

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
UENF**

CARINA DOS SANTOS TEIXEIRA

**ENTEROPARASITAS OBSERVADOS EM FEZES DE EMU, *Dromaius
novaehollandiae* LATHAM, 1790 (AVES, STRUTHIONIFORMES)**

Campos dos Goytacazes

2013

CARINA DOS SANTOS TEIXEIRA

ENTEROPARASITAS OBSERVADOS EM FEZES DE EMU, *Dromaius novaehollandiae* LATHAM, 1790 (AVES, STRUTHIONIFORMES)

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

ORIENTADOR Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

Campos dos Goytacazes

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força para enfrentar tantos desafios e dúvidas durante a realização deste trabalho, permitindo que eu fizesse as melhores escolhas, porque sei que Ele sempre está presente e me guiando nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus pais, Maria Ilda Rodrigues dos Santos e Luiz Carlos Zebende Teixeira que dedicaram a mim todo o seu tempo e amor, me dando carinho, me apoiando sempre em minhas decisões, ainda que não fosse o que eles acreditavam ser o melhor para mim.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira, que participou de toda a minha trajetória universitária e ao lado de quem cresci muito como pessoa. Aprendi com ele o significado das palavras “admiração” e “respeito”. Ele nunca foi um chefe, mas sim um grande amigo.

Às amigas Carolina Montes Silva, Luciana Salles Vasconcelos Henriques, Amanda Lucia Jiménez Sanz, Maria Luiza Serafim, Samira Salim Mello Gallo e aos amigos Murilo de Oliveira Bôa Morte, Vagner Ricardo da Silva Fiuza e André Mauricio Barroso, que tornaram esse caminho mais agradável, e que sempre estarão presentes em minhas lembranças.

RESUMO

TEIXEIRA, C. S. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Setembro de 2013. Enteroparasitas observados em fezes de emu, *Dromaius novaehollandiae* LATHAM, 1790 (AVES, STRUTHIONIFORMES). Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Emus, *Dromaius novaehollandiae*, Latham, 1790, são aves sem capacidade de voo, exóticas no Brasil e protegidas pelo Estatuto de Proteção Ambiental e Conservação da Biodiversidade da Austrália. Embora esta ratita seja conhecida desde 1696 pouco se sabe sobre as parasitoses que acometem esta ave. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de parasitas intestinais, principalmente de coccídeos que parasitam os emus, de criatório científico da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Para tanto, amostras fecais coletadas bimestralmente de 13 aves foram examinadas pelas técnicas de exame direto a fresco e exame direto após centrifugação, além da técnica de centrifugo-flutuação em solução de sacarose. Ovos e larvas de vermes, bem como, protozoários (trofozoítos, cistos e oocistos), foram morfológica e morfometricamente avaliados. Análise molecular através da PCR com iniciadores específicos para os gêneros *Entamoeba*, *Giardia* e *Cryptosporidium* foram realizadas. Após análise dos dados foi possível inferir que emus, são hospedeiros de espécies de helmintos característicos das ordens Strongilida e Ascaridida, bem como da classe Cestoda, além de protozoários dos gêneros *Entamoeba*, *Giardia*, *Isospora* e *Eimeria*.

Palavras-chaves: Ratitas, protozoários, helmintos, coccídia

ABSTRACT

TEIXEIRA, C. S. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Setembro de 2013. Enteroparasitas observados em fezes de emu, *Dromaius novaehollandiae* LATHAM, 1790 (AVES, STRUTHIONIFORMES). Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Emus, *Dromaius novaehollandiae* Latham, 1790, is a bird without flight capability, exotic in Brazil and protected by the Environmental Protection and Biodiversity Conservation Act of Australia. Although this ratita has been known since 1696 little is known about the parasites that affect this bird. The objective of this research was to verify the presence of intestinal parasites, mainly coccidia parasitizing emus, at a scientific farm State of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). For this, fecal samples collected bimonthly from 13 birds were examined by the techniques of direct fresh and direct examination after centrifugation, and the technique of centrifugal flotation in sucrose solution. Eggs and larvae, worms and protozoa (trophozoites, cysts and oocysts) were morphologically and morphometrically evaluated. Molecular analysis by PCR with primers specific for the genera *Entamoeba*, *Giardia* and *Cryptosporidium* were performed. After analyzing the data it was possible to infer that emus are host of helminth species characteristic of orders Strongilida and Ascaridida as well as the class Cestoda and protozoa of the genus *Entamoeba*, *Giardia*, *Isospora* and *Eimeria*.

Keyword: Ratites, protozoa, helminths, coccidia

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sequências de iniciadores utilizados nas reações de PCR ...	50
Quadro 2	Amplificação e ciclos do termociclador utilizados na reação de PCR para <i>Entamoeba</i> sp.	51
Quadro 3	Amplificação e ciclos do termociclador utilizados nas reações de <i>nested</i> PCR para <i>Giardia</i> spp.	52
Quadro 4	Amplificação e ciclos do termociclador utilizados nas reações de <i>nested</i> PCR para <i>Cryptosporidium</i> spp.	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Foto microscopia de *Entamoeba* sp. observadas em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*. Em A e B, trofozoítos característicos com projeções hialinas do ectoplasma e núcleos bem visíveis observados em solução saturada de sacarose. Em C e E, cistos com um núcleo bem visível observados em solução saturada de sacarose e em esfregaço corados pelo Lugol a 2 %, após concentração por centrifugação, respectivamente. Em D e F, cistos multinucleados observados em solução saturada de sacarose e esfregaço a fresco corado pelo Lugol a 2%, respectivamente. Barras de 20 μm 56
- Figura 2 Foto microscopia de trofozoíto (A) e cisto (B) de *Giardia* spp. observados em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*, em solução saturada de sacarose. Barras de 10 μm 57
- Figura 3 Foto microscopia de oocistos de coccídeos observados em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*, em solução saturada de sacarose. Em A, *Eimeria* spp. e em B, *Isospora* spp. Barras de 5 μm 57
- Figura 4 Foto microscopia de ovos de nematóides do tipo Cestoda presentes em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*, em solução saturada de sacarose. Observar formas diferentes de acordo com o desenvolvimento. Em A e B, barras com 20 e 10 μm , respectivamente 58

Figura 5	Foto microscopia de ovos e larva de nematóides do tipo Strongylida, presentes em fezes de Emu, <i>Dromaius novaehollandiae</i> , em solução saturada de sacarose. Barras de 50 μm	59
Figura 6	Foto microscopia de ovo fértil de <i>Baylisascaris</i> spp. (A) e em B, ovo infértil do tipo Ascaridia observados em fezes de Emu, <i>Dromaius novaehollandiae</i> em solução saturada de sacarose. Barras de 50 μm	60
Figura 7	Foto microscopia de ovos de nematóides operculados (A e B) e bioperculados (C e D) observados em fezes de Emu, <i>Dromaius novaehollandiae</i> em solução saturada de sacarose. Em destaque (seta), estrutura aderida ao opérculo de alguns ovos. Barras de 10 μm	61
Figura 8	Protozoários não identificados em fezes de Emu, <i>Dromaius novaehollandiae</i> , observadas em solução saturada de sacarose. Em A, forma arredondada e parede esfeérica, com núcleo periférico; em B, forma ovalada a elipsóide parecido com um oocisto não esporulado; em C, observam-se três oocistos com forma indefinida e dois com formato ovalado a elipsóide, em destaque (seta) protozoário em esporulação; em D, uma forma arredondada com parede ciliada. Barras de 10 μm	62
Figura 9	Foto microscopia de coccídeos observados em fezes de Emu, <i>Dromaius novaehollandiae</i> , após 10 dias de aeração forçada e concentrados em solução saturada de sacarose. Destaque para parede dupla característica de oocistos (setas), forma e tamanhos diferentes (A, B, C e D) e a não esporulação dos mesmos no período. Barras de 10 μm	63

Figura 10	<p>Oocisto esporulado de <i>Isospora</i> spp. isolado em fezes de Emu, <i>Dromaius novaehollandae</i>. Em A, foto microscopia em solução saturada de sacarose e em B, fotomicrografia mostrando oocisto (a) com dois esporocistos e quatro esporozoítas em seu interior, além das variações (b e c) observadas do corpo de Stieda e substieda. Barra com 10 μm</p>	64
Figura 11	<p>Eletroforese em gel de agarose (1%) com produtos da <i>nested</i> PCR do gene 18S rRNA de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. Marcador de peso molecular (M), controle positivo (P), controle <i>nested</i> negativo (N), e amostras negativas. A seta indica a posição relativa com o respectivo peso molecular do fragmento do DNA amplificado para <i>Cryptosporidium</i> spp.</p>	66
Figura 12	<p>Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de <i>Giardia</i> spp. Marcador de peso molecular (M), controle positivo (P), controle (<i>nested</i>) negativo (N), controle negativo (-) e as amostras 2, 6 e 12 positivas. A seta indica a posição relativa com o respectivo peso molecular do fragmento do DNA amplificado para o protozoário</p>	67
Figura 13	<p>Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de cistos e trofozoítos de <i>Entamoeba</i> sp. Marcador de peso molecular (M), controle positivo (P), controle negativo (N) e amostras 6, 7 e 12 positivas. A seta indica a posição relativa com o respectivo peso molecular do fragmento do DNA amplificado para o protozoário</p>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Morfometria de oocistos de <i>Isospora</i> sp. isolados de fezes de Emu, <i>Dromaius novaehollandiae</i>	65
Tabela 2	Morfometria de estádios de protozoários e helmintos observados em fezes de Emu, <i>Dromaius novaehollandiae</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - Antibióticos Promotores de Crescimento

°C - Graus Celsius

DM - Diâmetro Maior

dm - Diâmetro Menor

DMSO – Dimethyl Sulfoxide

DNA – Deoxyribonucleic Acid

dNTP – Deoxyribonucleoside Triphosphate

EDTA – Ethylenediaminetetra-acetic Acid

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FAO - Food and Agricultural Organization

g - grama

LDL – Low Density Lipoproteins

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

µl - Microlitros

µm - Micrômetros

ml - Mililitros

mm - Milímetros

mM - Milimolar

OMS - Organização Mundial de Saúde

OOPG - Ovos/oocistos por grama de Fezes

pb - Pares de Base

PBS – Phosphate Buffered Saline

PCR – Polymerase Chain Reaction

pH - Potencial Hidrogênico

rpm - Rotações por Minutos

TAE - Tris Acetato EDTA

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	17
3.1.1	Histórico	17
3.1.2	Classificação Taxonômica	18
3.1.3	Comportamento, Manejo e Comercialização	18
3.2	PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS E A COCCIDIOSE EM AVES ...	19
3.2.1	<i>Eimeria</i> spp.	21
3.2.1.1	Aspectos Morfológicos e Espécies	22
3.2.1.2	Ciclo Biológico	23
3.2.2	<i>Isospora</i> spp.	24
3.2.2.1	Aspectos Morfológicos e Espécies	25
3.2.2.2	Ciclo Biológico	25
3.2.3	<i>Cryptosporidium</i> spp.	26
3.2.3.1	Aspectos Morfológicos e Espécies	27
3.2.3.2	Ciclo Biológico	28
3.2.4	<i>Giardia</i> spp.	29
3.2.4.1	Aspectos Morfológicos e Espécies	31
3.2.4.2	Ciclo Biológico	32
3.2.5	<i>Entamoeba</i> sp.	32
3.2.5.1	Aspectos Morfológicos e Espécies	33
3.2.5.2	Ciclo Biológico	34
3.3	NEMATOIDES	35
3.3.1	Aspectos Morfológicos e Espécies	36
3.3.2	Ciclo Biológico	37
3.4	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	37
3.5	PREVENÇÃO E PROFILAXIA	40

4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	COLETA FECAL	43
4.2	ANIMAIS UTILIZADOS	43
4.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	44
4.3.1	Identificação morfológica e morfométrica de trofozoítos, cistos, oocistos e ovos nas fezes	44
4.3.1.1	Exame direto a fresco	44
4.3.1.2	Exame direto após centrifugação	45
4.3.1.3	Centrifugo-Flutuação em Solução de Sacarose	45
4.3.1.4	Esporulação	46
4.3.2	Biologia Molecular	47
4.3.2.1	Concentração dos Oocistos	47
4.3.2.2	Extração do DNA	48
4.3.2.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	49
4.3.2.4	Análise dos fragmentos da PCR	53
5	RESULTADOS	54
5.1	MICROSCOPIA: MORFOLOGIA E MORFOMETRIA	54
5.2	BIOLOGIA MOLECULAR	65
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO	74
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 120/2013

Teixeira, Carina dos Santos

Enteroparasitas observados em fezes de emu, *Dromaius novaehollandiae* LATHAM, 1790 (aves, Struthioniformes) / Carina dos Santos Teixeira. – 2013.

