luz da glândula (seta simples), glândulas do proventrículo (seta dupla), debris celulares (asterísco). Barra: 50 µm. (B) Região posterior do ventrículo, ovos de nematóide inseridos na camada queratinóide (seta grossa), nematóides inseridos na camada queratinóide (setas finas). Barra: 50µm. (C) Região mediana do ventrículo; glândulas do ventrículo (seta dupla), camada queratinóide (asterísco), ovos inseridos na membrana queratinóide (seta simples). Coloração em H&E. Barra: 20µm. 37

ÍNDICE DE TABELAS

	Pags.
Tabela 1- Eficácia anti-helmíntica de albendazol, ivermectina e moxidectina contra <i>Libyostrongylus douglassii</i> e <i>L. dentatus</i> em avestruzes no estado de Minas Gerais, Brasil.	29
Tabela 2 - Tabela 2 - Recuperação de adultos de <i>Libyostrongylus</i> encontrados em fragmentos de tecido por região do proventrículo e ventrículo de avestruzes sob baixa infecção.	30
Tabela 3 - Tabela 3-Recuperação de adultos de <i>Libyostrongylus</i> encontrados em fragmentos de tecidos por região do proventrículo e ventrículo de avestruzes sob alta infecção.	31

RESUMO

O gênero *Libyostrongylus* é composto por três espécies de nematóides que parasitam proventrículo e ventrículo de aves. *Libyostrongylus dentatus* e *L. douglassii* ocorrem no território brasileiro e não existem estudos relacionados à eficácia de anti-helmínticos contra o primeiro e pouco em relação ao segundo. Ademais, pouco se sabe sobre a distribuição dessas espécies e possíveis alterações anatomopatológicas em regiões do proventrículo e ventrículo. O presente trabalho avaliou a eficácia anti-helmíntica contra esses nematóides, e a distribuição e alterações anatomopatológicas dessas espécies nas regiões do proventrículo e ventrículo de aves com alta e baixa infecção. Aves foram tratadas com albendazol, ivermectina ou moxidectina e as fezes coletadas no dia do tratamento e 13 dias após para a contagem do número de ovos por grama de fezes e coproculturas. A porcentagem de larvas sobreviventes ao tratamento e a atividade anti-helmíntica dos fármacos foram calculados. Aves foram necropsiadas e amostras teciduais das regiões anterior, média e posterior de proventrículo e ventrículo foram coletadas e processadas para contagem de parasitos e análise anatomopatológica. Eficácia de 60% foi encontrada para ivermectina enquanto para albendazole e moxidectina foi de 100%. Ambas as espécies de *Libyostrongylus* apresentaram resistência à ivermectina. O proventrículo foi o órgão mais parasitado sem aparente preferência pelas regiões analisadas. Infiltrados heterofílicos foram observados em animais infectados e quando sob alta infecção estão concentrado próximo aos nematóides. Os ovos de nematóides foram observados somente na camada queratinóide do ventrículo médio e posterior dos animais. Na região glandular do proventrículo, nematóides localizam-se no ducto secretor dos adenômeros e provocam lesões graves com erosões e ulcerações, danificando o epitélio glandular. Esses dados contribuem para o controle do *Libyostrongylus*, bem como o conhecimento da biologia destes parasitos no sítio tecidual infectado.

ABSTRACT

Libyostrongylus genus include three species of nematodes that parasitize proventriculus and ventriculus of ostriches. *Libyostrongylus dentatus* and *L. douglassii* occur in Brazil and there are no studies related to the efficacy of anthelmintics efficacy to against the *L. dentatus* and just a little is known about *L. ouglassii* one. The same is observed in the distribution of these species and the possible anatomopathological changes in different regions of the proventriculus and ventriculus. This study evaluated the efficacy anthelmintic against *Libyostrongylus dentatus* and *L. douglassii* and distribution of these species and pathological changes in the regions of the ventriculus and proventriculus of ostriches with high and low infection. Ostriches were treated with albendazole, ivermectin or moxidectin and feces were collected at the same day of treatment and after 13 days to count the number of eggs per gram of feces and fecal cultures. The surviving larvae to treatment and anthelmintic activity of the drugs were calculated. Proventriculus and ventriculus were necropsied and tissue samples from the anterior, middle and posterior region were collected and processed for counting of parasites and pathological analysis. Efficacy of 60% was found for ivermectin, but albendazole and moxidectin was 100%. Both species of *Libyostrongylus* showed resistance to ivermectin. The proventriculus was the organ most parasitized, but the parasites did not show any tropism . Heterophilic infiltrate was found in infected animals and in high infections is more clustered near the nematodes. The nematodes eggs were observed only in that seems like keratin layer, from middle and posterior ventriculus in animals with low infection. The glandular region of the proventriculus, nematodes are localized in the adenomers secretory duct and cause serious injury with erosions and ulcerations, causing damages on glandular epithelium. These datas are usefull to control *Libyostrongylus*, as well as knowledge of the biology of these parasites in the infected tissue site.

I- Introdução

As doenças parasitárias podem interferir na produtividade da criação de avestruzes. Entre algumas das espécies de helmintos que parasitam estas aves tem-se: *Houttuynia struthionis*, cestóide; *Philophtalmus gralli*, único trematóide e os seguintes nematóides: *Ascaridia struthionis*, *Dicheilonema spicularum*, *Codiostomum struthionis* e os gêneros *Paralibyostrongylus*, contendo oito espécies e *Libyostrongylus*, contendo três espécies (Ponce Gordo et al., 2002). Destes, o último gênero é o de maior importância por conter os helmintos considerados mais patogênicos (Craig e Diamond, 1996).

O gênero *Libyostrongylus* é composto pelas espécies *L. douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 *L. dentatus* Hoberg Lloyd and Omar, 1995 e *L. magnus* (Gilbert., 1937). Somente os dois primeiros têm sido descritos fora da África (Hoberg et al., 1995; Ederli et al. 2008a; Ederli et al., 2008b; Santos et al., 2010; Andrade et al., 2011a; 2011b). O gênero foi encontrado na Austrália (Barton e Seward, 1993), América do Norte (Hoberg et al., 1995), Europa (Ponce Gordo et al., 2002) e no Brasil (Andrade et al., 2011b; Bonadiman et al., 2006). Sendo que *L. dentatus* tem sido documentado apenas nos EUA (Hoberg et al., 1995) e Brasil (Ederli et al. 2008a; Ederli et al., 2008b; Andrade et al., 2011a; 2011b). Estes vermes alimentam-se de sangue e vivem na mucosa e camada que reveste o proventrículo e ventrículo (Ederli et al., 2008b; Ederli e Oliveira, 2009). Essas duas regiões formam o que se denomina como “estômago” do avestruz. A infecção pelo *L. douglassii* causa proventriculite diferítica que leva a morte (Reinecke, 1983; Craig e Diamond, 1996;; Jansson e Christensson, 2000). Os sinais clínicos da infecção incluem anorexia, perda de peso e anemia (Reinecke, 1983) e a infecção de *L. douglassii* induz altos índices de mortalidade (50%) entre aves jovens e ocasionalmente adultas (Nel, 1980; Reinecke, 1983; Jansson e Christensson, 2000; Sotiraki et al., 2001).

Assunto que merece atenção é a eficácia dos anti-helmínticos utilizados no controle da libyostrongylose. Em um levantamento da ocorrência das espécies de *Libyostrongylus* no Brasil foi detectado que a maioria das propriedades tem histórico de uso prolongado de ivermectina (Andrade et al., 2011b) algo que pode levar ao estabelecimento de parasitos resistentes ao produto químico empregado (Wolstenholme, et al. 2004). A resistência anti-helmíntica foi primeiramente

documentada por Malan et al., (1988) na África do Sul em avestruzes tratados com levamisol e desde então não tem sido registrada.

Embora o proventrículo e ventrículo sejam o habitat do *Libyostrongylus*, estes órgãos têm regiões morfológicamente diferentes e poucos estudos tem sido feito em relação à distribuição das espécies *L. douglassii* e *L. dentatus* ao longo destes órgãos. *Libyostrongylus douglassii* foi descrito por Cobbold (1882) apenas habitando o proventrículo enquanto *L. dentatus* foi descrito por Hoberg et al. (1995) habitando a região posterior do proventrículo e sob a camada queratinóide(também conhecida como camada coilínea) do ventrículo, estendendo-se ao quarto distal desse órgão. Mais recentemente, Ederli e Oliveira (2009) e Ederli et al. (2008b) analisando o proventrículo de avestruzes relataram distribuição heterogênea desses parasitos estando *L. dentatus* inserido na camada queratinóide enquanto *L. douglassii* se localiza sob essa camada. Assim, é importante para o entendimento da biologia do *Libyostrongylus* determinar precisamente a distribuição destas espécies ao longo destes órgãos em avestruzes com baixa e alta infecção.

Outro aspecto deste estudo é a análise histopatológica da infecção mista por *L. dentatus* e *L. douglassii* nas diferentes regiões do proventrículo e ventrículo de avestruzes com diferentes níveis de infecção. Sabe-se que necrose grave subaguda e ulcera gástrica no proventrículo associadas a infiltrado de células inflamatórias podem ocorrer nas infecções por *L. douglassii* (Bastianello et al., 2005). Este infiltrado em infecções mistas no proventrículo de aves sem sinais clínicos de doença foi caracterizado como sendo do tipo granulócito heterofílico e nenhum sinal macroscópico de necrose foi detectado (Andrade et al., 2011a). Provavelmente lesões macroscópicas estejam relacionadas a aves com taxas mais altas de infecção. Logo, torna-se relevante correlacionar o nível de infecção (alto ou baixo) das avestruzes com a presença de lesões microscópicas e a caracterização do tipo de leucócito presente nos possíveis infiltrados inflamatórios das diferentes regiões dos proventrículos e ventrículos.

II- Revisão Bibliográfica

2.1- Avestruzes

O avestruz (*Struthio camelus*) pertence ao grupo das ratitas, aves incapazes de voar, não possuem quilha sobre o esterno e conseqüentemente não possuem musculatura do peito desenvolvidas para vôo. Atualmente sua distribuição natural

estende-se ao Leste e Sul da África. É a única ratita cuja distribuição estende-se ao Norte do equador (Huchzermeyer, 2005).

O avestruz é a maior espécie de ave viva do planeta atingindo altura máxima de 2 metros e 70 centímetros e peso corporal próximo a 150 kg. Os machos adultos apresentam coloração preta no corpo e branca na cauda e ponta das asas, enquanto que as fêmeas são castanhas pardas. Cada fêmea coloca em média 60 ovos por ano, produzindo até 20 filhotes por ano. A vida produtiva de uma fêmea é de 30 a 35 anos e o início da postura acontece por volta dos dois anos de idade. Já o macho inicia sua vida reprodutiva um pouco mais tarde, aos dois anos e meio de idade. Esses animais apresentam uma expectativa de vida alta, em torno de 65-70 anos. O abate pode ser feito aos 15 meses de vida (100 kg de peso bruto), gerando, 30 kg de carne limpa, 1,4 m² de couro, além das plumas (Clube do avestruz, 2011).

Como todas as aves, o esôfago do avestruz está situado no lado direito do pescoço. Essa ave não tem o órgão papo, no entanto, possuem um proventrículo grande e distensível, que exerce a função do papo, onde água e alimento volumoso são estocados e misturados com excreções das glândulas proventriculares profundas (Bezuidenhout e Van Aswegen, 1990 apud Huchzermeyer, 2005) (Fig. 1). Estas glândulas estão situadas numa porção alongada glandular na parte dorsal do proventrículo (Fig. 1), que é a área mais próxima à coluna vertebral (Bezuidenhout e Van Aswegen, 1990 apud Huchzermeyer, 2005; Fowler, 1991). A parte posterior do proventrículo inclina-se ventral e cranialmente e, conseqüentemente, o ventrículo (moela) localiza-se ventralmente ao proventrículo (Fig. 1).

A mucosa do proventrículo apresenta numerosas pregas, é revestidas por epitélio simples e cilíndrico com citoplasma claro e núcleo na porção basal, contém glândulas tubulares ramificadas que secretam muco, a lâmina própria espessa, o tecido conjuntivo frouxo, e muscular da mucosa típica formada por fibras musculares lisas (Monteiro et al., 2009). Na submucosa existe a presença de numerosas glândulas tubuloalveolares em arranjos lobulares, compostas e ramificadas, com células parietais, que desembocam em criptas onde liberam a secreção em ductos excretores de epitélio cilíndrico simples (Illanes et al., 2006). A túnica muscular se apresenta com duas subcamadas, a circular interna, espessa, e a longitudinal externa, mais delgada que é separada por vasos sanguíneos e o plexo mioentérico, serosa formada por tecido conjuntivo frouxo e mesotélio (Monteiro et al., 2009).

O revestimento do ventrículo, chamado de camada queratinóide espessa, é formado por proteínas secretadas por glândulas tubulares localizadas na mucosa e por células de descamação e fragmentos celulares (Huchzermeyer, 2005). O ventrículo gástrico exibe mucosa recoberta por uma camada espessa de substância rósea homogênea e abaixo um epitélio simples cilíndrico e lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, com glândulas tubulares simples (Monteiro et al., 2009). A camada muscular é espessa, tendo três camadas de musculatura lisa que correspondem a uma plexiforme interna e entre a musculatura se observam numerosos plexos mientéricos (Illanes et al., 2006).