95 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. 73 – 94.

1. Ratitas 2. Protozoários 3. Helmintos 4. Coccidia I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 636.089

1 INTRODUÇÃO

Com o intuito de fornecer aos consumidores couro de alta qualidade e principalmente, carne saudável com melhores componentes nutricionais e outros subprodutos, a criação de ratitas tornou-se uma alternativa aos produtores. Dentre estas, o emu, *Dromaius novaehollandiae*, ave nativa da Austrália, vem sendo criado de forma complementar a outras atividades pecuárias.

A criação de emus tem grande potencial de crescimento devido a docilidade, baixo custo de manutenção, pequena área necessária para se estabelecer e fácil adaptação desses animais a climas variados, além da grande variedade de produtos finais comercializáveis.

O mercado americano para criação de emu está totalmente estabelecido sendo criados em grande escala. Na Índia, a criação desses animais está dando os primeiros passos devido aos investimentos do governo deste país. Emus de vida livre na Austrália são protegidos por lei e aqueles destinados ao setor comercial, são criados em cativeiro.

Avestruzes, emas e emus tem sido cada vez mais produzidos fora de seu habitat natural, resultando em relatos de novas e raras doenças nestas aves. Desta forma criou-se uma preocupação quanto à exposição dessas aves a agentes infecciosos de outras aves não ratitas, mamíferos e humanos.

Entre as parasitoses, a coccidiose é a de maior importância para estudos em aves. Esta doença é reconhecida mundialmente por implicar em prejuízos econômicos, inclusive no Brasil, onde se estima que os gastos com prevenção e tratamento estejam por volta de 100 milhões de reais. Em aves não domésticas os gêneros de coccídeos mais importantes para estudos são *Eimeria*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Caryospora*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a presença de parasitas intestinais, principalmente, coccídeos que parasitam emus, *D. novaehollandiae*, provenientes do criatório científico da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), na cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença de helmintos e protozoários intestinais em emus do criatório científico da UENF;
- Descrever o fenótipo dos coccídeos nessas aves,
- Identificar *Entamoeba*, *Giardia* e *Cryptosporidium* através da técnica de PCR.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Dromaius novaehollandiae*

3.1.1 Histórico

Há muitos anos, o homem passou a ocupar a Austrália e várias espécies de herbívoros sofreram com o impacto dessa ocupação, muitos deles sendo extintos. Ao contrário, os emus sobreviveram à ocupação humana, nestas áreas (RESILIENCE SCIENCE, 2012).

No ano de 1696, emus foram avistados pela primeira vez por exploradores europeus na costa da Austrália. Quase 100 anos mais tarde, em 1789, essas aves foram descritas pela primeira vez e nomeadas pelo ornitólogo John Latham sob o nome de “New Holland Cassowary” (AVIAN WEB, 2012).

Antes da colonização europeia, eram comuns na Austrália duas espécies de emus: *Dromaius baudinianus* e *Dromaius ater*, sendo extintas logo após a colonização por volta de 1788. *Dromaius novaehollandiae diemenensis* é uma subespécie que só foi extinta por volta de 1865 (AVIAN WEB, 2012).

Durante a década de 30, essas aves foram consideradas pragas, pois muitos emus destruíram plantações em busca de comida, sendo então caçadas, extensivamente, quase chegando à extinção. Em 1960, o emu foi designado o pássaro nacional da Austrália. Esse animal está presente no brasão de armas australiano ao lado de um canguru. São considerados símbolos do progresso do país, pois nunca andam para trás. De 1999 até hoje, essas aves são protegidas pelo Estatuto de Proteção Ambiental e Conservação da Biodiversidade da Austrália (KANGAROO EDUCATION, 2012).

3.1.2 Classificação Taxonômica

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Filo: Chordata Bateson, 1885

Classe: Aves Linnaeus, 1758

Superordem: Palaeognathae (Ratitas) Pycraft, 1900

Ordem: Struthioniformes Latham, 1790

Família: Dromaiidae Huxley, 1868

Gênero: Dromaius Vieillot, 1816

Espécie: Dromaius novaehollandiae Latham, 1790

3.1.3 Comportamento, Manejo e Comercialização

Assim como todas as ratitas, os emus não possuem capacidade de voo devido a características anatômicas. O osso esterno não possui quilha, não há presença de musculatura no peito, as penas não apresentam aerodinâmica, os ossos não são ocos e suas asas são muito curtas, com cerca de 18 centímetros de comprimento (KEI, 2012).

A alimentação é à base de insetos, frutas, legumes, flores, sementes e gramíneas (KEI, 2012). É comum vê-los ingerindo pedras para ajudar na trituração dos alimentos. Bebem de dois a quatro litros de água por dia (KEE, 2012). Seu temperamento é dócil com seres humanos, mas podem se tornar agressivos com outros animais como cães, gatos, galinhas, patos entre outros, sendo estes animais vistos como intrusos (KEI, 2012).

Um emu adulto atinge cerca de um metro e meio de altura e pesam em média 54 kg (KEE, 2012), com seu desenvolvimento total antes de um ano de idade, podendo viver mais de 30 anos, principalmente, em cativeiro (KEI, 2012). Todavia, pode atingir à idade de abate entre 16-18 meses. Durante o crescimento, os emus mudam de cor três vezes (TALLBIRDEMU, 2012) e colocam um ovo a cada três dias com o período de incubação entre 50 e 55 dias (KEE, 2012), esses ovos são verde-

escuras e podem pesar entre 400 e 600g (TALLBIRDEMU, 2012). Nestas aves, o macho assume a responsabilidade pela incubação dos ovos e pela alimentação dos filhotes (KEI, 2012).

Entre os produtos que podem ser aproveitados nessa ave, destacam-se o óleo, a carne, o couro, as penas, as unhas e os ovos, que são os mais citados (KEE, 2012). O óleo é um subproduto derivado da gordura e rico em ômega 3, 6 e 9, que é conhecido por reduzir o LDL (conhecido como colesterol ruim). Devido à sua característica hipoalergênica e não comedogênica, o óleo depois de industrializado é utilizado para alívio de artrite, queimaduras, eczema e ajuda na formação do tecido cicatricial de feridas. Provavelmente, devido a estes fatores, o óleo foi empiricamente utilizado por anos pelos povos nativos da Austrália para curar problemas físicos (EOI, 2012).

Por sua vez, a carne é um produto com excelente aproveitamento nestas aves por ser vermelha e nutritiva como a dos mamíferos. Além disso, apresenta um menor teor de gordura e é rica em proteína, ferro, magnésio, fósforo e vitaminas C, B6 e B12 (KEI, 2012).

Com qualidade semelhante ao dos répteis, o couro de emu possui textura fina, macia e flexível, além de ser durável e poder receber grande variedade de cores durante o tingimento, sendo utilizado para confecção de roupas, bolsas e cintos (KEI, 2012). Produtos artesanais também podem ser confeccionados a partir das penas, unhas e ovos, inclusive na fabricação de jóias e acessórios de vestuário (KEI, 2012).

3.2 PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS E A COCCIDIOSE EM AVES

Protozoários intestinais estão sendo um tema cada vez mais estudado em medicina humana em virtude de sua associação com doenças diarreicas agudas e crônicas, tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em indivíduos imunocompetentes, principalmente, idosos e crianças. Essas doenças são comuns em todo o mundo (BOUZID *et al.*, 2008) e de acordo com Karanis *et al.* (2007) as

espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium* causaram a maioria dos surtos epidêmicos associados à veiculação hídrica.

Em aves, os protozoários podem ser encontrados na circulação sanguínea, órgãos internos e são importantes causadores de doenças no trato digestivo desses animais, incluindo orofaringe, intestino e cloaca (SILVANOSE *et al.*, 1998). Os principais protozoários encontrados em aves são *Eimeria* spp., *Isospora* spp., *Sarcocystis* spp., *Giardia* spp., *Trichomonas* spp., *Histomonas* spp., *Hexamita* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Toxoplasma gondii* (SHIRLEY, 1992; GREINER e RITCHIE, 1994).

A patogenicidade da infecção nas aves depende da espécie do coccídeo envolvido na infecção, o número de oocistos infectantes ingeridos (LIMA, 2004), o grau de virulência das cepas envolvidas, suscetibilidade do hospedeiro (KAWAZOE, 2000), o número de células hospedeiras destruídas, a localização do parasita no hospedeiro (FITZGERALD, 1980) e se há o envolvimento concomitante de outros microorganismos (CLIPSHAM, 1995). Esses fatores podem diferir em importância de acordo com a idade e a espécie do hospedeiro (SHIRLEY, 1992).

Alteração no pH do conteúdo intestinal é uma característica observada na fase aguda da infecção por *Eimeria* spp. e este tem influência direta sobre a digestão e a absorção dos nutrientes (COLNAGO, 1999). Essa alteração pode ser devido à modificação no equilíbrio de microorganismos intestinais de aves infectadas com esse coccídeo (LUQUETTI *et al.*, 2006).

Todos os coccídeos do filo Apicomplexa, que possuem estágios de invasão, contendo esporozoítos, merozoítos, taquizoítos e cistozoítos, apresentam polos apicais extremamente especializados, com organelas que permitem que o parasita entre nas células dos hospedeiros (SHIRLEY, 1992). Neles, a forma esporulada dos oocistos é utilizada para fazer a diferenciação de certos gêneros através de sua estrutura (BROWN *et al.*, 2010).

Em ratitas, protozoários coccídeos não estão sendo, devidamente, estudados. Na maioria dos casos, estes são somente incriminados em causar doenças, mas não são desenvolvidos trabalhos para demonstrar sua presença como causador da patologia. Geralmente, a enfermidade está relacionada com a baixa imunidade, infecção mista, estresse e subnutrição dos animais acometidos. Comumente, os animais permanecem assintomáticos (CRAIG e DIAMOND, 1996).

Há dois tipos de tratamentos, um à base de coccidiostáticos (agem no desenvolvimento do parasita) e outro com coccidicida (matam o agente). Medicamentos à base de Sulfa, dependendo da dose, podem agir como coccidiostáticos e coccidicida (OURO FINO, 2012), no entanto, esses medicamentos são utilizados indiscriminadamente em aves sem que se saiba o potencial tóxico ou tempo de permanência nos tecidos destas aves.

3.2.1 *Eimeria* spp.

Várias espécies de *Eimeria* podem estar envolvidas em um quadro de coccidiose (KAWAZOE, 2000). *Eimeria acervulina*, *E. praecox*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. hoganie* e *E. mivati* são as espécies responsáveis por causar a doença em aves, sendo que somente as sete primeiras são aceitas (PENHA *et al.*, 2008).

Os mecanismos que envolvem a especificidade por hospedeiro presente nestes parasitas não são bem compreendidos, mas sugere-se que sejam fatores que incluem genética, nutrição, bioquímica e fatores imunes (SMITH e LEE, 1986; MATHIS e McDOUGALD, 1987). Outra característica do gênero está no fato de que algumas espécies parasitam um tipo particular de células, tecidos e órgãos. Essas variações apresentam importância nos programas de desenvolvimento de vacinações para coccidiose aviária (LILLEHOJ *et al.*, 2000).

A doença entérica em aves ocorre quando as células epiteliais do intestino são destruídas durante a reprodução assexuada, levando à diarreia grave. A má absorção ocorre após atrofia das vilosidades intestinais, prejudicando a absorção de nutrientes. Outras formas da doença podem também ocorrer dependendo da espécie, podendo atingir pulmão, traquéia, fígado, coração e rins (PAGE e HADDAD, 1995). A severidade da eimeriose pode ocorrer ainda como um efeito sinérgico associado a outras doenças (ALLEN e FETTERER, 2002). Uma resposta imune ocorre em uma primo-infecção por *Eimeria* spp., tornando a doença auto-limitante, porém a resistência só ocorre de forma efetiva na segunda infecção (KAWAZOE, 2000).

3.2.1.1 Aspectos Morfológicos e Espécies

Oocistos de *Eimeria* spp. possuem quatro esporocistos, contendo dois esporozoítos cada (LEVINE, 1985). Além disto, esse gênero apresenta diferenças entre os tamanhos (diâmetro), contornos (elíptico, oval ou circular), estruturas internas, espessura de parede e cor de acordo com as espécies (SCHNITZLER et al., 1999). A parede desse coccídeo apresenta diferenças entre as espécies, podendo ter espículas, rugas, micrópila, capuz polar entre outras, e sendo menos comum a presença de corpos de Stieda e substieda (CASAS et al., 1995). Segundo Long e Joyner (1984), o tamanho dos oocistos de *Eimeria* spp. pode variar com o período de patência deste protozoário, não sendo assim, constante.

Embora sejam menos severas, *E. acervulina* e *E. maxima* são as espécies que mais causam prejuízos por alterar o processo de digestão, já que são as espécies que lesam as áreas responsáveis pela absorção dos nutrientes nas aves (COLNAGO, 1999). As espécies *E. tenella* e *E. necatrix* desenvolvem-se nas criptas e lâmina própria e são as mais patogênicas, pois destroem as células parasitadas, resultando em perda de fluido e hemorragia, deixando as aves suscetíveis a infecções bacterianas (KAWAZOE, 2000).

Uma série de características do parasita irá determinar a invasão celular e o que se sabe é que o reconhecimento inicial para invasão da célula hospedeira não é feito por receptores, existindo a necessidade do contato do complexo apical (formado por micronema, grânulos densos, conóide e roptrias) para que a invasão da célula ocorra efetivamente (SHIRLEY, 1992).

A secreção das roptrias pode ser a responsável pela formação do vacúolo parasitóforo (DUBREMETZ et al., 1989). As organelas conhecidas como grânulos densos liberam seu conteúdo dentro do vacúolo parasitóforo uma vez que este tenha sido formado (ENTZEROTH et al., 1986).

Danforth e Augustine (1989) observaram que o corpo refratário de *E. tenella* *in vitro* durante a fase assexuada se dispersa no citoplasma do esquizonte e esta etapa é necessária para que o desenvolvimento continue, conseqüentemente, os esquizontes não amadurecem se essa dispersão não ocorrer.

Outro antígeno que a região apical de esporozoítos e merozoítos apresenta foi descrito por Taylor *et al.* (1990) e é encontrado não só na família *Eimeriidae*, mas também em *Plasmodium* spp. A função dessa proteína não é bem elucidada; segundo Shirley (1992), ela possui característica de uma actina, podendo estar envolvida na mobilidade do parasita. Este mesmo autor relata a importância do conhecimento das organelas apicais na descoberta de antígenos que podem estar implicados na imunidade da infecção.

3.2.1.2 Ciclo Biológico

Em muitas espécies, os esporozoítos liberados dos esporocistos no lúmen intestinal são movidos até a superfície da mucosa para as células epiteliais através de linfócitos intestinais (LAWN e ROSE, 1982). Essas células são capazes de entrar na corrente sanguínea, transportando o parasita e atingindo vários sistemas do hospedeiro (AL-ATTAR e FERNANDO, 1987). Segundo Rose e Hesketh (1991), essa migração para fora do intestino só ocorre em um pequeno número de parasitas.

O ciclo evolutivo de espécies da família *Eimeriidae* é monoxênico no qual somente um hospedeiro é necessário para que o ciclo se complete (BERENQUER, 2006). Oocistos esporulados presentes na cama, alimento ou água são ingeridos e pela ação da moela, sua parede é rompida e liberam os esporocistos. A liberação dos esporozoítos ocorre no intestino delgado após ação das enzimas gástricas e duodenais (ALLEN e FETTERER, 2002). Os esporozoítos invadem as células intestinais, formando um vacúolo parasitóforo e se multiplicam formando o esquizonte, contendo os merozoítos (DANFORTH, 1999).

Esses merozoítos são liberados na luz intestinal e invadem novos enterócitos, dando origem a mais merozoítos (BERENQUER, 2006). Esta é a fase conhecida como esquizogônica ou merogônica e compreende a reprodução assexuada (DANFORTH, 1999). Após a última geração de merozoítos serem formados, esses se diferenciam em macrogameta (gameta feminino) e microgameta (gameta masculino) e esta é a segunda fase chamada gametogônica ou sexual. O

macrogameta é fecundado pelo microgameta, dando origem ao oocisto “imaturo” que é liberado juntamente com as fezes (ALLEN e FETTERER, 2002). A última fase, esporogônica, ocorre no ambiente e depende de fatores tais como temperatura, umidade e oxigenação para haver a formação dos esporocistos e esporozoítos (KAWAZOE, 2000). O clima pode contribuir diretamente sobre a sobrevivência de oocistos de *Eimeria* spp. Eles são capazes de sobreviver em períodos mais úmidos e frios, enquanto que em períodos quentes e secos podem inviabilizar esses oocistos (TORTUGA, 2012).

Os oocistos esporulados continuam viáveis mesmo após contato com substâncias utilizadas como saneantes, tais como quaternários de amônia, fenol, hipocloritos, além de ácidos e bases fortes (KAWAZOE, 2000). Temperaturas inferiores a 10°C ou superiores a 50°C são determinantes para sobrevivência dos oocistos de *Eimeria* spp. não esporulados, com a esporulação, ocorrendo mais rapidamente em temperaturas mais altas e mais lentamente em temperaturas mais baixas (MARTINAUD et al., 2009).

3.2.2 *Isospora* spp.

São hospedeiros específicos e compreendem numerosas espécies que parasitam mamíferos e aves (BERENQUER, 2006); já foram encontradas em Struthioniformes, Falconiformes, Galliformes, Coraciformes, Charadriiformes e Strigiformes (PATTON, 1993).

A doença causada por *Isospora* spp. é conhecida como isosporíase e causa inúmeras alterações na função e estrutura intestinal. As principais alterações observadas são atrofia das vilosidades intestinais e hipertrofia das criptas (GARCIA e BRUCKNER, 1997). A infecção por este protozoário intestinal é incomum no homem (DESPORTES-LIVAGE e DATRY, 2005) e está associado com diarreia severa, em particular com pessoas HIV positivas (LEWTHWAITE et al., 2005).

3.2.2.1 Aspectos Morfológicos e Espécies

O gênero *Isospora* é representado por uma única espécie em humanos, *Isospora belli* e uma em suínos, *Isospora sui*, podendo a isosporíase ser grave tanto em humanos quanto em porcos (DESSPORTES-LIVAGE e DATRY, 2005). Segundo Lindsay e Blagburn (1994), a doença causada por *Isospora* spp. é pouco frequente em primatas não-humanos, cães e gatos, e não causam a enfermidade em cavalos, ruminantes domésticos e aves domésticas. Uma espécie de *Isospora* foi descrita por Yakimoff em 1940 em avestruz e foi identificada como *Isospora struthionis*.

Coccídeos do gênero *Isospora* são dispóricos tetrazóicos o que significa que possuem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (LEVINE, 1985; GARCIA e BRUCKNER, 1997). Oocistos de *I. belli* são bem característicos quando estão maturados, podem ser ovóides ou piriformes pela atenuação de um ou ambos os pólos. O oocisto não possui corpo residual (BERENGUER, 2006); diferentemente, do que ocorre com as espécies do gênero *Eimeria*, oocistos de *Isospora* spp. possuem paredes mais uniformes, sendo necessário observar outras características tais como corpo de Stieda e substieda (CASAS et al., 1995) para chegar à espécie. Em muitas espécies de mamíferos, não se observa corpo de Stieda, enquanto que em muitas espécies de aves ele está presente (LINDSAY e BLAGBURN, 1994).

3.2.2.2 Ciclo Biológico

Espécies de *Isospora* spp. possuem ciclo semelhante ao das espécies de *Eimeira* (PAGE e HADDAD, 1995). Após ingestão do oocisto esporulado, ocorre a excitação no intestino delgado do animal. Os esporozoítos liberados penetram nas células epiteliais intestinais e dão início à reprodução assexuada, formando muitos merozoítos.

Após invasão das células pelos merozoítos, inicia-se a fase sexual e posterior formação do oocisto. Estes oocistos deixam as células epiteliais e são liberados nas fezes com uma parede dupla. Assim como para as espécies de *Eimeria*, no

ambiente ocorrerá esporulação deste oocisto se as condições necessárias de umidade, temperatura e oxigenação estiverem adequadas (PATTON, 1993).

Assim, a maturação do oocisto no ambiente pode ocorrer em menos de 24 horas ou em até três dias (PEREIRA et al., 2009). Os oocistos de *Isospora* spp. são muito resistentes no meio ambiente, podendo permanecer viáveis durante meses em locais frescos e úmidos (PEREIRA et al., 2009). Um hospedeiro de transporte ou paratêmico pode estar envolvido em seu ciclo de vida (PATTON, 1993).

Não obstante, cabe ressaltar que as infecções mais graves causadas pelo gênero *Isospora* envolvem aves muito jovens ou imunocomprometidas. Todavia, o mais comum é que as infecções causadas por esse coccídeo sejam assintomáticas (PAGE e HADDAD, 1995).

3.2.3 *Cryptosporidium* spp.

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* causam problemas gastrointestinais que resultam em anorexia, diarreia e morte em todas as espécies de ratitas (CRAIG, 1993). Aves parasitadas por este coccídeo ficam predispostas a invasões secundárias de outros patógenos aviários (SRÉTER e VARGA, 2000).

Diferente dos outros coccídeos, estes parasitas não são espécie-específicos, logo, pode haver transmissão entre diferentes espécies de animais através da via fecal-oral (XIAO et al., 2004).

Um aspecto relevante para coccídeos deste gênero está em seu potencial zoonótico. Cada vez mais tem havido um aumento significativo de surtos de criptosporidiose no homem. Esses surtos ocorrem inclusive em países industrializados decorrentes de contaminação dos alimentos ou da água (RAMIREZ et al., 2004 apud OLIVEIRA, 2009). O parasita está presente em todo mundo e há relatos de criptosporidiose humana em mais de 90 países (FAYER et al., 2000).

3.2.3.1 Aspectos Morfológicos e Espécies

Oocistos de espécies desse gênero, único da família, quando esporulados apresentam quatro esporozoítos encurvados, acompanhados por um corpo residual volumoso (BERENGUER, 2006). Os oocistos possuem formato esférico ou elíptico, com parede lisa e dupla. Diferente dos outros coccídeos, os oocistos do gênero *Cryptosporidium* não possuem esporocistos (AKIYOSHI et al., 2003).

Os esporozoítos são circundados por uma película de três camadas e contêm um complexo apical com dois ou três anéis apicais, micronemas, grânulos densos, núcleo, ribossomos e microtúbulos (O'DONOGHUE, 1995).

Três espécies de *Cryptosporidium* são reconhecidas por infectar aves: *C. meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli*. Cada uma dessas espécies pode infectar numerosas espécies aviárias, mas se diferem quanto à variedade de hospedeiros e locais de predileção (FAYER e XIAO, 2008). Outras duas espécies de *Cryptosporidium* foram nomeadas em aves (*C. anserinum* em ganso doméstico e *C. tyzzeri* em galinha), mas não são reconhecidas por não haver nestes trabalhos descrições adequadas dos oocistos ou outras informações relevantes (LINDSAY e BLAGBURN, 1990).

As espécies de *Cryptosporidium* eram inicialmente distinguidas através de sua especificidade pelo hospedeiro, a morfologia dos oocistos e o sítio de infecção (LEAV et al., 2003). Entretanto, usando somente esses critérios não é possível realizar a diferenciação entre as espécies (XIAO et al., 2004).