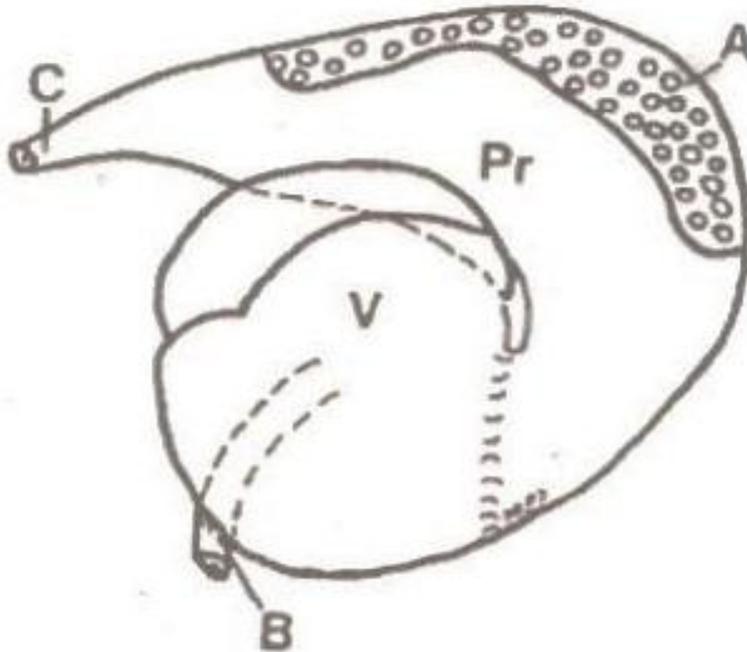


Figura 1- Esquema do proventrículo e ventrículo de avestruzes. Proventrículo (Pr) e ventrículo (V) de avestruzes, região da área glandular (A), do duodeno (B) e esôfago (C). Fonte: Fowler, 1991.

2.2- Estruticultura

A estruticultura, criação de avestruzes, foi iniciada na África do Sul, no fim do século XIX para suprir a demanda por plumas. Após a 1ª e 2ª Guerras Mundiais, houve um colapso do mercado de plumas. Por esta razão, os fazendeiros sul africanos começaram a explorar outros produtos como a carne e o couro (Smit, 1963; Drenowatz et al., 1995). O interesse pelo couro e carne cresceu

posteriormente fazendo com que a estrutiocultura se expandisse com a exportação para os EUA, países da Europa, África do Norte, América do Sul e Austrália (Bertram, 1992; Jensen et al., 1992).

No Brasil, a exploração do avestruz teve seu início em 1995 (Souza, 2004) e logo se tornou um mercado promissor, sobretudo, devido à boa adaptação, alta reprodutividade animal, versatilidade de produtos e extensão de terra para criação (Clube do avestruz, 2011). No entanto, a cadeia produtiva da estrutiocultura passa por um período de ajuste entre a oferta e procura de seus produtos. O mercado consumidor não acompanhou o aumento da produção havendo maior oferta em relação à procura da carne (Silva, 2008). Entretanto hoje o Brasil é o maior produtor mundial fora do continente africano (Agroin, 2012).

A estrutiocultura apresenta várias vantagens, o couro possui boa durabilidade, resistência, maciez e aspecto único com pequenos pontos formado pela inserção das plumas e carne com baixos índices de gordura e calorias e alto teor protéico (Palerani et al., 1998). Outros subprodutos como as cascas dos ovos podem ser usadas como fonte de cálcio e peças de artesanato, a clara e a gema na indústria de alimentos. O bico e as unhas para confecção de jóias, os cílios na fabricação de cílios postiços e pincéis de alta definição a carcaça na composição de rações e os tendões utilizados nas cirurgias e/ou enxerto em humanos (Souza, 2004).

2.3- Parasitos

Avestruzes podem ser acometidos por uma ampla gama de parasitos, como os protozoários *Toxoplasma gondii* e *Balantidium struthionis* (Sotiraki et al., 2000; Foreyt, 2005; Hove e Mukaratirwa, 2005;), nematóides como *Ascaridia struthionis*, *Dicheilonema spicularum*, *Codiostomum struthionis* e os gêneros *Paralibyostrogylus*, contendo oito espécies e *Libyostrogylus*, contendo três espécies, o cestóide *Houttuynia struthionis* (Ponce et al., 2000) Além destes endoparasitos são encontrados ectoparasitas como piolhos do gênero *Struthiolipeurus* (Jansson e Christensson, 2000), carrapatos ixodídeos (Mertins e Schlater, 1991) e dípteros do gênero *Culicoides sp.* (Mushi et al., 1999 apud Batista et al., 2008)

A maior parte dos parasitos de avestruz encontra-se nas penas e no trato gastrointestinal (Ponce Gordo et al., 2002; Foreyt, 2005). Dentre todos, destacam-se

os helmintos do gênero *Libyostrongylus* por conter os vermes mais patogênicos (Craig e Diamond, 1996).

2.4- Gênero *Libyostrongylus*

Libyostrongylus spp. é um nematóide hematófago pertencente à família Trichostrongylidae e constituído pelas espécies: *L. douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, *L. dentatus* (Hoberg, Lloyd e Omar, 1995) e *L. magnus* (Gilbert, 1937). Estes nematóides são avermelhados na forma adulta e encontrados no proventrículo e ventrículo de avestruzes (Hoberg et al., 1995; Ederli et al., 2008a; Ederli e Oliveira, 2009). *Libyostrongylus* spp. são hematófagos e produzem uma doença conhecida como "estômago podre" que causa alta mortalidade entre os avestruzes jovens (Nel, 1980; Reinecke, 1983) e ocasionalmente adultos (Jansson e Christensson, 2000).

As espécies de *Libyostrongylus* podem ser diferenciadas com base na morfologia dos vermes adultos (Hoberg et al., 1995; Ederli et al., 2008a;) e das larvas infectantes (Ederli et al., 2008b). O diagnóstico baseado nas formas imaturas diferencia *L. dentatus* e *L. douglassii*, não se sabe se pode diferenciar *L. magnus*. Recentemente demonstrou-se por análise molecular que as espécies *L. dentatus* e *L. douglassii* são de fato distintas (Andrade et al., 2013). Esse conhecimento permitiu o desenvolvimento de diagnóstico molecular baseado em DNA de indivíduos adultos de *L. dentatus* e *L. douglassii* (DaMatta et al., 2012; Andrade et al., 2013).

O ciclo de vida do gênero *Libyostrongylus* é direto, rápido e se divide em duas partes: uma fase de vida livre que ocorre na pastagem onde os ovos se desenvolvem em larva infectante (L₃) e uma fase de vida parasitária que ocorre com a ingestão da L₃ que se desenvolve dentro do hospedeiro até atingir a fase adulta, copular e ovipositar (Fig. 2) (Santos et al., 2010).

Libyostrongylus dentatus possui dente esofagiano, o comprimento total dos machos e fêmeas é maior que *L. douglassii*, o posicionamento da vulva é sublateral, fêmeas possuem um ovijetor longo e cauda com inflação cuticular ventral ao nível do ânus e a ponta da cauda digitada; os machos possuem espículos que apresentam as extremidades da ramificação principal arredondadas, apresentando bainha hialina (Fig. 3) (Hoberg et al., 1995; Ederli et al., 2008a). Em vista apical, *L. dentatus* tem um orifício bucal em formato oval, lábios espessos, seis papilas labiais arredondadas

e com um par próximo aos anfídios laterais e quatro papilas cefálicas (Fig. 4) (Ederli et al., 2008a).

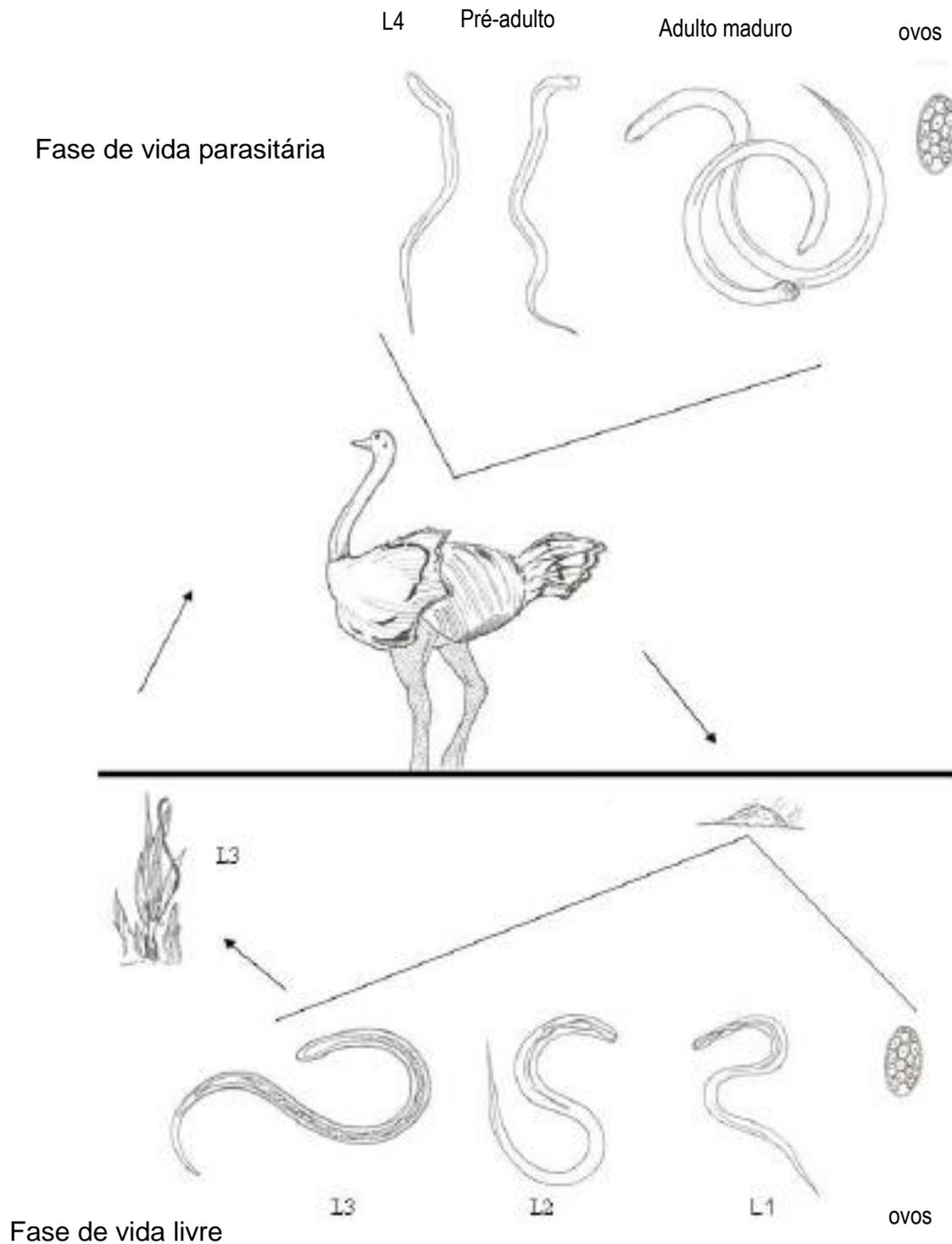


Figura 2. Ciclo de vida de *Libyostrongylus* spp.

Libyostrongylus douglassii não possuem dentes esofagianos, o posicionamento da vulva é ventral, as fêmeas apresentam um ovijetor curto, cauda com ponta arredondada e ausência de inflação cuticular ao nível do ânus; os machos possuem extremidades dos espículos pontiagudas e sem a presença da bainha hialina (Fig. 3) (Hoberg et al., 1995; Ederli et al., 2008a). Em vista apical, *L. douglassii* possui um orifício bucal em formato oval, ausência de dente, lábios finos, seis papilas labiais prolongadas, com um par próximos aos anfídios e quatro papilas cefálicas (Fig. 4) (Ederli et al., 2008a).



Figura 3. Imagem de *Libyostrongylus* por microscopia de contraste de interferência. (A-D) *L. douglassii*: (A) extremidade cefálica, ausência de dente esofágico; Barra: 50 μ m; (B) ovijetor curto mostrando a região dos esfínteres e vestibulo (entre setas) e a posição da vulva (ponta de seta) Barra: 260 μ m; (C) ausência de inflação cuticular da fêmea ao nível do ânus e com a ponta da cauda arredondada; Barra: 30 μ m. (D) espículos com extremidade final pontiaguda; Barra: 40 μ m. (E-H) *L. dentatus*. (E) Demonstra extremidade cefálica e proeminente dente esofágico (seta); Barra: 30 μ m. (F) ovijetor longo mostrando a região dos esfínteres e vestibulo (entre setas) e a posição da vulva (ponta de seta); Barra: 260 μ m. (G) Inflação cuticular na cauda da fêmea no nível do ânus (seta) e ponta da cauda

digitada; Barra: 30µm. (H) espículos com extremidade final arredondada. Fonte: Ederli et al., 2008a.

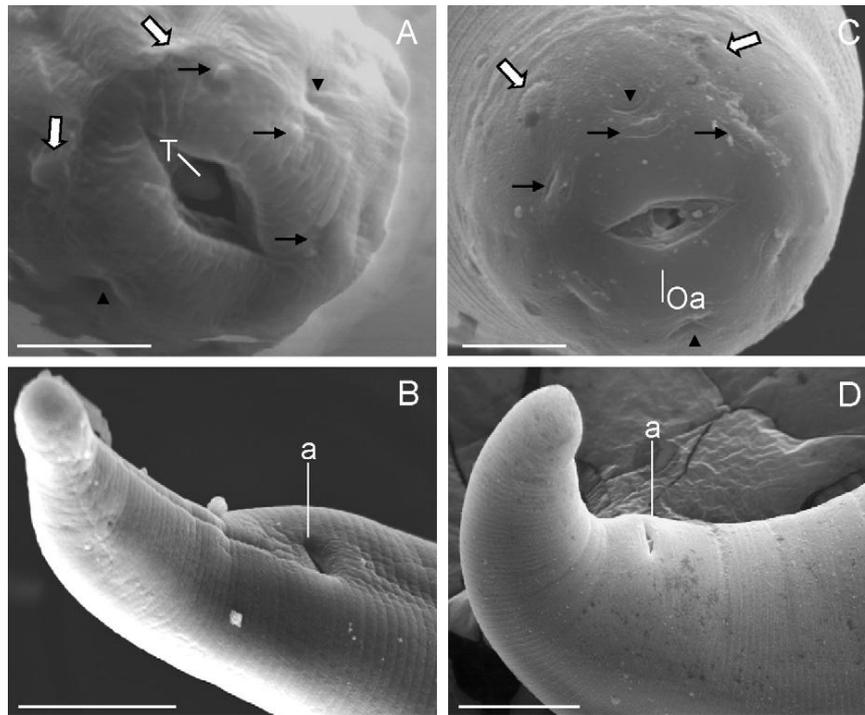


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de *Libyostrongylus*. (A e B) *L. dentatus*. (A) Vista apical da extremidade cefálica da fêmea exibindo papilas exteriores (setas grandes), papilas interiores (setas), anfídios (ponta de seta) dente esofágico (T). (B) Vista ventro-lateral da extremidade caudal de uma fêmea com inflação cuticular proeminente no nível do ânus (a) e ponta digitada; Barra: 5 e 20 µm respectivamente. (C e D) *L. douglassii*. (C) Vista apical da extremidade cefálica de da fêmea, exibindo papilas exteriores (seta grande), papilas interiores (seta), anfídios (ponta de seta) e abertura oral (Ao) centralmente localizada; (D) Cauda da fêmea com ponta arredondada sem inflação cuticular próximo ao ânus (a). Barra: 5 e 20 µm respectivamente. Fonte: Ederli et al., 2008a.

Diferenças morfológicas na cauda entre os estádios de larva infectante permitem diferenciar os gêneros *Codiostomum* e *Libyostrongylus* (Hoberg et al., 1995; Ederli et al., 2008a; Ederli et al., 2008b; Ederli e Oliveira, 2009) e as espécies *L. douglassii* de *L. dentatus* (Ederli et al., 2008b; Andrade et al., 2011b). *Codiostomum* possui a ponta da cauda da larva afilada enquanto em *Libyostrongylus* a ponta da cauda tem forma de gota. *Libyostrongylus dentatus* tem uma cauda da bainha longa com terminação filamentososa enquanto a larva de *L. douglassii* possui cauda da bainha curta com terminação aguda (Fig. 5) (Ederli et al., 2008b; Andrade et al., 2011b).

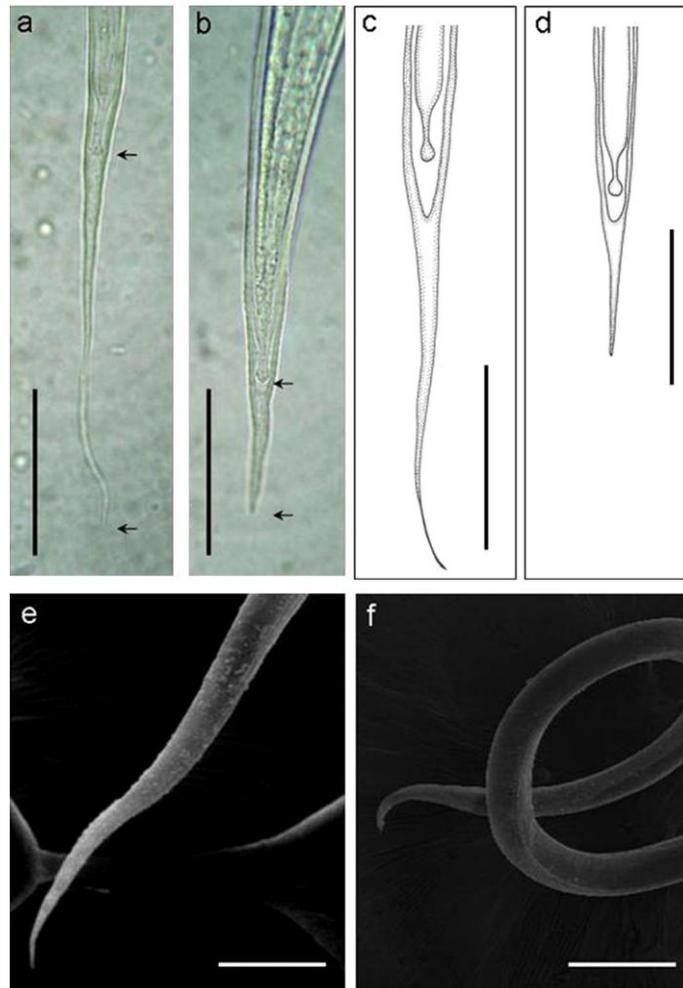


Figura 5. Microscopia eletrônica de contraste de fase, desenho esquemático e microscopia eletrônica de varredura de larvas infectantes de *Libyostrongylus*. (a e b) microscopia eletrônica de contraste de fase de *Libyostrongylus dentatus* (a) e *L. douglassii* (b). desenho feito a mão evidenciando ao final da cauda o botão, o que identifica o gênero e a diferença entre o comprimento da bainha de *L. dentatus* (c) e *L. douglassii* (d) demonstrando a diferença entre larvas de *L. dentatus* e *L. douglassii* (e) *L. dentatus* e (f) *L. douglassii* respectivamente em microscopia eletrônica de varredura. Barra: 30µm. Fonte: Ederli et al., 2008b.

2.4.1- Distribuição geográfica

O gênero *Libyostrongylus* tem sido registrado infectando avestruzes na África do Sul, Austrália (Barton e Seward, 1993), América do Norte (Hoberg et al. 1995), Escócia (Pennycott e Petterson, 2001), Espanha, Bélgica, Portugal e Holanda (Ponce Gordo et al., 2002), Suécia (Jansson, et al., 2002), Zimbábue (Mukaratirwa et al., 2004) e Brasil (Bonadiman et al., 2006; Andrade et al., 2011b).

Somente *L. douglassii* e *L. dentatus* têm sido descritos fora da África. *Libyostrongylus douglassii* foi observado na Austrália (Barton e Seward, 1993), Europa (Ponce Gordo et al., 2002), América do Norte (Hoberg et al., 1995) e do Sul (Bonadiman et al., 2006, Ederli et al., 2008a; Ederli et al., 2008b; Ederli e Oliveira,

2009; Andrade et al., 2011b). Segundo Hoberg et al. (1995), a translocação de aves infectadas do continente africano para os países importadores tenha sido a causa da introdução do parasito nos demais continentes. *Libyostrongylus dentatus* foi descrito apenas nas Américas (Hoberg et al., 1995; Bonadiman et al., 2006; Ederli et al., 2008a; Ederli et al., 2008b; Ederli e Oliveria, 2009; Andrade et al., 2011a).

Infecções mistas entre *L. douglassii* e *L. dentatus* parecem ser comuns, contudo, tem sido possivelmente negligenciada (Hoberg et al., 1995; Ederli et al., 2008a; Ederli et al., 2008b). Esta possibilidade foi fortemente reforçada num levantamento feito no Brasil no qual foi possível determinar que em algumas propriedades as aves com infecção mista foram procedentes do Canadá, Austrália e Espanha (Andrade et al., 2011a). Entretanto, publicações oriundas de tais países (Barton e Seward, 1993; Ponce Gordo et al., 2002) somente notificam a ocorrência de *L. douglassii* (Andrade et al., 2011a) indicando diagnóstico precário.

2.4.2- Patogenicidade

Libyostrongylus douglassii tem sido considerado a espécie mais patogênica dentre as espécies de nematóides que parasitam os avestruzes (Reinecke, 1983).

Libyostrongylus douglassii é o nematóide de avestruz mais descrito na literatura por Mckenna (2005). Altos índices de mortalidade (50%) entre aves jovens e ocasionalmente em adultos têm sido atribuídos a esta espécie (Reinecke, 1983). Necrose severa subaguda e úlceras gástricas com infiltrado de células inflamatórias como heterófilos/linfócitos abaixo da lâmina própria, camada queratinóide ou abaixo das glândulas da submucosa foram associados ao *L. douglassii* no proventrículo de avestruzes juvenis por Bastianello et al. (2005). Na Croácia, infecções com morte de avestruzes e infiltrado de células mononucleares nas proximidades dos nematóides foram relacionadas ao parasito (Tišljarić et al., 2007). Mais recentemente em infecção mista com *L. dentatus* e *L. douglassii* foi observado que o infiltrado inflamatório celular no proventrículo, previamente atribuído a *L. douglassii*, é do tipo heterofílico (Andrade et al., 2011a). Heterófilos de avestruz são peroxidase negativos (Bonadiman et al., 2009), essa característica citoquímica permite a diferenciação de heterófilos de eosinófilos em infiltrados teciduais (Andrade et al., 2011a).

2.4.3 - Tratamento anti-helmíntico

Uns dos principais componentes do controle das verminoses são os anti-helmínticos. Entre os produtos avaliados contra *Libyostrongylus*, temos o fenbendazole, levamisole, ivermectina (Craig e Diamond, 1996; Shane, 1998) e moxidectina (Bastianello et al., 2005).

Fenbendazole administrado na dose oral de 15 mg/kg teve eficácia superior a 99% contra vermes adultos e 82,5% para larvas do quarto estágio (Fockema et al., 1985). Quando combinado com resorantel (130 mg/Kg) ou sozinho apresentou eficácia de 98,6% em populações de *Libyostrongylus* na África do Sul (Malan et al., 1988).

Ivermectina também foi eficaz contra *Libyostrongylus* em avestruzes na Escócia (Pennycot e Patterson, 2001). Este medicamento pode ser administrado por via oral de 0,2 mg/kg ou como uma injeção subcutânea de 0,3 mg/kg (Stewart, 1989). Da mesma forma moxidectina na dose de 0,2mg/kg demonstrou-se eficaz quando administrado em avestruzes na Nova Zelândia (Bastianello et al., 2005).

Levamisole teve baixa eficácia quando administrado a avestruzes na África do Sul (Malan et al., 1988). Sendo esse o primeiro relato de resistência anti-helmíntica registrado contra *Libyostrongylus*. A eficácia do levamisol na dose de 30 mg/Kg foi de 28% e em combinação com o resorantel na dose de 130 mg/Kg teve eficácia de 67% (Malan et al., 1988).

No Brasil, não existem estudos relativos à eficácia dos produtos anti-helmínticos contra *Libyostrongylus*. Entretanto, fenbendazole, albendazole e principalmente ivermectina tem sido utilizada para o controle deste parasito de maneira indiscriminada podendo levar com isto ao surgimento da resistência (Andrade et al., 2011b). Assim, a investigação da eficácia destas drogas no intuito de retardar a resistência anti-helmíntica é relevante e um dos temas desta dissertação.

III - Objetivos

3.1- Objetivo Geral:

- Avaliar a eficácia de alguns anti-helmínticos usados no controle da *Libyostrongilose* e caracterizar a anatomopatologia de *L. dentatus* e *L. douglassii* nas regiões do proventrículo e ventrículo em avestruzes com alta e baixa infecção.

3.2- Objetivos Específicos:

3.2.1- Determinar a eficácia anti-helmíntica de albendazole, ivermectina e moxidectina em relação à *L. dentatus* e *L. douglassii*.

3.2.2- Verificar a distribuição e localização de *Libyostrongylus* nas regiões anterior, média e distal do proventrículo e ventrículo de avestruzes.

3.2.3- Descrever as características patológicas nas diferentes regiões do proventrículo e ventrículo de avestruz com baixa e alta infecção.

3.2.4- Caracterizar as alterações de infiltrados inflamatórios diferenciando os heterófilos de neutrófilos e eosinófilos nos tecidos de avestruz com baixa e alta infecção.

IV- Material e métodos

O trabalho foi realizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada na cidade de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro – Brasil. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual no Centro de Biociências e Biotecnologia e no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias.

4.1- Avestruzes

Os experimentos foram realizados em duas fazendas, uma em Guarani-MG e outra em Manguinhos, São Francisco de Itabapoana-RJ. As fazendas possuem piquetes de recria de avestruz onde estavam alocados os animais utilizados nos experimentos.

Quarenta e oito avestruzes foram utilizadas para o teste anti-helmíntico e seis aves foram abatidas dentro das normas e padrões de abate humanitário para obtenção do ventrículo e proventrículo e, por conseguinte, foram feitas análises da distribuição e alterações patológicas de *L. dentatus* e *L. douglassii* nestes órgãos.