A criptosporidiose pode se apresentar de três formas clínicas, causando doença respiratória, entérica ou renal. *Cryptosporidium meleagridis* foi descrito, inicialmente, em intestino de perus e está frequentemente associado à forma entérica (SLAVIN, 1955; LINDSAY e BLAGBURN, 1990). Normalmente, em surtos, somente uma espécie está envolvida (LINDSAY e BLAGBURN, 1990). Bursa de Fabricius, cloaca e trato respiratório são os órgãos que podem ser atingidos por *C. baileyi* em galinhas (CURRENT et al., 1986), porém, está mais frequentemente associado com a forma respiratória; e a espécie *C. galli*, foi descrita somente em proventrículo (PAVLÁSEK, 1999).

A doença respiratória é a forma mais comum em galinhas (DHILLON et al., 1981; NAKAMURA e ABE, 1988) sendo nestas aves a doença renal de ocorrência ocasional (NAKAMURA e ABE, 1988).

Segundo alguns autores, parece haver duas manifestações diferentes da doença respiratória nas aves. Uma forma da doença envolve o trato respiratório superior, que inclui sintomas de sinusite. Nessa forma, observa-se um menor comprometimento respiratório, havendo a colonização da traquéia. A segunda forma afeta o trato respiratório inferior e os sintomas clínicos mais comuns incluem o aumento da depressão, mortalidade, letargia, anorexia, tosse, espirros, dificuldade respiratória e emagrecimento (SRÉTER e VARGA, 2000).

O diâmetro dos oocistos de *Cryptosporidium* varia de acordo com a espécie. *Cryptosporidium baileyi* possui em média diâmetro de 6,2 x 4,6 µm (CURRENT et al., 1986) e *C. meleagridis* 5,2 x 4,6 µm (SLAVIN, 1955; O'DONOGHUE, 1995; MORGAN et al., 2000) enquanto que *C. galli* mensura valores médios de 8,0 x 8,5 µm (PAVLASEK, 1999).

Recentemente, a taxonomia de *Cryptosporidium* spp. passou a ser discutida por haver diferenças nas etapas metabólicas, quando comparadas com os demais organismos Apicomplexa. As discussões se estendem pela proximidade do gênero *Cryptosporidium* com a subclasse Gregarina, que são parasitas de invertebrados. Essa proximidade é baseada em características morfológicas, biológicas e bioquímicas (CARVALHO, 2009), entre as quais pode-se citar: a similaridade no ciclo biológico que é monoxênico; os oocistos, contendo quatro esporozoitos e parede dupla; gamontes extracelulares; e a localização no trato gastrointestinal do hospedeiro (HIJJAWI et al., 2004).

3.2.3.2 Ciclo Biológico

Os estágios morfológicos da criptosporidiose e a sequência de desenvolvimento são semelhantes ao de outros coccídeos da subordem Eimeriorina (FAYER e UNGAR, 1986).

Diferentemente do que ocorre com as espécies de *Eimeria* e *Isospora*, os

oocistos de *Cryptosporidium* spp. são liberados no ambiente já esporulados, juntamente com as fezes de animais infectados (PEREIRA, 2007) ou são expelidos diretamente pelo trato respiratório (FAYER e UNGAR, 1986). A transmissão para novos hospedeiros pode ocorrer através da ingestão desses oocistos presentes em águas ou alimentos contaminados ou pelo trato respiratório através de sua inalação (PEREIRA, 2007). Muito pouco se sabe a respeito de como ocorre o ciclo de *C. baileyi* no trato respiratório das aves (FAYER e XIAO, 2008).

O oocisto ingerido sofre o desencistamento devido à ação de ácidos gástricos, tripsinas e sais biliares. Os esporozoítos liberados penetram nas microvilosidades intestinais, formando um vacúolo parasitóforo intracelular e extracitoplásmico. Neste ambiente, os esporozoítos fazem reprodução assexuada e transformam-se em trofozoítos que sofrem uma divisão múltipla, formando o meronte, no qual são gerados merozoítos do Tipo I ou do Tipo II (SMITH e ROSE, 1998; FAYER e UNGAR, 1986).

Os merozoítos do Tipo I poderão infectar outras células e repetir a reprodução assexuada e os do Tipo II darão início ao estágio sexuado após a diferenciação dos merontes em microgametócitos e macrogametócitos, resultando em oocistos de parede delgada e de parede espessa com a esporulação ocorrendo na luz intestinal. Oocistos de parede delgada são compostos por uma única membrana e podem se romper na luz intestinal e reiniciar o ciclo (auto-infecção), os de parede espessa são rodeados por multi-camadas e são excretados nas fezes com capacidade infectante para outros hospedeiros (FAYER et al., 1990).

O ciclo biológico se completa entre 12 e 14 horas e o período pré-patente (entre a ingestão de oocistos e a excreção destes nas fezes) pode variar de acordo com o hospedeiro e a espécie de *Cryptosporidium* (FAYER, 1997).

3.2.4 *Giardia* spp.

Trata-se, aqui, de protozoários flagelados encontrados em aves, répteis, mamíferos e anfíbios (SOGAYAR e GUIMARÃES, 2000).

A primeira descrição detalhada deste parasita ocorreu em 1859, porém somente no final do século XX a giardíase passou a ser reconhecida (SAVIOLI et al., 2006). Hoje, é um dos protozoários mais identificados em exames fecais no mundo e é um dos principais causadores de diarreia, com 280 milhões de casos por ano (FRANCO, 2007). Somente em 1990, houve o interesse veterinário neste parasita, concentrando-se estudos para elucidar o risco zoonótico nas produções de animais (ZAJAC, 1992). Há muitas evidências de que *Giardia duodenalis* (sinonímia de *G. lamblia* e *G. Intestinalis*) pode parasitar uma série de espécies, não sendo hospedeiro-específico (HERESI e CLEARY, 1997).

É pequeno o conhecimento sobre o potencial patogênico de *Giardia* em animais domésticos e silvestres, mas estudos recentes sugerem que a infecção por este protozoário pode afetar a produção de gado, causando muitos prejuízos (GEURDEN et al., 2004; CARVALHO, 2009). Segundo Geurden et al., (2010), *Giardia* é altamente prevalente em exploração de animais de produção. Pesquisas moleculares demonstram a possível transmissão zoonótica de *G. duodenalis* e a necessidade de se reavaliar sua taxonomia (MONIS e THOMPSON, 2003).

A contaminação com este parasita ocorre pela via fecal-oral, mediante a ingestão dos cistos presentes em água ou alimentos contaminados, contato com objetos e entre indivíduos, o que é muito comum em creches e berçários (THOMPSON, 2004). Considera-se ainda, a transmissão por meio de artrópodes, como moscas e baratas. A OMS já considera a giardíase como uma zoonose (PEREIRA et al., 2007).

Os sinais clínicos variam entre as espécies de hospedeiros e entre os indivíduos, demonstrando que a manifestação da doença depende da virulência do parasita e o estado imune do hospedeiro (GEURDEN et al., 2010). Em humanos, os sintomas são náusea, vômito, diarreia, cólicas abdominais, mal-estar, esteatorreia e perda de peso (KATZ et al., 2006). Em criações de bezerros, cabritos e cordeiros, observa-se diarreia e redução de ganho de peso. Em suínos, parece não haver importância clínica (GEURDEN et al., 2010). Os sintomas aparecem entre uma e duas semanas após a ingestão dos cistos e podem persistir por duas a quatro semanas (KATZ et al., 2006).

3.2.4.1 Aspectos Morfológicos e Espécies

Os cistos são arredondados e imóveis, com dois ou quatro núcleos, possuem corpos parabasais, axonemas e uma parede celular espessa. Apresentam de 6 a 10 µm de largura e 8 a 14 µm de comprimento (KREIER e BAKER, 1987).

A forma trofozoíta é a responsável por aderir à mucosa intestinal, causando os sintomas. Possuem cerca de 10 µm de largura por 20 µm de comprimento, são móveis, apresentam quatro pares de flagelos (anterior, posterior, ventral e caudal), dois núcleos, também possuem corpos parabasais e axonemas (SOARES et al., 2008). A face dorsal é lisa convexa enquanto que a face ventral é côncava e apresenta uma estrutura semelhante a uma ventosa conhecida como disco de sucção ou disco ventral (SOGAYAR e GUIMARÃES, 2000).

Com base somente na especificidade de hospedeiros, mais de 50 espécies diferentes de *Giardia* foram identificadas desde sua primeira descrição. Mais tarde, a identificação passou a ser através das características morfológicas do protozoário, tais como sua forma e medidas (FILICE, 1952). Desta forma, são consideradas seis espécies de *Giardia*, a saber: *G. muris* em roedores; *G. agilis* em anfíbios, *G. psittaci* e *G. ardea* em aves; *G. microti* em coiole e *G. duodenalis* em mamíferos (SMITH et al., 2007).

Estudos moleculares têm demonstrado que *G. duodenalis* é uma espécie complexa que compreende a pelo menos sete genótipos hospedeiros-específicos (*assemblages*) identificados por letras de A a G (MONIS e THOMPSON, 2003). Em pacientes humanos, os grupos A e B são os mais prevalentes e também estão sendo descritos em animais de produção (THOMPSON e MONIS, 2004).

Muitas dos relatos de trofozoítos e cistos de *Giardia* spp. em avestruzes e emas, podem ser equivocadas pois muitos autores identificaram protozoários flagelados como sendo *Giardia* spp. (PONCE-GORDO et al., 2002). Segundo Huchzermeyer, (1999), *Giardia* spp. ocorre raramente em ratitas, parecendo não ser patogênicas para estas aves.

3.2.4.2 Ciclo Biológico

Giardia spp. possui um ciclo de vida simples que consiste em duas fases, uma representada pelo cisto e outra pelo trofozoíto, sendo a primeira a forma de resistência no ambiente e a segunda a forma que invade o epitélio intestinal do hospedeiro, causando a doença (MELONI et al., 1989). Ambas as formas podem ser encontradas nas fezes (CDC, 2013).

Após ingestão dos cistos por alimentos, água ou objetos contaminados, os trofozoítos sofrem excitação e são liberados na porção superior do intestino delgado, no qual através de divisão binária, se multiplicam permanecendo livres no lúmen ou aderidos na mucosa por discos adesivos localizados em sua parte ventral. O encistamento ocorre quando o parasita está em direção ao cólon. A forma cística é a mais comumente encontrada nas fezes não diarréicas (CDC, 2013).

Os cistos eliminados nas fezes são imediatamente infecciosos (THOMPSON et al., 1993). O período pré-patente varia de 3 a 10 dias (XIAO e HERD, 1994; GEURDEN et al, 2006).

3.2.5 *Entamoeba* sp.

O gênero *Entamoeba* inclui várias espécies de amebas que parasitam peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e alguns invertebrados (SILVA e NEVES, 1997), estando a maioria delas localizadas no intestino. Porém, algumas poucas espécies já foram descritas na cavidade bucal de mamíferos, e, ocasionalmente, no trato genito-urinário e estômago. A grande maioria é considerada comensal, sendo *E. histolytica* a espécie mais estudada (PONCE-GORDO e MARTÍNEZ-DÍAZ, 2010).

A amebíase é a manifestação da doença causada pelo protozoário *Entamoeba* sp. e tem como foco primário o intestino. As manifestações clínicas da amebíase se dividem em intestinal e extra-intestinal e dependem de fatores ligados ao hospedeiro e ao parasita (COURA, 2008), levando o paciente a apresentar sintomas de disenteria e colite, podendo ainda atingir outros órgãos e tecidos

através da corrente sanguínea, gerando processos inflamatórios e necrose (REY, 2001).

3.2.5.1 Aspectos Morfológicos e Espécies

A família Entamoebidae possui três gêneros que podem ser caracterizados de acordo com a morfologia do núcleo. Os gêneros compreendem a *Entamoeba*, *Endolimax* e *Iodamoeba* (BERENQUER, 2006). Baseando-se no número de núcleos presentes no cisto maduro, as espécies podem ser divididas ainda em cinco grupos de acordo com Levine (1985). Destes, somente três grupos são de espécies formadoras de cistos e estes são conhecidos como grupo *E. coli*-like com oito núcleos; *E. histolytica*-like com quatro núcleos e *E. bovis*-like contendo apenas um núcleo.