As aves avaliadas no teste anti-helmíntico pertenciam à propriedade localizada em Guarani-MG cuja atividade criatória do avestruz teve início em 2004 e desde então somente ivermectina havia sido empregado no controle e tratamento das parasitoses com aplicação de duas vezes ao ano.

4.2- Teste anti-helmíntico

Animais foram pesados, divididos em três grupos de 16 animais e tratados com albendazole (6mg/kg), ivermectina (0.2 mg/kg) ou moxidectina (0.2mg/kg). As dosagens para ivermectina e moxidectina foram baseadas na literatura que relata o uso destes compostos para avestruzes (Pennycott e Paterson, 2001; Bastianello et al., 2005). Estas doses são as mesmas recomendada pelo fabricante para outros animais domésticos. Embora albendazole não tenha sido utilizado em avestruzes, foi administrada dose recomendada pelo fabricante para os mesmos tipos de animais. Os nomes comerciais destas drogas e os fabricantes foram os seguintes: albendazole, “Ricobendazole oral” fabricado pela Ouro Fino; ivermectina, Ivomec injetável 50 MI – Ivermectina Merial 1%, fabricado pela Merial Brasil; moxidectina, Cydectin NF 500 MI – Fort Dodge – Moxidectina 1% , fabricado pela Fort Dodge.

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de cada animal pré e pós-tratamento para avaliar a redução no número de ovos por grama de fezes (OPG), segundo a técnica modificada de Gordon e Whitlock (1939). Um intervalo de 13 dias foi dado entre as coletas. A eficácia dos produtos testados foi calculada pela fórmula % de eficácia = $(\text{OPG médio pré-tratamento} - \text{OPG médio pós-tratamento}) / \text{OPG médio pré-tratamento} \times 100$, índices inferiores a 95% foram considerados indicativos de ineficácia (Coles et al., 1992). Além disso, foram feitas coproculturas para identificação das larvas infectantes (L₃) sobreviventes ao tratamento.

4.3- Coproculturas

Das amostras fecais, dois gramas por coprocultura foram colocadas em copos plásticos com capacidade para 60 ml previamente identificados. Os copos plásticos foram incubados durante sete dias à temperatura ambiente (23 - 27°C) em vasilhames de plástico contendo 100 ml de água destilada e cobertas com filme plástico para prevenir a perda de umidade. Após a incubação, cada copo plástico foi preenchido com água destilada em seguida colocado na borda do copo uma placa de Petri e logo após feita a inversão do copo. Na placa de Petri foi adicionado 10 ml de água destilada. Após 4 h foi feita a recuperação das L₃ de *Libyostrongylus* que foram acondicionadas em garrafas de culturas e mantidas sob refrigeração até serem quantificadas e identificadas de acordo com os critérios estabelecidos por Ederli et al. (2009b).

4.4- Histopatologia

A partir da necrópsia, foi feita análise macroscópica das regiões do proventrículo, ventrículo e camada queratinóide. Amostras com aproximadamente 1 cm² dos tecidos das regiões anterior (A), glandular (B) e posterior (C) do proventrículo e regiões anterior (D), média (E) e posterior (F) do ventrículo (Fig. 6), foram coletadas e fixadas em formol tamponado neutro a 10%. De um total de dez amostras de cada região, cinco foram utilizadas para a coleta dos parasitos que foram retirados um a um com auxílio de instrumentos adaptados feitos com palitos de churrasco com pontas de agulhas para injeção e lupas. Cinco destas dez amostras de tecidos foram preparadas para o processamento histológico de rotina. Após processamento, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz Axioplan e imagens foram capturadas com uma câmera MRc5 AxioCam digital e processadas

com um programa Axiovision (RFA), a fim de identificar infiltrados inflamatórios e localização dos nematóides nos tecidos sob baixa e b infecção.

Para confirmação do tipo de granulócito do infiltrado inflamatório tecidual foi feita a marcação com peroxidase (Andrade et al., 2011a), onde os cortes foram tratadas com diaminobenzamidina e peróxido de hidrogênio para localizar a enzima peroxidase (Andrade et al., 2011a). Os cortes foram incubados em pH 7.0, tampão fosfato salino (PBS) contendo 1mg/ml de diaminobenzamidina e 0,3% de peróxido de hidrogênio e após dez minutos foram lavados com tampão PBS e contrastados com hematoxilina (Andrade et al., 2011a).



Figura 6- Estômago de avestruz com as áreas analisadas demarcadas.

(A) Região anterior do proventrículo, (B) região glandular do proventrículo, (C) região distal do proventrículo, (D) região anterior do ventrículo, (E) região média do ventrículo, (F) região distal do ventrículo. Barra: 7 cm.

4.5- Coleta e quantificação de nematóides adultos

As cinco amostras dos tecidos com aproximadamente 1 cm² das regiões anterior, média e posterior dos proventrículos e ventrículos foram separadas no momento da necrópsia e fixadas em formaldeído 10% tamponado. Posteriormente, as amostras de tecido foram transferidas para tubos Falcon contendo solução salina tampão fosfato e analisados com auxílio do microscópio estereoscópio. Os nematóides foram coletados e transferidos para placas de Petri. Posteriormente, os espécimes foram separados, e quantificados por região de cada órgão.

V- Resultados

5.1- Eficácia anti-helmíntica.

A eficácia variou entre os anti-helmínticos. Ivermectina teve uma eficácia de 60% enquanto albendazole e moxidectina de 100% (Tabela 1). As larvas infectantes de *L. dentatus* (56,7%) e *L. douglassii* (43,3%) foram recuperadas nas coproculturas de avestruzes tratadas com ivermectina.

Tabela.1. Eficácia anti-helmíntica contra *Libyostrongylus douglassii* e *L. dentatus* em avestruzes no estado de Minas Gerais, Brasil.

OPG			
Anti-helmintico	Pré-tratamento	Pós-tratamento	% Eficácia
Albendazol ^a	1631 (200- 4000)	0 (0-0)	100
Ivermectina ^b	1113 ^c (200-3300)	450 (0 - 4400) ^e	60 ^d
Moxidectina ^b	2000 (200-14900)	0 (0-0)	100

^a Dose oral de 6mg/kg

^b Dose injetável 0.2mg/kg

^c Média de valores de 16 animais por grupo.

^d Índices menores que 95% são indicativos de resistência (Coles et al., 1992).

^e Variação na contagem de ovos por grama e fazes (OPG).

5.2-Quantificação de nematóides no proventrículo e ventrículo de avestruzes.

O número total de nematóides adultos de *Libyostrongylus* no proventrículo e ventrículo de animais que apresentaram baixa infecção (OPG entre 300 a 1500) foi de 80 e 52, respectivamente (Tabela 2). Nematóides não foram observados na região anterior do proventrículo. O número médio de nematóides da região glandular e posterior do proventrículo foi de 5,3 e 0,1, respectivamente (Tabela 2). No ventrículo não foram encontrados nematóides na região média e o número médio de adultos das regiões anterior e posterior foi de 0,6 e 2,9, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Recuperação de adultos de *Libyostrongylus* encontrados em fragmentos de tecido por região do proventrículo e ventrículo de avestruzes sob baixa infecção.

Animal	Amostra	Proventriculo				Ventriculo			
		Anterior	Glandular	Posterior	Total	Anterior	Médio	Posterior	Total
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	3	1	4	4	0	0	4
	3	0	0	0	0	4	0	0	4
	4	0	1	0	1	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Total</i>	0	4	1	5	8	0	0	8
	<i>Média ± DP</i>	0	0,8±0,9	0,2±0,2	1±1,7	1,6±1,3	0	0	2,6±5,6
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	1	0	1	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Total</i>	0	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Média ± DP</i>	0	0,2±0,4	0	0,2±0,4	0	0	0	
3	1	0	15	0	15	0	0	1	1
	2	0	16	0	16	0	0	0	0
	3	0	6	0	6	0	0	1	1
	4	0	9	0	9	1	0	36	37
	5	0	28	0	28	0	0	5	5
	<i>Total</i>	0	74	0	74	1	0	43	44
	<i>Média ± DP</i>	0	14,8±8,5	0	14,8 ±8,5	0,2±0,4	0	8,6±15,4	8,8±17,6

Animais sob alta infecção (OPG entre 10.000 a 17.200) tiveram nematóides de ambas as espécies em todas as regiões do proventrículo e ventrículo, com exceção do animal 2 que não apresentou nematóides no ventrículo (Tabela 3). O número total de nematóides adultos de *Libyostrongylus* no proventrículo foi de 6.755 enquanto que o número total no ventrículo foi de 247 (Tabela 3). Nas regiões anterior, glandular e posterior do proventrículo foi encontrado um número médio de 155, 161,3 e 133,7, respectivamente de nematóides adultos e no ventrículo na região anterior, média e posterior o número médio foi: 0,7; 5,7 e 10,3 respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3-Recuperação de adultos de *Libyostrongylus* encontrados em fragmentos de tecidos por região do proventrículo e ventrículo de avestruzes sob alta infecção.

Animal	Amostra	Proventrículo			Total	Ventrículo			Total
		Anterior	Glandular	Posterior		Anterior	Médio	Posterior	
1	1	186	53	151	390	0	38	2	40
	2	280	65	157	502	1	36	2	39
	3	287	73	251	611	0	0	0	0
	4	326	26	154	506	0	1	14	15
	5	423	118	181	722	0	3	27	30
	Total	1502	335	894	2731	1	78	45	124
	Média ± DP	300±86	67±34	179±42	546±126	0,2±0,4	16±19	9±11	41,3±39,5
2	1	12	127	252	391	0	0	0	0
	2	1	178	111	290	0	0	0	0
	3	10	126	107	243	0	0	0	0
	4	69	356	89	514	0	0	0	0
	5	58	295	132	485	0	0	0	0
	Total	150	1082	691	1923	0	0	0	0
	Média ± DP	30±31	216±104	138±65	385 ±119	0	0	0	0
3	1	1	94	199	294	0	1	23	24
	2	6	145	83	234	2	2	39	43
	3	4	106	30	140	0	2	37	39
	4	396	439	74	909	1	0	39	10
	5	269	221	34	524	6	1	0	7
	Total	676	1005	420	2101	9	6	138	123
	Média ± DP	135±186	201±142	84±68	420±308	1,8±2,5	1,2±0,8	27,6±43,3	25±16

5.3- Anatomopatologia de proventrículos e ventrículos infectados por *Libyostrongylus dentatus* e *L. douglassii*.

Animais sob baixa infecção não apresentaram lesões macroscópicas nos proventrículos (Fig. 7 A) e ventrículos. Porém a análise microscópica revelou algumas poucas lesões superficiais em ambas as regiões (não mostrado). No entanto, animais sob alta infecção apresentaram lesões macroscópicas em proventrículos (Fig. 7 B) contendo áreas com hiperemia moderada (Fig. 7 B) e lesões erosivas/ulcerativas (Fig. 7 C, D) causadas pela presença de formas adultas de *Libyostrongylus*. Essas alterações foram confirmadas em análises microscópicas (Fig. 8 e 9). Hiperemia moderada foi observada no proventrículo (Fig. 8 A) assim como lesões erosivas/ulcerativas (Fig. 8 B).

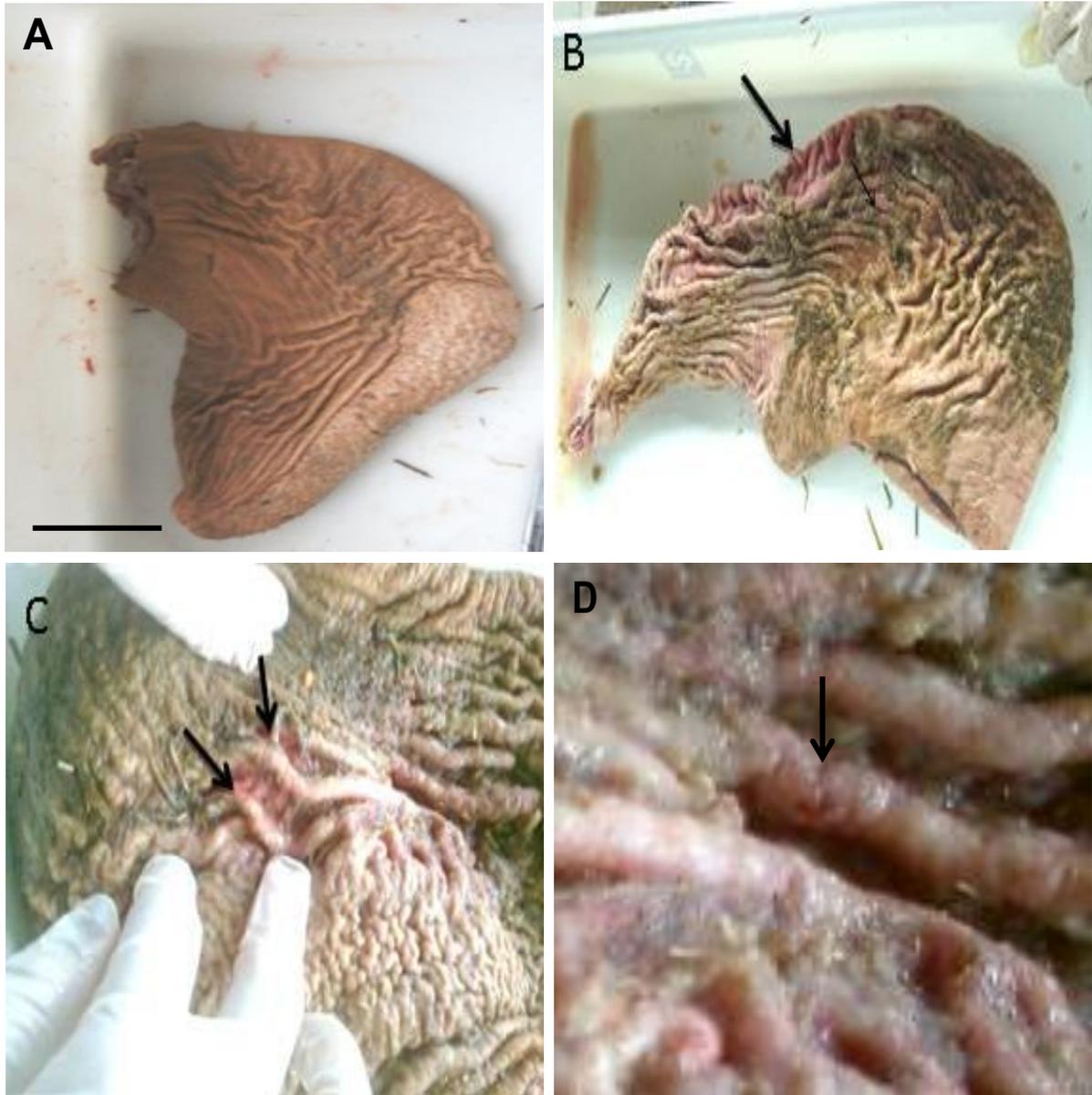


Figura 7. Proventriculos de animais sob alta e baixa infecção de *Libyostrongylus dentatus* e *L. douglassii*. (A) Proventriculo de um animal sob baixa infecção, sem lesão aparente entre papilas. (B) Proventriculo de animal sob alta infecção, demonstrando áreas vermelhas e aparentes lesões entre papilas (setas). (C) Proventriculo de animal sob alta infecção demonstrando lesão entre papilas (seta). (D) Aumento da imagem “C” demonstrando lesão provocada por nematóides (seta). Barra:7 cm.

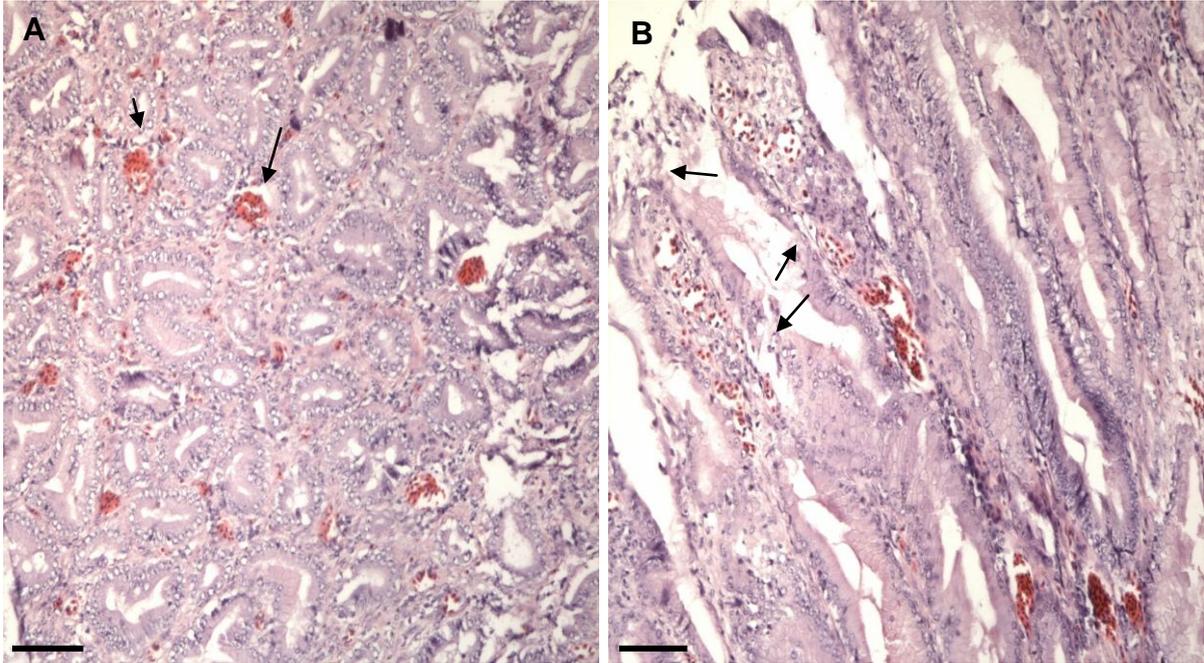


Figura 8. Cortes histológicos do proventrículo de animais sob baixa e alta infecção de *Libyostrongylus dentatus* e *L. douglassii*. (A) Imagem demonstra hiperemia moderada (setas). (B) Imagem demonstra lesões erosivas/ulcerativas (setas). Coloração em H&E. Barras: 100µm.

Além destas lesões, a análise microscópica do proventrículo mostrou alteração na arquitetura dos adenômeros da região glandular parasitada assim como aumento de secreção com conteúdo celular (Fig. 9 A). Os tipos de lesões diretamente ligadas ao parasitismo de *Libyostrongylus* spp. podem ser observadas na figura 9 A, na qual alguns adenômeros estão danificados. Os ductos de adenômeros adjacentes se unem em um único ducto que apresenta aumento de secreção evidenciado pelo total preenchimento do espaço dos ductos unidos, com clara perda do arranjo normal desta estrutura glandular (Fig. 9 A). O arranjo de um ducto central de aspecto normal não parasitado pode ser observado na figura 9 B. O epitélio apresenta aspecto normal quando o adenômero não está parasitado (Fig. 9 C). Já o ducto central parasitado (Fig. 9 D) apresenta danos em seu epitélio (Fig. 9 E).

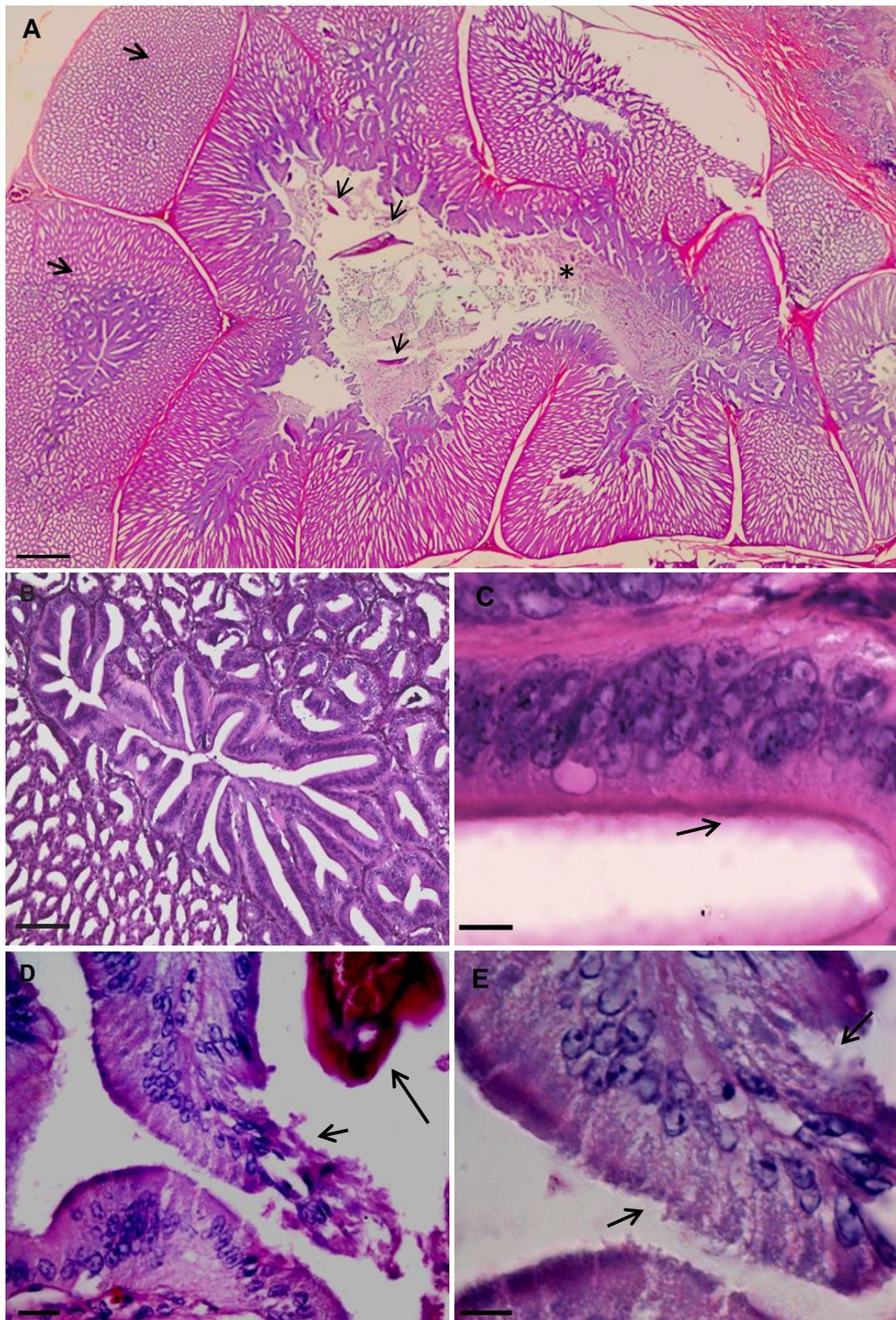


Figura 9. Adenômeros na região glandular do proventrículo e suas células epiteliais. (A) Imagem de adenômero normal (setas grossas) e adenômeros parasitados (setas finas) com arquitetura danificada e aumento de secreção (asterísco). Barra = 600 μ m. (B) Adenômero não parasitado com ducto secretor normal. Barra = 500 μ m. (C) Epitélio não danificado com clara preservação do glicocálix (setas). Barra = 10 μ m. (D) Epitélio danificado (seta) próximo ao nematóide (seta longa). (E) Epitélio danificado com glicocálix destruído (setas). Coloração H&E. Barra: = 10 μ m.

Os esfregaços sanguíneos corados em H&E demonstraram a presença de granulócitos (Fig. 10 A) e confirmação da reação negativa para peroxidase em heterófilos e positiva para eosinófilos (Fig. 10 B). Infiltrados inflamatórios granulocíticos agrupados no interior das glândulas do proventrículo foram observados próximos aos nematóides que estavam imersos no tecido (Fig. 10 C e D). Tais infiltrados inflamatórios continham células negativas para peroxidase (Fig. 10 D). Estes heterófilos estavam associados a infiltrados inflamatórios mononucleares (não mostrado).

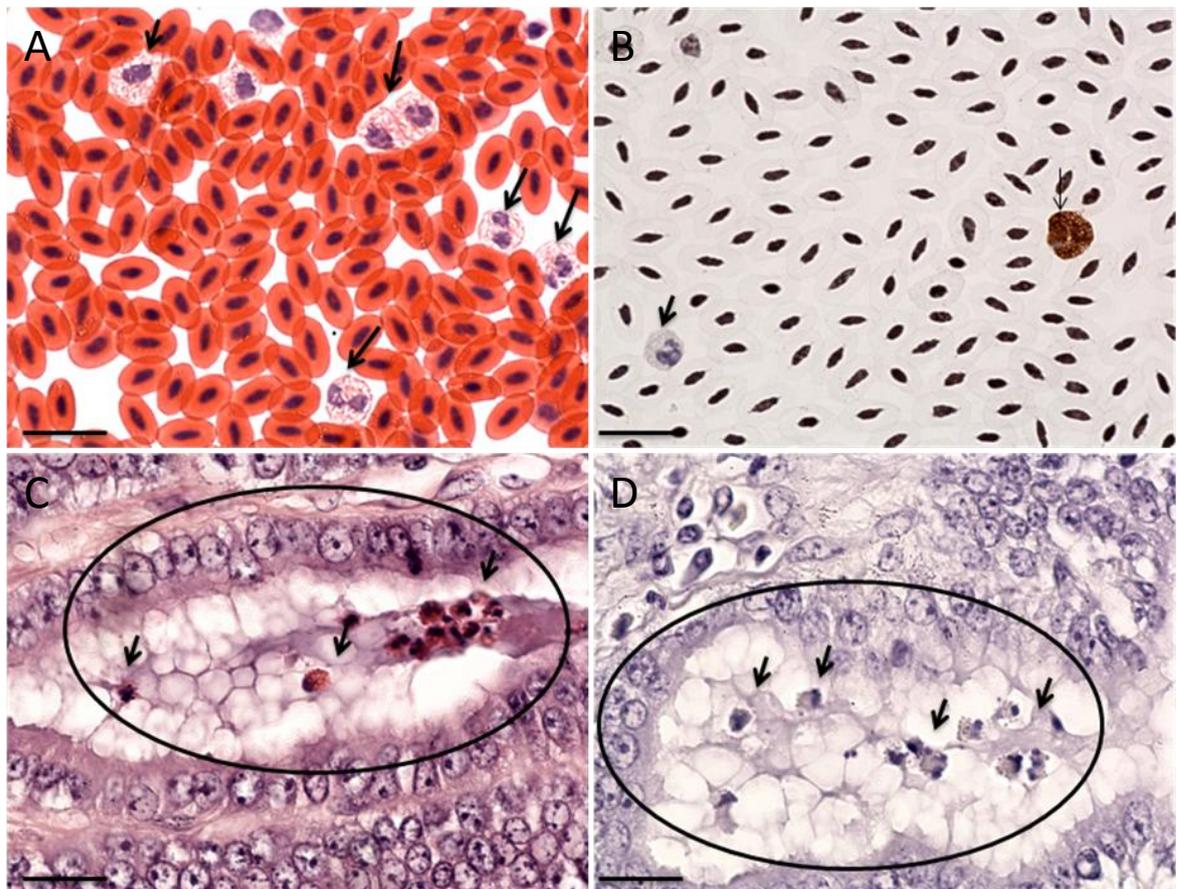


Figura 10: Marcação de peroxidase em esfregaço sanguíneo e proventrículo de avestruzes infectadas com *Libyostrongylus douglassii* e *L. dentatus*. (A) Esfregaço sanguíneo corados com H&E demonstrando a presença de granulócitos (setas). Barra: 10 μ m. (B) Marcação por peroxidase demonstrando eosinófilo peroxidase positivo (seta fina) e heterófilo peroxidase negativo (seta). Barra: 10 μ m. (C) Região anterior do proventrículo corado com H&E demonstrando granulócitos (setas) no interior da glândula (círculo). Barra: 10 μ m. (D) Marcação para peroxidase em corte subsequente da imagem "A" confirmando a presença de heterófilos (granulos peroxidase negativos - setas). Barra: 10 μ m.