No homem, são encontradas seis espécies de *Entamoeba*: *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. moshkovskii*, e *E. polecki* (SILVA e NEVES, 1997). As duas primeiras espécies de amebas são distintas, mas morfologicamente idênticas; em 1997, a OMS reconheceu que a espécie *E. dispar* é a responsável pela maioria das infecções assintomáticas (WHO, 1997). Apenas duas espécies de *Entamoeba* são descritas em aves, sendo a espécie *E. gallinarum* com cistos de oito núcleos encontrada em galinhas, perus, codornas, patos e gansos; e a espécie *E. anatis* com quatro núcleos em patos (SILVANOSE *et al.*, 1998). Existem ainda duas espécies de *Entamoeba* sp. não identificadas: *E. coli*-like em emas (PONCE GORDO *et al.*, 2002) e *E. bovis*-like em avestruz e ema (MARTINEZ *et al.*, 2000; PONCE GORDO *et al.*, 2002).

Em avestruzes, são encontradas duas espécies de *Entamoeba*, segundo Ponce-Gordo *et al.* (2004), *E. polecki* e *E. struthionis*, sendo *E. struthionis* uma espécie, provavelmente, não patogênica, localizada no intestino grosso, com cistos de apenas um núcleo. Segundo este mesmo autor, essa possível nova espécie foi encontrada em 85% dos avestruzes analisados em seu experimento.

O critério comumente utilizado para classificação das espécies é a presença do cisto maduro, nesta são observados o tamanho do cisto, o número de núcleos e a

morfologia destes núcleos. Em conjunto com a morfologia, considera-se também o hospedeiro e a possível relação com as patologias causadas. Trofozoítos não são usados para identificação de espécies, visto que não possuem forma definida e estruturas internas, exceto núcleo e alguns vacúolos (PONCE-GORDO e MARTÍNEZ-DÍAZ, 2010).

Os cistos de *Entamoeba* sp. são esféricos e medem de 8 a 20 µm de diâmetro, envoltos por uma parede rígida formada por quitina e glicoproteínas. Conforme já citado, podem apresentar de um a quatro núcleos e possuem vacúolo de glicogênio e corpos cromatóides em forma de bastonetes. O núcleo é esférico, contendo ao centro, um cariossoma pequeno (NEAL, 1966; SILVA e GOMES, 2005; REY, 2001).

Os trofozoítos não possuem forma definida e se movimentam através de pseudópodos, possuem apenas um núcleo medindo de 4 a 7 µm e com tamanho que varia de 10 a 40 µm. O citoplasma é diferenciado em ectoplasma hialino e endoplasma granuloso, contendo vesículas e vacúolos de vários tamanhos, responsáveis pela produção e armazenamento de enzimas capazes de fagocitar e destruir os tecidos.

A amebíase é a segunda principal causa de morte por infecção causada por protozoário em todo o mundo (WHO, 1997; CORDEIRO e MACEDO, 2007). No Brasil, a amebíase constitui um problema de saúde pública e o número de indivíduos com sintomas dessa doença varia por região. De acordo com Silva e Gomes (2005), a ocorrência de casos no sul e no sudeste varia de 2,5% a 11%.

3.2.5.2 Ciclo Biológico

O ciclo de vida de *Entamoeba* sp. é monoxênico e ocorre em quatro estágios evolutivos: trofozoítos, metacistos, pré-cistos e cistos. A forma de cistos e trofozoítos são as formas definidas, enquanto que as outras são intermediárias (SILVA e GOMES, 2005).

A infecção tem início ao serem ingeridos os cistos que podem estar presentes na água, alimentos ou mãos contaminadas por fezes (REY, 2002). Os cistos são

resistentes à ação dos sucos gástricos, passando pelo estômago até a porção final do intestino delgado ou início do grosso em que ocorre o desencistamento e liberação dos metacistos através de uma pequena fissura na parede cística. O lise da parede cística ocorre, provavelmente, devido à ação de sais inorgânicos, baixa tensão de oxigênio e condições osmóticas favoráveis ao processo (RAVDIN, 1988).

O metacisto passa por diversas divisões nucleares e citoplasmáticas, originando, ao final, oito amebas, contendo apenas um núcleo, chamadas trofozoítos metacísticos. Estes permanecem no intestino grosso aderidos à camada de muco do epitélio intestinal, se alimentando de bactérias e outros nutrientes do meio (ESPINOZZA-CANTELLANO e PALOMO, 2000; QUE e REED, 2000; EICHINGER, 2001; HAQUE et al., 2003).

Ao se desprenderem da mucosa, os trofozoítos caem no lúmen intestinal, se diferenciando em pré-cistos. No cólon do intestino grosso, ocorre o encistamento; o ciclo de vida se completa após a eliminação deste com as fezes no meio ambiente. A forma cística é a forma de resistência deste parasita, podendo permanecer infectantes por semanas a meses, dependendo das condições ambientais (RAVDIN, 1988). O período de incubação é variável, podendo ocorrer em sete dias ou quatro meses (REY, 2002; SILVA et al., 2005).

Segundo Martinez-Palomo (1988), os trofozoítos são destruídos pelas enzimas e pelo pH ácido do estômago e, portanto, não têm importância na transmissão da amebíase. Esses podem ainda ser eliminados nas fezes, mas são rapidamente destruídos no meio externo (CORDEIRO e MACEDO, 2007).

3.3 NEMATOIDES

Originalmente, os nematoides se apresentavam como formas de vida livre e sua evolução possibilitou parasitar anfíbios, répteis, aves e mamíferos, inclusive o homem, em todos os continentes (DURETTE-DESSET et al., 1994). Animais portadores de helmintos podem ser assintomáticos, bem como apresentar sinais característicos de infecção parasitária tais como diarreia, perda de peso, anorexia, baixa conversão alimentar, anemia e morte (PONCE GORDO et al., 2002;

BONADIMAN et al., 2006). São importantes causadores de doenças em ratitas e algumas espécies podem ser responsáveis por até 50% de mortalidade entre filhotes de ratitas (BONADIMAN et al., 2006).

Ratitas podem ser afetadas por diversos microorganismos como bactérias, fungos e parasitas, dentre os quais já foram relatados helmintos de diferentes gêneros e espécies como *Baylisascaris* spp., *Libyostrongylus douglassii*, *Ascaridia orthocerca*, *Paraonchocera struthionus*, *Struthiofilaria megaloccephala*, *Deletrocephalus dimidiatus*, *D. casarpinto*, *Dicheilonema rhaeae*, *Paradeletrocephalus minor* e *Chandlerella quisicali* (CRAIG e DIAMOND, 1996), além de *Capillaria* sp, Cestóide *Houttuynia struthionis* e o Trematóide *Philophthalmum gralli* (PONCE GORDO et al., 2002). Entres estes já foram citados *Baylisascaris* spp. (CRAIG, 1993; KAZACOS et al., 1982), *Libyostrongylus* spp. e *Capillaria* spp. em emus (JANSSON e CHRISTENSSON, 2000), porém, muitos desses foram identificados somente pela observação dos ovos.

3.3.1 Aspectos Morfológicos e Espécies

O gênero *Libyostrongylus* é composto por três espécies: *L. douglassii*, *L. dentatus* e *L. magnus*. Contudo, o *L. douglassii* é a espécie considerada mais patogênica (HOBERG et al., 1995). O gênero *Coddiostomum* é composto por uma única espécie, *C. struthionis*, que é encontrada no ceco de avestruzes (LICHTENFELS, 1980).

Dois parasitas nematoides, gênero *Libyostrongylus* e *Coddiostomum*, são considerados específicos de avestruzes, enquanto que para emus temos os nematoides *Deletrocephalus* e *Paradeletrocephalus*. O gênero *Libyostrongylus* é responsável por significativas perdas de filhotes de avestruzes devido à anemia e inflamação causada em proventrículo e moela de animais parasitados (HOBERG et al., 1995).

A distinção entre os nematoides *Libyostrongylus* e *Coddiostomum* não pode ser feita somente através da visualização dos ovos, pois estes possuem morfologia semelhante. Para isto, é necessária a observação da fase infectante desses

parasitas após aplicação de técnicas apropriadas. *Codiostomum* são nematoides exclusivos de avestruzes (DINGLE e SHANAWANY, 1999).

3.3.2 Ciclo Biológico

A disseminação do nematoide *Libyostrongylus* em ratitas é favorecido por ser um ciclo de vida direto (CRAIG e DIAMOND, 1996), sendo o período pré-patente de aproximadamente 36 dias (THEILER e ROBERTSON, 1915). Após a eliminação dos ovos nas fezes, esses se desenvolvem em larvas que chegam à fase infectante ou larvas de terceiro estágio (L3) em 60-120 horas se estiverem sob condições ótimas de temperatura (MOREIRA et al, 2007) que varia entre 7 e 37°C (MASON e THOMPSON, 2007). As larvas infectantes são ingeridas pelas aves e no pró ventrículo se desenvolvem em L4 (McKENNA, 2005). As larvas são hematófagas e podem causar anemia e até morte (MALAN et al, 1988; HUCHZERMEYER, 1998). Outro problema que pode ocorrer é a compactação secundária do pró ventrículo e moela, além de infecções bacterianas ou micóticas (MALAN et al, 1988; HUCHZERMEYER, 1998; JANSSON e CHRISTENSSON, 2000).

O ciclo de *Codiostomum* no ceco é desconhecido, mas provavelmente é simples e direto, assim como para o gênero *Libyostrongylus* (LICHTENFELS, 1980). Os ovos *Libyostrongylus* e *Codiostomum* que contêm embriões formados conseguem resistir à desidratação durante três anos e a larva infectante resiste por tempo variável, no mínimo nove meses em condições ambientais secas (URQUHART et al, 1987).

3.4 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

O diagnóstico de parasitas causadores da coccidiose através da dimensão e morfologia dos oocistos exige treinamento além de ser uma técnica demorada (LONG et al., 1976). Espécies de *Eimeria* podem ser diferenciadas com base na

morfologia, especificidade de hospedeiro, localização e características macroscópicas das lesões (LONG et al., 1976; KAWAZOE, 2000).

Desse modo, a discriminação das espécies através da visualização de seus oocistos é restrita às pequenas diferenças e por isso, se torna limitada. Devido a isso, a abordagem molecular tem sido utilizada para identificar as espécies com maior precisão. A técnica de PCR multiplex pode ser utilizada como uma ferramenta para identificar, simultaneamente, as sete espécies conhecidas por infectar aves (FERNANDEZ *et al.*, 2003).

Outra forma de diagnóstico é através da presença de anticorpos anti-coccidianos específicos que podem ser detectados por vários métodos sorológicos. Especialmente ELISA, cujos níveis aumentam significativamente após a infecção com várias espécies de *Eimeria* (FABER *et al.*, 2002).

O diagnóstico laboratorial da infecção por *Isospora* sp. é feito, rotineiramente, pela observação e identificação microscópica dos oocistos nas fezes. Aspirados duodenais e biliares, além de biopsia intestinal também podem conter os oocistos. Essas técnicas rotineiras podem ser empregadas uma vez que os oocistos são visíveis ao microscópio óptico com ou sem a utilização de corante (De CARLI e MOURA, 2001).

Tendo em vista a eliminação intermitente de *Isospora* sp. e ainda quantidades muito pequenas de oocistos nas fezes, pode-se associar técnicas de coloração juntamente com métodos de concentração. Esses métodos correspondem mais comumente a centrífugo-flutuação em solução de sacarose, centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, centrífugo-sedimentação em sistema formalina-éter e coloração derivada de Ziehl-Neelsen (De CARLI e MOURA, 2001).

Assim como os outros coccídeos, oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem ser vistos através de esfregaços de fezes ou em flutuação fecal. Por terem tamanho reduzido e um número pequeno presente nas fezes, a coloração ácido resistente e a fluorescência podem ser uma alternativa para a visualização desses oocistos (PATTON, 1993).

O método convencional utilizado inclui a concentração dos oocistos nas fezes e coloração de esfregaços fecais. Entre as colorações, podemos citar a Safranina Azul de Metileno, Kinyon, Ziehl-Neelsen e DMSO-carbolfucsina. Para muitas dessas colorações, é necessária a experiência do técnico (FAYER *et al.*, 1999).