Nematóides imersos na camada queratinóide (Fig. 11) foram observados tanto em animais de baixa quanto de alta infecção na região do ventrículo, sendo que os infiltrados inflamatórios dos que apresentaram baixa infecção não estavam ao redor de nematóides e sim, dispersos no tecido (dado não mostrado).

Nas análises histológicas das regiões do proventrículo foram observados presença de nematóides e ausência de ovos. Na região glandular do proventrículo os nematóides foram encontrados na luz das glândulas (Fig. 11 A) que liberam enzimas digestivas, foi nessa região do tecido que se observou a maior quantidade de nematóides . Em contrapartida ovos de nematóides foram observados na camada queratinóide dos ventrículos e ainda nematóides foram encontrados imersos nesta camada bem próximos da mucosa (Fig. 11 B). Glândulas do ventrículo excretam conteúdo celular e resíduos da secreção com restos celulares compondo a camada queratinóide que apresenta ovos (Fig. 11 C).

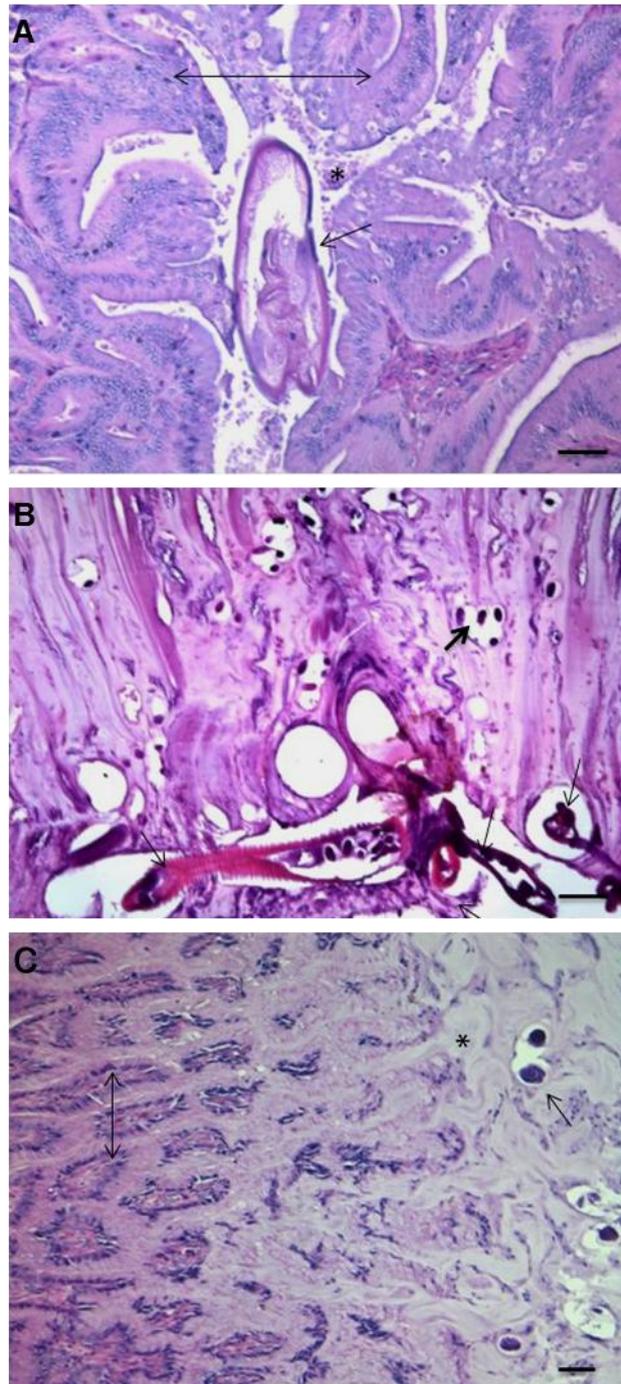


Figura 11- Análises anatomopatológicas de proventrículo e ventrículo de avestruz. (A) Região glandular do proventrículo, nematóide inserido na luz da glândula (seta simples), glândulas do proventrículo (seta dupla), debris celulares (asterísco). Barra: 50 μ m. (B) Região posterior do ventrículo, ovos de nematóide inseridos na camada queratinóide (seta grossa), nematóides inseridos na camada queratinóide (setas finas). Barra: 50 μ m. (C) Região mediana do ventrículo; glândulas do ventrículo (seta dupla), camada queratinóide (asterísco), ovos inseridos na membrana queratinóide (seta simples). Coloração em H&E. Barra: 20 μ m.

VI- Discussão

Nesse trabalho foi estudada a eficácia anti-helmíntica contra *Libyostrongylus* spp. em avestruzes de uma fazenda brasileira e foram feitos estudos anatomopatológico em proventrículo e ventrículo de avestruzes com baixa e alta infecção desse nematóide. Foi determinada a resistência de *Libyostrongylus*. contra ivermectina. Constatou-se que altas infecções do *Libyostrongylus* induzem lesões macroscópicas nos proventrículos já as lesões macroscópicas no ventrículos são quase imperceptíveis.

O estudo sobre a eficácia dos anti-helmínticos demonstrou que o uso contínuo de um produto leva ao estabelecimento da resistência anti-helmíntica (Malan et al., 1988; Souza et al., 2012). Ivermectina foi utilizada na fazenda de estudo como prática de manejo e controle contra a libyostrongylose durante sete anos seguidos com duas aplicações anuais. Esta droga é uma das mais utilizadas na produção de avestruzes no Brasil (Andrade et al., 2011b). Provavelmente devido ao baixo custo e a falta de orientação no manejo correto de anti-helmínticos.

Embora a ivermectina e moxidectina pertença a mesma classe e compartilhem o mesmo modo de ação, os perfis farmacocinéticos destas drogas são significativamente distintos levando a implicações importantes para o desenvolvimento da resistência (Sangster, 1999). Isto provavelmente explica as diferenças na eficácia observadas neste estudo.

O achado de larvas infectantes de *L. dentatus* e *L. douglassii* nas coproculturas de aves tratadas com ivermectina indica que ambas as espécies adquiriram resistência a esse composto demonstrando que o uso prolongado de uma mesma droga tem selecionado indivíduos resistentes. Isto também sugere que ambas as espécies se comportam de forma muito semelhante. Apesar dos resultados encontrados, a ivermectina foi eficaz contra *L. douglassii* em avestruzes na Escócia (Pennycott e Petterson, 2001). Além disso, o uso fenbendazole sozinho ou combinado com resorantel (Fockema et al., 1985; Malan et al., 1988) e a moxidectina também foi eficaz contra *Libyostrongylus* (Bastinello et al., 2005). A eficácia destas drogas indica que elas são adequadas para controlar a libyostrongylose. No entanto, é preciso compreender melhor a eficácia dos fármacos disponíveis contra nematóides de avestruz. Além disso, não há dados de entidades oficiais, tais como a FDA (EUA) ou MAPA (Brasil), que aprova o uso de qualquer composto anti-helmíntico para avestruzes (Bren, 2002).

Uma vez que a produção de avestruz aumentou em vários países a necessidade do uso de anti-helmíntico para o controle de nematóides tornou-se um fato. No entanto, é necessário compreender melhor o metabolismo e farmacocinética de anti-helmínticos em avestruzes. Novos estudos precisam ser realizados para melhor compreender a sensibilidade de *Libyostrongylus* à anti-helmínticos. Além disto, é necessário que os criadores estejam cientes da administração correta e das consequências de não segui-lo.

A distribuição e localização tecidual dos parasitos revelaram que houve grande diferença no quantitativo de nematóides entre as diferentes regiões do proventrículo e do ventrículo em animais sob alta infecção. Ademais, o proventrículo foi o órgão com mais nematóides em animais com carga parasitária elevada. Essa diferença não foi aparente em animais sob baixa infecção. Contudo, quando se analisa por regiões de cada órgão é possível notar uma alta variabilidade muito alta sendo necessário, portanto, analisar um número maior de animais de baixa infecção para validar estatisticamente a possibilidade de existir uma região mais infectada. A literatura descreve *L. dentatus* (Hoberg et al., 1995) habitando proventrículo e ventrículo e *L. douglassii* (Cobbold, 1882) apenas proventrículo. Entretanto, concluímos que ambas as espécies habitam proventrículo e ventrículo e que existe preferência pelo proventrículo em animais mais infectados. Podemos dizer que esta escolha pela região proventricular possa ser relacionada com a morfologia já que existem inúmeras reentrâncias e evaginações que podem facilitar a permanência do parasito no local. Além disto, a camada coileana desta região é mais delgada e macia do que no ventrículo (Huchzermeyer, 2005) algo que pode facilitar o parasitismo.

Com relação à patogenicidade ocasionada por *Libyostrongylus* spp. podemos dizer que quando o parasitismo é nos adenômeros ocorre fusão de algumas dessas estruturas que ficaram bastante destruídas. Além disso, detectamos aumento de secreção com conteúdo celular no lúmen desses adenômeros. É possível que a ação mecânica do nematóide induza esse tipo de alteração morfológica dessas estruturas. O tipo de lesão provocada pela libyostrongylose é de grande importância patológica podendo ser porta de entrada para infecções secundárias e/ou obstrução dos ductos secretores de enzimas digestivas levando a necrose tecidual e consequente morte de avestruzes.

Os infiltrados inflamatórios do tipo heterófilico estão associados à infecção por *Libyostrongylus* spp. (Andrade et al., 2011a). Neste estudo foram encontrados

infiltrados inflamatórios tanto em animais de alta quanto de baixa infecção. Esses infiltratos heterofílicos estão associados também a infiltrados mononucleares. Heterófilos estão agrupados em maior número próximos aos nematóides em animais de alta infecção e dispersos em animais de baixa infecção. Essa distribuição diferenciada do infiltrado inflamatório dependente da carga parasitária pode indicar que em altas infecções exista uma atração maior dessas células de forma específica. A presença desses infiltrados nos tecidos de animais muito e pouco infectados demonstram que heterofilos e outros infiltrados mononucleares participam ativamente da resposta imunológica desta ave contra infecções por nematóides.

As amostras teciduais analisadas aqui eram de animais com infecção mista. Portanto, não foi possível afirmar o tipo de patologia relacionada à espécie, mas observamos lesões erosivas/ulcerativas provocada por agressões mecânica por influência do parasitismo de *Libyostrongylus* spp. confirmando dados publicados (Bastinello et al., 2005). Animais sob alta infecção apresentaram lesões macroscópicas como hiperemia moderada confirmada por microscopia e ainda, lesão erosiva/ulcerativa e presença de infiltrados inflamatórios do tipo heterófilo tanto em animais de alta quanto de baixa infecção. Uma resposta mais definitiva só será obtida em experimentos com infecções monoespecíficas comparado as infecções mistas naturais.

Ovos de nematóides foram encontrados somente na camada queratinóide do ventrículo, embora o parasitismo seja maior na região do proventrículo. Podemos sugerir que ovos ovipositados no proventrículo seguem o fluxo da digestão migrando para o ventrículo onde foram mais encontrados. Ou que as fêmeas migram para o ventrículo e ovipositam nesse órgão.

Informações relacionadas à libyostrongylose são escassas, e como a estrutuicultura tem grande potencial econômico, estudos relacionados a infecções parasitárias têm grande importância neste contexto. Para avaliar todos os impactos provocados em avestruzes pela infecção das diferentes espécies de *Libyostrongylus* spp. torna-se necessário estabelecer uma infecção experimental monoespecífica. Esta, permitirá investigar em detalhe aspectos do ciclo biológico destes parasitos e ainda estabelecer relações à manifestações clínicas, histopatológicas, hematológicas e imunológicas.

VII- Conclusões

A avaliação sobre resistência aos anti-helmínticos demonstrou que a eficácia dos compostos analisados variou. Ivermectina teve uma eficácia de 60% enquanto albendazol e moxidectina de 100%. A fazenda estudada utilizou ivermectina durante sete anos com duas administrações por ano sem fazer rotação da droga, claramente indicando que este período foi suficiente para selecionar indivíduos resistentes na população helmíntica de *Libyostrongylus* spp.

Na quantificação de nematóides por região de proventrículos e ventrículos de animais sob alta infecção observou-se que o órgão mais parasitado foi o proventrículo. A análise histológica dos tecidos desses órgãos observou-se nematóides presentes no ducto secretor dos adenômeros da região glandular do proventrículo, lesões com erosões e ulcerações, danificando o epitélio glandular. Heterófilos foram observados nos infiltrados inflamatórios tanto em animais de baixa quanto de alta infecção. Em animais de alta infecção estes granulócitos estavam agrupados próximos aos nematóides. Os ovos de nematóides foram observados somente na camada queratinóide do ventrículo médio e posterior.

VIII- Referências Bibliográficas

- Agroin, Jornal Agronegócios, 76ª Edição - 20 de janeiro a 11 de fevereiro de 2012, pag. 10-11. Disponível em: <www.agroin.com.br/novo/jornais/20_01_2012.pdf>. Acesso em março de 2013.
- Andrade J.G., Iñiguez A.M., Souza, A.N., Marques, V.C., de Souza Filho, G.A., Santos, C.P., Damatta, R.A. (2013) Genetic characterization of the blood-sucking nematodes *Libyostrongylus dentatus* and *Libyostrongylus douglassii* supports their different evolutionary history. *Veterinary Parasitology*, 193, 193-199.
- Andrade, J.G., de Carvalho, E.C.Q., Santos, C.P. & DaMatta, R.A. (2011a). Mixed infection with *Libyostrongylus dentatus* and *Libyostrongylus douglassii* induces a heterophilic inflammatory infiltrate in the proventriculus of ostriches. *Avian Pathology*, 40, 367-370.
- Andrade, J.G., Lelis, R.T., DaMatta, R.A. & Santos, C.P. (2011b). Occurrence of nematodes and anthelmintic management of ostrich farms from different Brazilian states: *Libyostrongylus douglassii* dominates mixed infections. *Veterinary Parasitology*, 178, 129-133.
- Barton, N.J., Seward, D.A. (1993). Detection of *Libyostrongylus douglassii* in ostriches in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 70, 31-32.
- Bastianello, S., McKenna, P.B., Hunter, J., Julian, A.F. (2005). Clinical and pathological aspects of *Libyostrongylus* infection in ostriches. *Surveillance*, 32, 3-6.
- Batista, A.M.B., Pereira, M.A.V.C., Vita, G.F. (2008). Parasitismo intestinal em avestruz (*Struthio camelus australis* Linnaeus, 1786) da Região Sul do Estado do Espírito Santo, no ano de 2006. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 103, 189-193.
- Bertam, B.C.R. (1992). The Ostrich Communal Nesting System. Princeton University Press, Princeton.
- Bonadiman, S.F., Ederli, N.B., Soares, A.K.P., Moraes Neto, A.H.A., Santos, C.P., DaMatta, R.A. (2006). Occurrence of *Libyostrongylus* sp. (Nematoda) in ostriches (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) from the north region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 137, 175-179.
- Bonadiman, S.F., Stratievsky, G.C., Machado, J.A., Albernaz, A.P., Rabelo, G. R., DaMatta, R.A. (2009). Leukocyte ultrastructure, hematological and serum biochemical profiles of ostriches (*Struthio camelus*). *Poultry Science*, 88, 2298-2306.
- Bren, L.(2002). Treating minor species: a major animal health concern. *FDA veterinarian*, v. XVII, nº 5 set/oct,7-12.
- Clube do avestruz. Disponível em: <<http://WWW.clubedoavestruz.com.br>> Acesso em: 26 janeiro de 2011.

- Cobbold, T.S. (1882). New entozoon from the ostrich. *Journal of the Linnean Society*. 16, 1884-1888.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J. (1992). World Association for the Advancement of *Veterinary Parasitology* (W.A.A.V.P.)
- Craig, T.M., Diamond, P.L. (1996). Parasites of ratites. In: Tully TN, Shane SM (eds). *Ratite Management, Medicine, and Surgery*. Kreiger Publishing Company, Malabar, 115-26.
- DaMatta, R.A., Andrade, J. G., Santos P.C., Filho, G.A.S. Primer para identificação de *Libyostrongylus douglassii* e *L. dentatus* baseado na região rissosomal ITS-1. Depósito de patente: PI1105264-3, 2012.
- Drenowatz, C., Sales, J.D., Sarasqueta, D. V., Weillbrenner, A. (1995). History and geography. In: Drenowatz, C. (ed) *The Ratite Encyclopedia*. Ratite Records, San Antonio, pp. 3-29.
- Ederli, N.B., Bonadiman, S.F., Moraes Neto, A.H.A., DaMatta, R.A., Santos, C.P. (2008a). Mixed infection by *Libyostrongylus douglassii* and *L. dentatus* (Nematoda: Trichostrongylidae) in *Struthio camelus* (Ratites: Struthioniformes) from Brazil with further morphological characterization of adults. *Veterinary Parasitology*, 151, 227 – 232.
- Ederli, N.B., de Oliveira, F.C.R. (2009). Differential Localization of *Libyostrongylus douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 and *L. dentatus* Hoberg, Lloyd and Omar, 1995 (Nematoda, Trichostrongylidae) in Ostrich (*Struthio camelus Linnaeus*, 1758) Proventriculi. *Journal of Parasitology*, 95, 757-759.
- Ederli, N.B., Oliveira, F.C.R., Lopes, C.W.G., DaMatta, R.A., Santos, C.P., Rodrigues, M. L. A. (2008b). Morphological diagnosis of infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 and *L. dentatus* Hoberg, Lloyd and Omar, 1995 (Nematoda Trichostrongylidae) of ostriches. *Veterinary Parasitology*, 155, 232-237.
- Fockema, A., Malan, F. S., Cooper, G.G., Visser, E. (1985). Anthelmintic Efficacy of Fenbendazole Against *Libyostrongylus douglassii* and *Houttuynia struthionis* in ostrich. *Journal of the South African Veterinary Association* 56, 47-48.
- Foreyt, W.J. (2005). Parasitologia veterinária – manual de referência. Editora Roca São Paulo, 326.
- Fowler, M.E. (1991). Comparative clinical anatomy of ratites. *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 22, 204-227.
- Giannoni M.L. (2004). Criação de avestruz. UFV-UOV:Viçosa, 36.
- Gilbert, L.I. (1937). New nematode *Libyostrongylus magnus*, n. sp., papers on Helminthology, 30 years Jubilee (pp. 180-182). Moscow: *Lenin Academy of Agricultural Science*.

- Gomes, R.A., Nascimento, A.A., Bonuti, M.R., Nascimento, G.G., Tebaldil, J.H., Zettermann, C.D. (2002). Ocorrência de *Libyostrongylus* sp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) em avestruzes (*Struthio camelus*) no estado de São Paulo, Brazil. In: XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Verterinária, Rio de Janeiro, RJ CD-ROM R, p.313.
- Gordon, N.M., Whitlock, H.V.(1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Comm. Cient. Indust. Res. Org.* 12, 50-52.
- Hoberg, E.P., Lloyd, S., Omar, H. (1995). *Libyostrongylus dentatus* n. sp. (Nematoda: Trichostrongylidae) from ostriches in North America, with comments on the genera *Libyostrongylus* and *Paralibyostrongylus*. *Journal of Parasitology*, 81, 85-93.
- Hove, T., Mukaratirwa, S. (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in farm-reared ostriches and wild game species from Zimbabwe. *Acta Tropica*, 94,49-53.
- Huchzermeyer, F.W. (2005). Doenças de avestruz e outras ratitas. F.W.Huchzermeyer. Trad. Miriam Luz Giannoni, Adriana A. Novais – Jaboticabal: Funep, 2005 - 2ª impressão, 394p.
- Illanes, J.; Fertilio, B.; Chamblas, M.; Leyton, V. & Verdugo, F. (2006). Descripción histológica de los diferentes segmentos del aparato de avestruz (*Struthio camelus* var. *domesticus*). *Int. J. Morphol.*, 24(2):205-214.
- Jansson D.S., Christensson, B.E., Christensson, B.E., Winter survival in Sweden of L3-stage larvae of the ostrich wireworm *Libyostrongylus douglassii*. *Veterinary Parasitology* 106 (2002) 69-74.
- Jansson, D. S., Chistensson, D. (2000). Gastrointestinala parasite hos strutsfåglar i Sverige, *Svensk Veterinär tidning*, 52, 621-626.
- Jensen, J. M., Johnson, J. H., Weiner, S. T. (1992). Husbandry and Medical Management of Ostrich, Emus and Rheas. Wildlife and Exotic Animal Teleconsultants, College Station, Texas.
- Lane, C. (1923). Some Strongylata. *Parasitology*, 15, 346 – 364.
- Malan, F. S. Gruss, N. A., Roper, N.A. Ashburner, A. J., Du Plessis, C. A. (1988) Resistance of *Libyostrongylus douglassii* in ostriches to levamisole. *Journal of the South African Veterinary Association*, 59, 202-203.
- Maxwell, M.H. e Robertson, G.W. (1998). The avian heterophil leukocyte: a review. *World's Poultry Science Journal*, 2, 155-178.
- McKenna, P.B. (2005). *Libyostrongylus* infections in ostriches a brief review with particular reference to their detection in New Zealand. *New Zealand The Veterinary Journal*, 53, 267-270.
- Mertins, J. W., Schlater, J. L. (1991). Exotic ectoparasites of ostriches recently imported into the United States. *Journal wildlife Diseases*, 27, 180-182.

- Monteiro, R.M.C., Souza, M.T.N., Carvalho, G.R., Souza, M.W. (2009). Análise histológica do trato gastrintestinal de avestruzes jovens (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758). *Biotemas*, 22, 149-155.
- Mukaratirwa, S., Cindzi, Z.M., Maononga, D.B. (2004). Prevalence of *Libyostrongylus douglassii* in commercially reared ostriches in the highveld region of Zimbabwe. *Journal of Helminthology*, 78, 333-336.
- Mushi, E.Z., Binta, M.G., Chabo, R.G., Isa J.F., Kapaata, R.W. (1999a). Selected hematologic values of farmed ostriches (*Struthio camelus*) in Botswana. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4, 372-374.
- Nel, C. J. (1980) Dosing of ostriches for internal parasites. *Elsenburg Joernaal*, 4, 31-33.
- Palerani, M. A., Camisasca, S., Beretta, G., Penon P., Bertolo, G., Crivelli, G. (1998). Ostrich meat: physico-chemical characteristics and comparison with turkey and bovine meat. *Meat Science* 48, 205-210.
- Pennycott, T., Patterson, T. (2001). Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinary Record*, 148, 155-156.
- Ponce Gordo, F., Herrera, S.A.T., Castro, B.G.D., Dyaz, M.R.A. (2002). Parasites in Europe. *Veterinary Parasitology*, 107, 137-160.
- Ponce Gordo, F., Corraleche, L., Bourkaib, V., López Medina, N., Alvarez Ruiz, N., Pérez, C., Martínez Díaz, R.A. (2000). Primeros datos sobre las parasitosis por metazoos en las ratites españolas. In: Fernández Buendía, F., Pablos Chi, M.V., Tarazona Lafarga, J.V. (Eds.), Globalización medioambiental: perspectivas agrosanitarias y urbanas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, pp. 405-410.
- Reinecke, R. K. (1983). *Veterinary Helminthology*. Durban: Butterworth.
- Sangster, N. C., 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? *Vet. Parasitol.* 85, 189-204
- Santos, C.P., Andrade, J.G., DaMatta, R.A. (2010). In update on *Libyostrongylus*, a gastrointestinal nematode of ostriches. In G.V. Lamann (Ed.) *Veterinary Parasitology* (pp. 179-192). Nova Science Publishers: New York.
- Shane S.M.. (1998). Infectious diseases and parasites of ratites. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 14, 455-83.
- Silva, R.A. (2008). Estruticultura, Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivo/file/.../estruticultur_0809.pdf>, acesso em fevereiro.
- Smit, D.J. v.Z. (1963). Ostrich farming in the Little Karoo. Rep. S. Afr. Dept. Tech. Agric. Serv. Bull. No. 358, vol.85. Government Press, Pretoria, South Africa.