Inicialmente, as espécies de *Cryptosporidium* eram distinguidas através da morfologia dos oocistos (LEAV *et al.*, 2003). Entretanto, não podemos afirmar com base nessa característica, qual a espécie envolvida. Para tal afirmação, é necessário proceder exames moleculares (SANTOS *et al.*, 2005). Isto porque os oocistos podem se apresentar idênticos na morfologia e similares na morfometria, tornando-se difícil a identificação correta (XIAO *et al.*, 2004). Recentemente, técnicas moleculares estão sendo utilizadas para estabelecer uma base genética para estas distinções (SANTOS *et al.*, 2005).

A visualização dos cistos/trofozoítos nas fezes é uma forma de diagnóstico utilizada para *Giardia* spp. Além disso, pode ser feita a coloração dos esfregaços visto que são parasitas pequenos e podem ser confundidos com componentes fecais. Também são empregadas as técnicas de ELISA e PCR para identificar *Giardia* spp. em amostras clínicas. Como ocorre para a maioria dos parasitas, a caracterização genética dos isolados limita-se apenas a estudos epidemiológicos e de pesquisa (CONBOY, 1997).

Neste sentido, a base do diagnóstico laboratorial para o gênero *Entamoeba* concentra-se no exame parasitológico das fezes pela demonstração microscópica de cistos/trofozoítos e testes sorológicos (VERONENSIS, 1997). As preparações fecais coradas pelo lugol são ferramentas muito utilizadas devido ao fato de serem simples, baratas e não exigirem equipamentos sofisticados (PROCTOR, 1991). Muitas técnicas estão sendo desenvolvidas na tentativa de reduzir o tempo de duração e distinguir as espécies *E. histolytica* e *E. dispar*. O emprego do imunodiagnóstico e da biologia molecular ainda não está disponível para uso regular de diagnóstico devido ao custo, mas tem auxiliado nos estudos epidemiológicos que levam ao conhecimento da prevalência da amebíase no mundo (SILVA *et al.*, 2005). A PCR utilizada para detectar as espécies de *Entamoeba* tem se mostrado 100 vezes mais sensível que ELISA (MIRELMAN *et al.*, 1997).

Técnicas imunológicas são mais custosas que a microscopia óptica e coloração (BIALEK *et al.*, 2002). O emprego de técnicas moleculares fornece maior vantagem em relação as demais técnicas por apresentar maior especificidade e sensibilidade, além de permitir diferenciar os genótipos (WIDMER *et al.*, 2002). O diagnóstico de helmintos é feito através da visualização dos ovos nas fezes por

técnicas de flutuação ou ainda no pós-morte, quando se visualiza o parasita adulto e as alterações histopatológicas de órgãos afetados por estes (FOGGIN, 1992).

3.5 PREVENÇÃO E PROFILAXIA

Instalações em que as ratitas são criadas podem ter sérios problemas parasitários, levando à redução do crescimento dos animais, aos maus resultados reprodutivos e à morte (TULLY e SHANE, 1996). Além disso, as doenças causadas por parasitas podem ser controladas por meio da associação de medidas sanitárias e de manejo, do tratamento dos animais doentes, do uso preventivo de anticoccidianos e de vacinas existentes no mercado (LIMA, 2004).

Somente o tratamento não é suficiente contra o gênero *Giardia*. É necessário que se faça a desinfecção e limpeza do ambiente, integrado ao tratamento dos animais, minimizando assim o risco de reinfecção após o tratamento (XIAO *et al.*, 1996). Isso foi demonstrado em estudo recente, no qual o tratamento do animal integrado à limpeza e desinfecção do ambiente com amônia 10% atingiu uma redução significativa no número de animais, excretando cistos, quanto no número de cistos eliminados (GEURDEN *et al.*, 2006).

As práticas sanitárias visam impedir ou diminuir a ingestão de oocistos esporulados pelos animais, mantendo-se as instalações limpas e secas. A remoção de fezes e camas deve ser feita com maior frequência para reduzir a disponibilidade de oocistos no meio ambiente. Embora os oocistos sejam resistentes à ação de vários desinfetantes, altas concentrações de hipoclorito de sódio e de amônia têm alguma ação sobre essas formas parasitárias e podem auxiliar no controle da doença. Os oocistos podem ser também destruídos pela dessecação, luz solar e calor, mas dificilmente são atingidos por esses agentes visto que ficam protegidos pela matéria orgânica (LIMA, 2004). Segundo Coura (2008), a utilização de cloro não é eficiente para desinfecção da água, pois não inviabiliza os cistos de *Eimeria*.

Assim como os coccídeos, os cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. também são conhecidos por serem resistentes a desinfetantes usados normalmente, tais como o cloro (GEURDEN *et al.*, 2010). A alta densidade

de aves gera maior contaminação do ambiente com os oocistos e isso aumenta a chance do aparecimento da doença nas criações (SHIRLEY, 1992).

A água deve ser livre de patógenos e passar por exames anuais para garantia de sua qualidade (TULLY e SHANE, 1996). Estudos indicam que a água é uma possível fonte de transmissão de amebas para o hospedeiro humano (SUKPRASERT et al., 2008). Bebedouros e comedouros atuam como fontes de infecção, pois podem ser contaminados com fezes de animais, favorecendo ao aparecimento da doença em todo rebanho e, portanto, devem ser colocados de forma a evitar essa contaminação (LIMA, 2004).

Novas aves de uma criação devem passar por métodos de análise parasitológicos e um período de quarentena antes de sua introdução. A eficácia das drogas utilizadas no tratamento de coccidiose intestinal depende da espécie de coccídeo e também da espécie de ave envolvida (GREINER et al., 1994).

Por tudo isso, um método de controle eficiente está na administração contínua de anticoccidianos adicionados à água ou à ração. Embora essa prática seja usada como rotina para prevenir a coccidiose de aves, somente, nos últimos anos, tem sido introduzida na criação de outras espécies de animais (LIMA, 2004).

Porém, é de extrema importância salientar que doses inadequadas de drogas anticoccidianas podem levar ao aparecimento de coccídeos resistentes (SHIRLEY, 1992). Alguns estudos sugerem que a resistência aos antimicrobianos em humanos se deve ao uso destes agentes químicos consumidos na alimentação ou na ração dos animais (CORPET, 1996). A FAO/OMS, através do *Codex Alimentarius*, determina os limites dos medicamentos na carne ou carcaças de animais destinados ao consumo, denominados como IDA (ingestão diária aceitável) e LMR (limite máximo de resíduos) (ALBUQUERQUE, 2005).

Agentes tróficos são compostos com a função de estimular o crescimento da mucosa e podem ser empregados nas criações. São agentes tróficos as aminas biogênicas, aminoácidos (glutamina), prebióticos, probióticos, mananoligossacarídeos e frutologossacarídeos (LUQUETTI et al., 2006).

Tem-se observado pouco avanço no desenvolvimento de novos antiparasitários nos últimos 25 anos (ANDRADE et al., 2011). Até então, não se dispunha de medicação para tratamento concomitante de helmintos e protozoários,

além de haver surgimento de cepas resistentes as drogas já existentes (UPCROFT e UPCROFT, 2001).

Vacinas vivas são pouco utilizadas, principalmente, em frangos de corte (ALLEN e FETTERER, 2002), no entanto, essas estão sendo utilizadas em substituição ao uso dos agentes anticoccidianos. No mercado, são disponíveis dois tipos de vacinas contra coccidiose aviária, a vacina viva e a atenuada. As vacinas atenuadas, consideradas de segunda geração, são mais vantajosas por serem mais seguras, havendo um crescimento contínuo no consumo deste tipo de vacina (LILLEHOJ e LILLEHOJ, 2000). O conhecimento da etiologia da coccidiose aviária em território nacional é extremamente importante para desenvolvimento de vacinas eficazes (SANTOS et al., 2003).

Embora essas vacinas sejam muito utilizadas contra coccidiose, elas podem causar lesões intestinais em frangos durante as três semanas pós-imunização (NEWMAN, 1999). Frangos infectados com *Eimeria* spp. são capazes de desenvolver proteção imunológica contra re-infecção por parasitas homólogos (LILLEHOJ e TROUT, 1996).

Não há tratamento para criptosporidiose até o momento. Sendo assim, métodos de controle para limitar a infecção e a prevenção são as medidas adequadas para evitar perdas por esta doença (RYAN, 2010). A vacinação contra eimeriose tem maior progresso quando comparada a vacinação contra criptosporidiose, e espera-se aplicar estas lições para desenvolver vacinas efetivas no controle da criptosporidiose (LILLEHOJ et al., 2000).

O uso de fezes como fertilizante é também uma importante fonte de infecção. Cistos de *Entamoeba* sp. no meio externo podem sobreviver de dias a meses, principalmente, sob condições de umidade (MARKELL et al., 1999). Cordón et al. (2009), após o diagnóstico positivo de parasitismo de pássaros residentes em um zoológico na Espanha, iniciou medidas preventivas, com base na limpeza e desinfecção da área, dos bebedouros e alimentadores. Contudo, em ratitas se torna difícil a utilização destes recursos, visto que são animais com hábitos de ciscagem (CORDÓN et al., 2009).

A rotação de pastagens é a forma mais útil no controle das helmintoses (TULLY e SHANE, 1996). Medidas de biossegurança eficazes incluem remoção dos hospedeiros definitivos em torno das criações e não manter outros animais no

mesmo local que as ratitas, além do armazenamento adequado dos alimentos oferecidos aos animais. Além disto, a água oferecida para os animais deve ser de boa qualidade visto a transmissão de trematóides ocorrer através da ingestão do hospedeiro intermediário, como os crustáceos de água doce (FOGGIN, 1992).

Novos métodos de controle em criações de ratitas não estão sendo bem documentados e, no final, acaba-se adaptando as medidas de biossegurança utilizadas em criações de aves domésticas nas criações das ratitas. Há necessidade clara de realizar estudos sobre as doenças de todas as etiologias que afetam a esses animais para obter informações concretas de controle, profilaxia e tratamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA FECAL

Para este trabalho foram coletadas, bimestralmente, amostras fecais de emus, utilizando-se sacos plásticos, tendo-se o cuidado de somente coletar as fezes frescas do solo e que não tenha tido contato com este. Essas foram identificadas e acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e, posteriormente, processadas no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP), pertencente ao Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HV-UENF).

4.2 ANIMAIS UTILIZADOS

Os emus que tiveram suas fezes analisadas, nesta pesquisa, pertencem ao Criatório Científico de Ratitas da UENF e correspondem a 13 animais adultos de ambos os sexos.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram processadas no mesmo dia em que foram coletadas. O material coletado foi homogeneizado ainda dentro dos sacos plásticos para, então, proceder com cada exame.

4.3.1 Identificação morfológica e morfométrica de trofozoítos, cistos, oocistos e ovos nas fezes

Para a identificação morfológica de trofozoítos e cistos de protozoários nas fezes dos emus foram utilizadas as técnicas de exame direto a fresco e exame direto após centrifugação. Além disso, ocorreu também a técnica de centrifugo-flutuação em solução de sacarose (Técnica de Sheather Modificada).

A morfometria dos oocistos presentes nas lâminas foi realizada conforme citado por Duszynski e Wilber (1997). Para se obter o valor da espessura da parede dos oocistos de *Isospora* sp., foram medidos quatro pontos em torno do coccídeo e, em seguida, feita uma média simples desses valores.

A observação de todas as formas parasitárias foi feita em microscópio óptico binocular “Zeiss”, modelo “Axiostar Plus” em objetivas de 40x e 100x (imersão), conforme conveniência e para a captura de imagens, utilizou-se câmera digital modelo “Powershot” A 640 acoplada ao microscópio.

4.3.1.1 Exame direto a fresco

Para os esfregaços, as fezes coletadas foram homogeneizadas logo após a chegada dessas ao laboratório e para isto, utilizou-se bastão de madeira descartável e solução salina a 0,85%. Após confecção dos esfregaços em lâmina de vidro de 25,4 x 76,2 x 1 mm, pingou-se duas gotas de Lugol a 2% e em seguida os

esfregaços foram cobertos com lamínulas 20 x 20 mm e observados ao microscópio em objetiva de 40x.

4.3.1.2 Exame direto após centrifugação

De cada amostra fecal individualmente coletada e homogeneizada foram retirados três gramas, utilizando bastão de madeira descartável. Essas foram acondicionadas em um becker de 250 ml onde acrescentou-se água destilada até completar o volume de 50 ml. Após a homogeneização, a solução resultante foi passada em tamis com dupla camada de gaze, sendo o material transferido para um tubo plástico de centrífuga de 50 ml com fundo cônico, completando-se este com água destilada até atingir 50 ml de volume. Em seguida, esse material foi centrifugado (centrifuga Novatecnica NT-815) a 3000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Com o sedimento resultante da centrifugação foi preparado o esfregaço em lâmina de vidro e adicionado uma lamínula 20 x 20 mm após adição de duas gotas de Lugol a 2% e observados ao microscópio óptico (objetiva de 40x e 100x).

4.3.1.3 Centrifugo-Flutuação em Solução de Sacarose

Nesta etapa, a Técnica de Sheather Modificada foi utilizada conforme a seguir:

Individualmente foram separadas três gramas de fezes após homogeneização das mesmas utilizando um bastão de madeira descartável. Essas foram acondicionadas em becker de 250 ml onde foi acrescentado água destilada até completar o volume de 50 ml.

Após a homogeneização, a solução resultante foi passada em tamis com dupla camada de gaze sendo o material transferido para um tubo plástico de centrífuga de 50 ml com fundo cônico e este completado com água destilada até

atingir 50 ml de volume.

Em seguida, esse material foi centrifugado (centrifuga Novatecnica NT-815) a 3000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. O sedimento aderido ao fundo do tubo foi ressuspenso em cinco mililitros de solução saturada de sacarose com densidade de 1,33 (1,1g/ml), homogeneizado e transferido para um tubo plástico para centrifuga de 15 ml com fundo cônico e adicionada a mesma solução saturada de sacarose até atingir 14 ml. O tubo foi centrifugado novamente em mesma centrifuga por cinco minutos a 3000 rpm. Este foi colocado em estante plástica, em posição vertical e com o auxílio de uma pipeta de 1000 µl foi adicionada ao tubo solução saturada de sacarose até obter a formação de um menisco, sobre o qual foi colocada uma lamínula de 18 x 18 mm por 10 minutos.

Após decorrido este período, a lamínula foi retirada e rapidamente colocada sobre uma lâmina de vidro e observada ao microscópio óptico (objetiva de 40x e 100x).

4.3.1.4 Esporulação

A esporulação foi feita somente com as amostras sabidamente positivas para coccídeos e para isto, utilizou-se todo o restante do material fecal após a realização das técnicas de diagnóstico anteriormente citadas.

O material fecal individual restante foi diluído em dicromato de potássio a 2,5% em quantidade suficiente para que pudesse ser filtrado em camada dupla de gaze. Em seguida, o material filtrado foi colocado em frascos limpos e identificados. A aceleração da esporulação foi feita com aeração das amostras, auxiliada por bombas de aquário comum, por 25 dias.

Para visualização dos oocistos e determinação do período de esporulação, o material foi analisado nos dias cinco, 10, 15, 20 e 25 após início da aeração do material. Após período estabelecido de esporulação, o material foi transferido para tubo plástico de centrífuga com fundo cônico de 50 ml e centrifugado por 10 min a 3000 rpm (centrifuga Novatecnica NT-815). Foi descartado o sobrenadante e o sedimento ressuspenso em água destilada até atingir 50 ml e novamente

centrifugado (10 min/3000 rpm), sendo repetida por três vezes esta etapa. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em solução saturada de sacarose e transferido para tubo de 15 ml, completando com solução saturada de sacarose até o volume de 14 ml. Nova centrifugação foi realizada por 10 min a 3000 rpm e após, acrescentou-se solução saturada de sacarose até obter a formação de um menisco, sobre o qual foi colocada uma lamínula de 18 x 18 mm por 10 minutos. A lamínula foi retirada e rapidamente colocada sobre lâmina de vidro e observada ao microscópio óptico (objetivas de 40 x e 100 x).

O período de esporulação foi considerado quando 80% dos oocistos estavam esporulados.

4.3.2 Biologia Molecular

4.3.2.1 Concentração dos Oocistos

Os cistos e oocistos foram concentrados de acordo com Fiuza *et al.* (2008). Para tanto, foram utilizadas 15 gramas de cada amostra de fezes, pesadas diretamente em tubo plástico para centrífuga com fundo cônico estéril e completado até 50 ml com água destilada. O material foi homogeneizado e o tubo deixado por 20 minutos para decantar e após, o material foi filtrado em tamis com malha de aço de 45 µm de porosidade. Em seguida, o volume do tubo foi completado com água destilada até atingir 50 ml e, então, centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm. Descartou-se o sobrenadante e completou-se com água destilada até alcançar 25 ml e depois até 50 ml com solução saturada de sacarose com densidade de 1,33 (1,1g/ml). A homogeneização foi feita até que todo o sedimento fosse dissolvido do fundo do tubo e então, centrifugou-se o material a 4°C e 1000 rpm por 20 minutos. Foram aspirados 4 ml da superfície do tubo e transferidos para novo tubo estéril de fundo cônico de 15 ml contendo previamente 11 ml de água destilada, atingindo assim, um volume total de 15 ml. Este foi centrifugado novamente por 10 minutos a 2500 rpm, após descartar o sobrenadante, 500 µl de água destilada foi aspirada com

pipeta de 1000 µl e colocada no tubo, resuspendendo o sedimento formado ao fundo. Toda a solução resultante foi retirada e colocada em microtubo plástico para centrifuga de 2,5 ml com tampa de pressão devidamente identificado e em seguida armazenados em temperatura de congelamento (- 20°C) para posterior extração de DNA.

4.3.2.2 Extração do DNA

Para extração utilizou-se o Kit “DNeasyTissue Kit” (Qiagen®), de acordo com o protocolo do fabricante e com modificações feitas por Santín et al. (2004), conforme descrito a seguir:

Misturou-se 50-80µl de cada amostra a 180µl de Tampão ATL e homogeneizou-se em vórtex (Biomixer QL-901, USA). Após esta etapa, foram adicionados 20µl de proteinase K (20mg/ml) e novamente a mistura foi homogeneizada. Os tubos foram incubados *overnight* a 55°C, e após esse período, as amostras foram homogeneizadas em vórtex. Foi adicionado 200µl de Tampão AL e homogeneizou-se, e então, foi incubado a 70° C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µl de etanol 96% e transferiu-se toda a mistura para uma coluna “DNeasy Mini Spin”, colocada em tubo de 2 ml. Cada coluna foi centrifugada (micro centrífuga “EppendorfMiniSpin”) a 8000 rpm por um minuto, descartando-se o tubo de 2 ml e seu conteúdo após a centrifugação. A coluna “DNeasy Mini Spin” foi colocada em um novo tubo de 2 ml e adicionou-se 500 µl de Tampão AW1, e centrifugou-se por um minuto a 8000 rpm. Descartou-se o tubo de 2 ml e a coluna DNeasy foi colocada em novo tubo de 2 ml, onde foi acrescentado 500µl de Tampão AW2 e, em seguida, centrifugou-se por três minutos a 14000 rpm, descartando-se o tubo de 2 ml.

A coluna DNeasy foi colocada em tubo de 1,5 ml onde acrescentou-se 100 µl de Tampão AE diretamente na membrana da coluna DNeasy aumentando-se assim, a concentração de DNA. Centrifugou-se por um minuto a 8000 rpm e, então, as amostras foram armazenadas em temperatura de refrigeração (4-8°C) para realização da PCR.

4.3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para *Entamoeba* sp. foi feita apenas uma amplificação do fragmento do gene 18S rRNA, enquanto que para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. utilizou-se a técnica de *nested* PCR, as amplificações do fragmento do gene 18S rRNA foram feitas em duas etapas. As sequências de iniciadores utilizadas nas reações de PCR estão especificadas a seguir:

Quadro 1. Sequências de iniciadores utilizados nas reações de PCR de acordo com os gêneros

GÊNERO	SEQUÊNCIAS DE INICIADORES	REFERÊNCIA
<i>Entamoeba</i>	Entam1: 5'GTT GAT GCC CCT AGT ATT ATA TG 3' Entam2: 5'CAC TAT TGG AGC TGG AAT TAC 3'	VERWEIJ et al., 2001
<i>Giardia</i>	<p>PRIMEIRA REAÇÃO</p> <p>Gia F: 5'-AAGTGTGGTGCCAGACGGACTC-3' Gia R: 5'-CTGCTGCCGTCCTTGGATGT-3'</p> <p>SEGUNDA REAÇÃO</p> <p>RH-4: 5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3' RH-11: 5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3'</p>	HOPKINS et al., 1997
<i>Cryptosporidium</i>	<p>PRIMEIRA REAÇÃO</p> <p>Crypto F: 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' Crypto R: 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'</p> <p>SEGUNDA REAÇÃO</p> <p>Crypto AL 1598: 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3' Crypto AL 3032: 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'</p>	XIAO et al., 1999

Os dados referentes à amplificação e os ciclos utilizados no termociclador para *Entamoeba* sp., *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. estão representadas nos Quadros 2, 3 e 4, respectivamente.

Quadro 2. Amplificação e ciclos do termociclador utilizados na reação de PCR para *Entamoeba* sp.

AMPLIFICAÇÃO
Tampão PCR (1x)
MgCl ₂ (1,5mM)
dNTP (5 mM)
Taq (2,5 U) (Qbiogene®)
Iniciadores (0,5 µl de cada um)
Volume final de 50 µl

CICLOS DO TERMOCICLADOR
94 °C por 5 minutos
94 °C por 1 minuto (35 ciclos)
55 °C por 1 minuto (35 ciclos)
72 °C por 1 minuto (35 ciclos)
Extensão final de 72 °C por 7 minutos

Quadro 3. Amplificação e ciclos do termociclador utilizados nas reações de *nested* PCR para *Giardia* spp.

AMPLIFICAÇÃO	
PRIMÁRIA	SECUNDÁRIA
Tampão PCR (1x)	Tampão PCR (1x)
MgCl ₂ (1,5mM)	MgCl ₂ (1,5mM)
dNTP (5 mM)	dNTP (5 mM)
Taq (2 U) (Qbiogene®)	Taq (2 U) (Qbiogene®)
DMSO (2,5 µl)	DMSO (2,5 µl)
Iniciadores (0,5 µl de cada um)	Iniciadores (0,5 µl de cada um)
Volume final de 50 µl	Volume final de 50 µl
CICLOS DO TERMOCICLADOR	
96° C por 2 minutos	96° C por 2 minutos
35 ciclos de 96 °C por 45 segundos	35 ciclos de 96 °C por 45 segundos
58 °C por 30 segundos	55 °C por 30 segundos
72 °C por 45 segundos	72 °C por 45 segundos
Extensão final de 72 °C por 4 minutos	Extensão final de 72 °C por 4 minutos

Quadro 4. Amplificação e ciclos do termociclador utilizados nas reações de *nested* PCR para *Cryptosporidium* spp.

AMPLIFICAÇÃO	
PRIMÁRIA	SECUNDÁRIA
Tampão PCR (1x)	Tampão PCR (1x)
MgCl ₂ (3mM)	MgCl ₂ (1,5 mM)
dNTP (5 mM)	dNTP (5 mM)
Taq (2,5 U) (Qbiogene [®])	Taq (2,5 U) (Qbiogene [®])
Iniciadores (1 mM de cada um)	Iniciadores (1 mM de cada um)
Volume final de 50 µl	Volume final de 50 µl
CICLOS DO TERMOCICLADOR	
94 °C por 3 minutos	94 °C por 3 minutos
35 ciclos de 94 °C por 45 segundos	40 ciclos de 94 °C por 30 segundos
59 °C por 45 segundos	58 °C por 90 segundos
72 °C por 1 minuto	72 °C por 2 minutos
Extensão final de 72 °C por 7 minutos	Extensão final de 72 °C por 7 minutos

4.3.2.4 Análise dos fragmentos da PCR

Para análise dos fragmentos amplificados da PCR foi utilizada a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *Gel Red*(Biotic[®]) e imerso em tampão TAE 10x em cuba horizontal.