- Sotiraki, S.T., Georgiades, G., Antoniadou-Stiriadou, K. & Himonas, C.A. (2001). Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinary Record*, 148, 84-86.
- Souza J.D.S. (2004). Criação de avestruz. Editora aprenda fácil (Viçosa), 210.
- Souza, P.L., Lelis, T.R., Granja, A.R.I., DaMatta, A. R., Santos, P.C.(2012). Efficacy of albendazole and moxidectin and resistance to ivermectin against *Libyostrongylus douglassii* and *Libyostrongylus dentatus* in ostriches. *Veterinary Parasitology*, 189, 387-389.
- Stevens C. E., Hume, I. D. (1995). Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System, 2 ed. New York: Cambridge University Press.
- Stewart JS. Husbandry, medical and surgical management of ratites Part II. Proceedings of the American Association of zoo Veterinarians. Pq 119-22, 1989.
- Tišljar, M., Beck, R., Cooper, R.G., Marinculić, A., Tudja, M., LukačNovak, I., Grabarević, Ž., Herak-Perković, V., Šimpraga, B. (2007). First finding of libyostrongylosis in fareared ostriches (*Struthio camelus*) in Croatia: unusual histopathological finding in brain of two ostriches, naturally infected with *Libyostrongylus douglassii*. *Veterinary Parasitology*. 147, 117-124.
- Torgerson, P.R., Schnyder, M. Hertzberg, H. (2005). Detection of anthelmintic resistance: a comparison of mathematical techniques. *Veterinary Parasitology*, 128, 291-298.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., Samson-Himmelstjerna, G. & Sangster, N.C. (2004). Drug resistance in veterinary helminthes. *Trends in Parasitology*, 20, 469-476.

IX- Apêndice

G Model
VETPAR-6361; No. of Pages 3

ARTICLE IN PRESS

Veterinary Parasitology xxx (2012) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

Efficacy of albendazole and moxidectin and resistance to ivermectin against *Libyostrongylus douglassii* and *Libyostrongylus dentatus* in ostriches

Lara Pereira de Souza^a, Rosane Teixeira Lelis^a, Igor Rio Apa Granja^b,
Renato Augusto DaMatta^a, Clóvis de Paula Santos^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biotecnologias e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28013-602 Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

^b Rtoapavestruzes, 28013-600 Guarani, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2012

Received in revised form 18 April 2012

Accepted 20 April 2012

Keywords:

*Libyostrongylus douglassii**Libyostrongylus dentatus*

Anthelmintic resistance

Ostrich

Albendazole

Moxidectin

Ivermectin

ABSTRACT

Anthelmintic resistance has emerged globally as a problem amongst nematode of livestock and has been particularly well documented in equine and small ruminants. There are no studies regarding the efficacy of anthelmintics against the hematophagous nematodes in ostriches, *Libyostrongylus dentatus*; and just a few on *L. douglassii*. Here the efficacy of albendazole, ivermectin and moxidectin were evaluated against these two species in an ostrich farm in Minas Gerais state, Brazil. The feces were collected on the day of treatment and after 13 days of an oral dose of albendazole (6 mg/kg), or an injected dose (0.2 mg/kg) of ivermectin or moxidectin. The fecal egg count reduction test and coprocultures were performed to determine possible resistance against the drugs used. An efficacy of 60% was found for ivermectin, while albendazole and moxidectin were 100% effective. Both worm species appeared to have reduced sensitivity to ivermectin.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Libyostrongylus douglassii and *L. dentatus* are haematophagous parasites located in the proventriculus and ventriculus of ostriches (Ederli et al., 2008a, 2008b). These helminths are widely distributed in Brazil (Andrade et al., 2011a). Parasitism by *L. douglassii* may cause anemia, weight loss, anorexia, proventriculitis, killing young ostriches (Reinecke, 1983) and occasionally adults (Reinecke, 1983; Bastianello et al., 2005; Santos et al., 2010). Heterophilic inflammatory infiltration near nematodes has also been associated with mixed infections of *L. douglassii* and *L. dentatus* (Andrade et al., 2011b).

Libyostrongylus control is curative or preventive similar to that of other nematodes of production animals (Santos

et al., 2010). Anthelmintics have been widely used in livestock for the control of parasites. Because of heavy reliance on these drugs and their widespread use anthelmintic resistant parasites emerged as a major problem (Coles, 2005). This phenomenon was first reported by Malan et al. (1988) in South African ostriches that received levamisole at 30 mg/kg to control *Libyostrongylus* infection; since then, no other report was published on this subject. However, anthelmintic resistance may be common among *Libyostrongylus* but has not been well documented.

Management practices in Brazil, from 17 farms located in 9 states, revealed that the majority of anthelmintic management schemes are based on the annual treatment with ivermectin (Andrade et al., 2011a). Fenbendazole and albendazole use was also reported but anthelmintics were not rotated on any of the examined farms (Andrade et al., 2011a). The objective of the present study was to evaluate the efficacy of ivermectin, albendazole and moxidectin against *Libyostrongylus* in ostriches raised on a farm in the

* Corresponding author. Tel.: +55 22 2739 7180; fax: +55 22 2739 7178.
E-mail address: cps@uenf.br (C.d.P. Santos).

state of Minas Gerais, Brazil with a history of ivermectin use.

2. Materials and methods

The study was performed in an ostrich farm located in the municipal district of Guarani in the state of Minas Gerais. The production of ostriches on the farm began in 2004 and since then, ivermectin has been used twice a year for the control of parasites. The anthelmintic test used 16 adult ostriches for each drug evaluated. The birds were treated with an oral dose of albendazole (6 mg/kg) and an injectable dose (0.2 mg/kg) of ivermectin or moxidectin. The dosages for ivermectin and moxidectin were based on the literature that reports the use of these compounds to ostriches (Pennycott and Patterson, 2001; Bastianello et al., 2005). These doses were the same as recommended by the manufacturer to other livestock animals. Although albendazole has not been used in ostriches, the rationale of the authors of the articles cited above was followed, and the recommended manufacturer dosage for the same types of animals was adopted. The brand names of these drugs and the company that manufactures them were as follow: albendazole, "Ricobendazole oral", manufactured by "Ouro Fino"; ivermectin, "Ivomec injetavel 50 ML – Ivermectina Merial 1%", manufactured by "Merial Brasil"; moxidectin, "Cydectin NF 500 ML – Fort Dodge – Moxidectina 1%", manufactured by "Fort Dodge". All birds used were infected with both *Libyostrongylus* species.

The feces were collected from each ostrich, on the day of treatment and after 13 days, with the aid of a disposable plastic bag immediately after defecation, avoiding the part that contacted the soil or the vegetation (Andrade et al., 2011a). Two grams of feces were used for quantifying the number of eggs per gram (EPG), according to the modified technique of Gordon and Whitlock (1939). This technique uses the Mac Master chamber that detects above 50 EPG. The efficacy of the drugs was calculated as $E = 100 [1 - (Xt/Xc)]$; Xt and Xc are the arithmetic mean of EPG before (c) and after (t) 13 days of anthelmintic treatment for each group (Coles et al., 1992). The anthelmintic resistance was confirmed if the % of the fecal egg count reduction was <95% (Coles et al., 1992). Fecal cultures were performed in samples positive for eggs after treatment, the infective larvae were identified as before (Ederli et al., 2008b) and a mean of all the animals calculated.

3. Results and discussion

The efficacy of the anthelmintics varied. Ivermectin had an efficacy of 60%, while albendazole and moxidectin of 100% (Table 1). The farm studied here used ivermectin twice a year for 7 years without rotation of the drug, clearly indicating that this period was sufficient to select resistant individuals in the helminth population. Ivermectin is one of the most widely drugs used in ostrich breeding in Brazil (Andrade et al., 2011a). This is probably due to the low cost and lack of guidance in anthelmintic management.

Although, ivermectin and moxidectin belong to the same class and share the same mode of action, the pharmacokinetic profiles of these drugs are significantly distinct

Table 1
Anthelmintic effect of albendazole, ivermectin and moxidectin against *Libyostrongylus douglassii* and *L. dentatus* in ostriches in the state of Minas Gerais, Brazil.

Anthelmintic	EPG	Pre-treatment						Post-treatment						Variance of reduction	% Efficacy (95% CL)
		Mean ^c	Standard deviation	Variance	Variations in counts	95% confidence limits (CL)		Mean	Variance	Standard deviation	Variations in counts	95% confidence limits			
						Minimum	Maximum					Minimum	Maximum		
Albendazole ^a	1631	1275	1,626,292	200–4000	952	2311	0	0	0	0	0–0	0	0	0	100 (100)
Ivermectin ^b	1113	1056	1,115,833	100–3300	550	1675	450	1,186,667	1089	0–4400	–130	1030	0–0	0	60 (–58/90)
Moxidectin ^b	2000	3817	1,457,200	200–14,900	–34	4034	0	0	0	0–0	0	0	0	0	100 (100)

^a Oral dose of 6 mg/kg.

^b Injectable dose of 0.2 mg/kg.

^c Mean values of 16 animals per group.

and these differences may have important implications for the development of resistance (Sangster, 1999). This probably explains the differences in efficacy observed here.

Infective larvae of *L. dentatus* (56.7%) and *L. douglassii* (43.3%) were recovered on the coprocultures from ostriches treated with ivermectin. This result indicates that both *Libyostrongylus* species have acquired resistance to ivermectin showing that the prolonged use of the same drug has selected resistant individuals. This also suggests that both species behave very similarly.

Despite the results found here, ivermectin was effective against *L. douglassii* in ostriches in Scotland (Pennycott and Patterson, 2001). Moreover, fenbendazole alone or combined with resorantel (Fockema et al., 1985; Malan et al., 1988) and moxidectin has also been effective against *Libyostrongylus* (Bastianello et al., 2005). The efficacy of these drugs indicates that they are adequate to control *Libyostrongylus*. However, further work needs to be done to better understand the efficacy of the available drugs against nematodes of ostriches. Furthermore, there are no data from official bodies such as the FDA (USA) or ANVISA (Brazil) approving the use of any anthelmintic compound for ostriches although the subject has been discussed in the USA (Bren, 2002).

The fecal egg count reduction test is one of the most important methods to detect anthelmintic resistance because it can be used for all drug groups and is inexpensive as compared to other *in vivo* test such as the "controlled test". Although we have performed this classic test for detection of anthelmintic resistance and it clearly indicates resistance in the case of ivermectin, care must be taken in the interpretation of data generated by this test because it has not been completely validated for ostriches.

Since the production of ostrich has spread in several countries the use of anthelmintic for control of nematode parasites is a fact. However, it is necessary to better understand the metabolism and pharmacokinetics of anthelmintics in ostriches. Further studies in other properties should be performed to better understand the sensitivity of *Libyostrongylus* to anthelmintics. Moreover, producers need to be aware of the correct anthelmintic management and the consequences of not following it properly.

Acknowledgments

The authors would like to thank Andréa Carvalho César for proof reading the manuscript, referees for their

helpful suggestions and the fostering agencies Fundação Carlos Chagas Filho do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Andrade, J.G., Lelis, R.T., DaMatta, R.A., Santos, C.P., 2011a. Occurrence of nematodes and anthelmintic management of ostrich farms from different Brazilian states: *Libyostrongylus douglassii* dominates mixed infections. *Vet. Parasitol.* 178, 29–133.
- Andrade, J.G., Carvalho, E.C.Q., Santos, C.P., DaMatta, R.A., 2011b. Mixed infection with *Libyostrongylus dentatus* and *Libyostrongylus douglassii* induces a heterophilic inflammatory infiltrate in the proventriculus of ostriches. *Avian Pathol.* 40, 367–370.
- Bastianello, S., McKenna, P.B., Hunter, J., Julian, A.F., 2005. Clinical and pathological aspects of *Libyostrongylus* infection in ostriches. *Surveillance* 32, 3–6.
- Bren, L., 2002. Treating minor species: a major animal health concern. *FDA veterinarian*, v. XVII, n° 5 set/oct, 7–12.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–44.
- Coles, G.C., 2005. Anthelmintic resistance – looking to the future: a UK perspective. *Res. Vet. Sci.* 78, 99–108.
- Ederli, N.B., Bonadiman, S.F., Moraes Neto, A.H.A., DaMatta, R.A., Santos, C.P., 2008a. Mixed infection by *Libyostrongylus douglassii* and *L. dentatus* (Nematoda: Trichostrongylidae) in *Struthio camelus* (Ratites: Struthioniformes) from Brazil with further morphological characterization of adults. *Vet. Parasitol.* 151, 227–232.
- Ederli, N.B., de Oliveira, F.C.R., Lopes, C.W.G., DaMatta, R.A., Santos, C.P., Rodrigues, M.L.A., 2008b. Morphological diagnosis of infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 and *L. dentatus* Hoberg, Lloyd and Omar, 1995 (Nematoda: Trichostrongylidae) of ostriches. *Vet. Parasitol.* 155, 323–327.
- Fockema, A., Malan, F.S., Cooper, G.G., Visser, R.E., 1985. Anthelmintic efficacy of fenbendazole against *Libyostrongylus douglassii* and *Houttuynia struthionis* in ostriches. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 56, 47–48.
- Gordon, N.M., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Comm. Cient. Indust. Res. Org.* 12, 50–52.
- Malan, F.S., Gruss, N.A., Roper, N.A., Ashburner, A.J., Du Plessis, C.A., 1988. Resistance of *Libyostrongylus douglassii* in ostriches to levamisole. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 59, 202–203.
- Pennycott, T., Patterson, T., 2001. Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*). *Vet. Rec.* 148, 155–156.
- Reinecke, R.K., 1983. *Veterinary helminthology*. Butterworth, Durban, p. 295.
- Sangster, N.C., 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? *Vet. Parasitol.* 85, 189–204.
- Santos, C.P., Andrade, J.G., DaMatta, R.A., 2010. An update on *Libyostrongylus*, a gastro-intestinal nematode of ostriches. In: Lamann, G.V. (Ed.), *Veterinary Parasitology*. Nova Science Publishers, pp. 179–192 (Chapter 7).