A visualização das bandas foi realizada sob transiluminação ultravioleta em fotodocumentadora (Kodak EDAS 290[®]) após a corrida eletroforética e os tamanhos dos fragmentos comparados com marcador molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen[®]), com controle negativo e controle sabidamente positivo utilizado no laboratório.

5 RESULTADOS

5.1 MICROSCOPIA: MORFOLOGIA E MORFOMETRIA

Das amostras fecais analisadas com concentração em solução saturada de sacarose e exame direto corado ou não pelo Lugol a 2%, foram observados cistos e trofozoítos de *Entamoeba* sp. e *Giardia* spp. (Figuras 1 e 2). Ainda pela técnica de Sheather modificada, foram identificados oocistos esporulados e não esporulados de coccídeos dos gêneros *Eimeria* e *Isospora* (Figura 3), além de ovos de cestóides (Figura 4) e ovos e larvas de nematóides (Figura 5). Dentre estes, foram identificados ovos do tipo Strongylida (Figuras 5 A e B) e Ascaridida (Figura 6). Foram também observados ovos de nematóides operculados e bioperculados (Figura 7).

Em fezes examinadas assim que coletadas, foram observados alguns protozoários não identificados (Figura 8). Alguns apresentavam formas variadas e parede dupla parecida com de oocistos não esporulados ou em esporulação (Figura 8 A, B e C). Foi possível observar ainda, protozoários de forma arredondada com parede ciliada (Figura 8D).

Oocistos foram observados com até 25 dias de incubação em temperatura ambiente e aeração forçada, mas mesmo até este período, alguns coccídeos ainda eram vistos sem esporulação, o que dificultou a caracterização morfológica dos mesmos (Figura 9).

Foram poucos os oocistos esporulados de *Eimeria* spp. visualizados e estes foram caracterizados como de formato ovóide a elipsóide, parede dupla e esporocistos arredondados, no entanto outros detalhes como o formato dos esporozoítos e ausência/presença de corpos de Stieda e substieda por exemplo, não puderam ser caracterizados morfológicamente; os oocistos observados possuíam tamanho menor que os oocistos de *Isospora* sp. (Figura 3).

Oocistos de *Isospora* sp. foram caracterizados morfológicamente como subesféricos a ovoides e esses não continham micrúpila, grânulo polar e resíduo. Os esporozoítos tinham formato alongado com aspecto vermiforme e onde pode ser

observado corpo refrátil oblongo e bem visível. Presença de resíduo foi observado somente dentro do esporocisto, sendo estes pequenos grânulos esféricos e compactos com tamanhos variáveis (Figura 10). Corpos de Stieda e substieda estavam presentes em todos os oocistos, com o primeiro em formato mamiliforme.

A parede dos oocistos de *Isospora* sp. em 34 aferições apresentaram valor médio de 1,42 μm e intervalo de (0,81-1,95) com desvio padrão calculado de 0,31. As medidas médias que caracterizam morfometricamente os oocistos de *Isospora* sp. de emu, podem ser vistas na Tabela 1.

Devido ao pequeno número de oocistos de *Eimeria* spp. observados nas fezes dos emus, foi possível apenas medir três destes oocistos, aferindo-se valores médios para o diâmetro maior (DM) de 16,47 μm e intervalo de (14,27 - 19,36) e diâmetro menor (dm) de 16,04 μm e intervalo de (14,22 - 18,80). Mesmo com um número pequeno de aferições foi possível calcular o desvio padrão de 2,61 e 2,43 para o DM e dm, respectivamente.

Foram também mensurados trofozoítos e cistos de *Entamoeba* sp. além de ovos de helmintos do tipo Strogylida, cestoda e ascaridiida (Tabela 2).

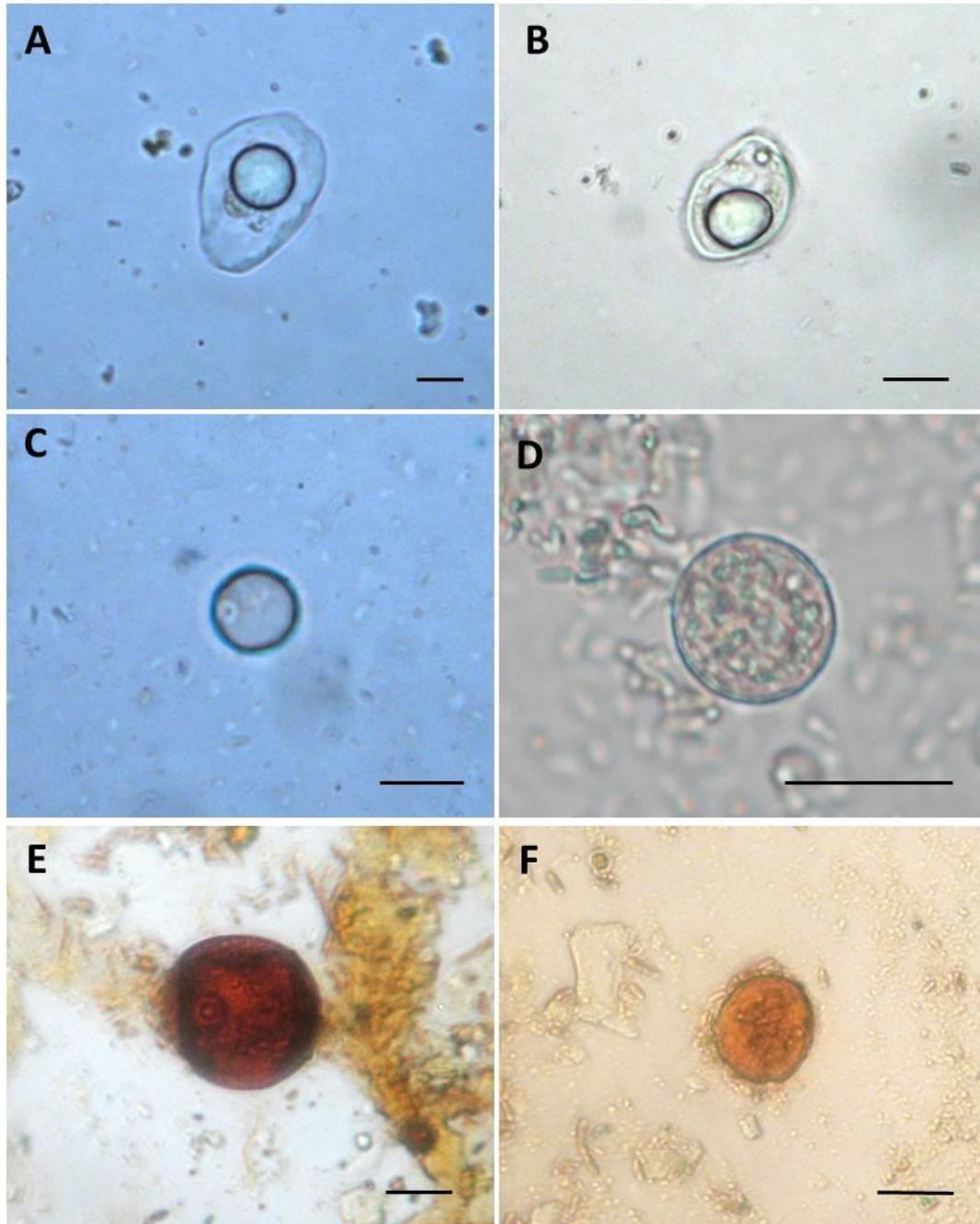


Figura 1. Foto microscopia de *Entamoebasp.* observadas em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*. Em **A** e **B**, trofozoítos característicos com projeções hialinas do ectoplasma e núcleos bem visíveis observados em solução saturada de sacarose. Em **C** e **E**, cistos com um núcleo bem visível observados em solução saturada de sacarose e em esfregaço corados pelo Lugol a 2 %, após concentração por centrifugação, respectivamente. Em **D** e **F**, cistos multinucleados observados em solução saturada de sacarose e esfregaço a fresco corado pelo Lugol a 2%, respectivamente. Barras de 20 µm.

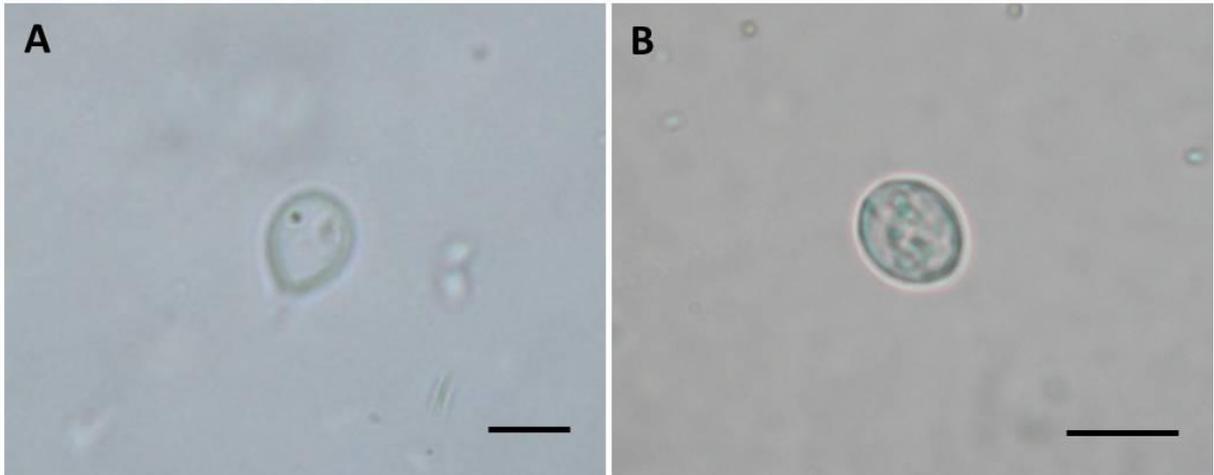


Figura 2. Foto microscopia de trofozoíto (A) e cisto (B) de *Giardiaspp.* observados em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*, em solução saturada de sacarose. Barras de 10 μm .

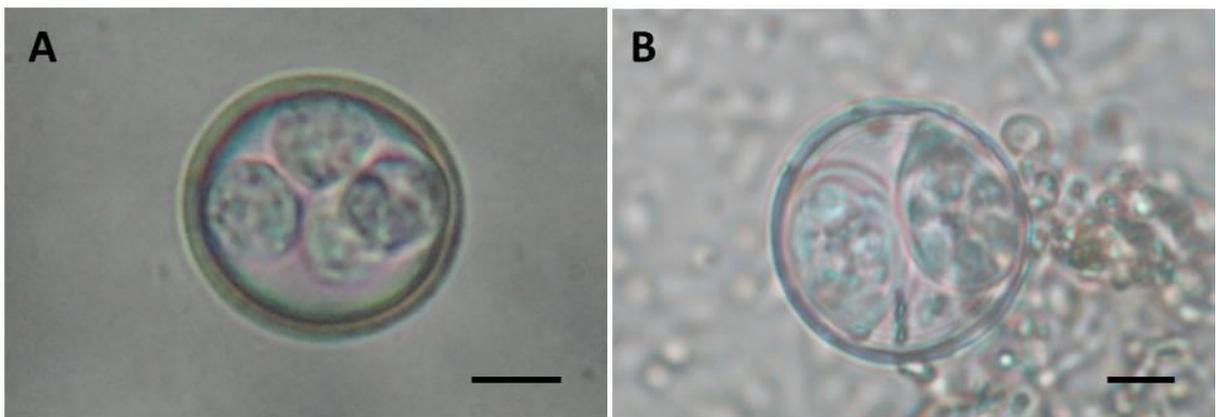


Figura 3. Foto microscopia de oocistos de coccídeos observados em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*, em solução saturada de sacarose. Em A, *Eimeriaspp.* e em B, *Isosporasp.* Barras de 5 μm .

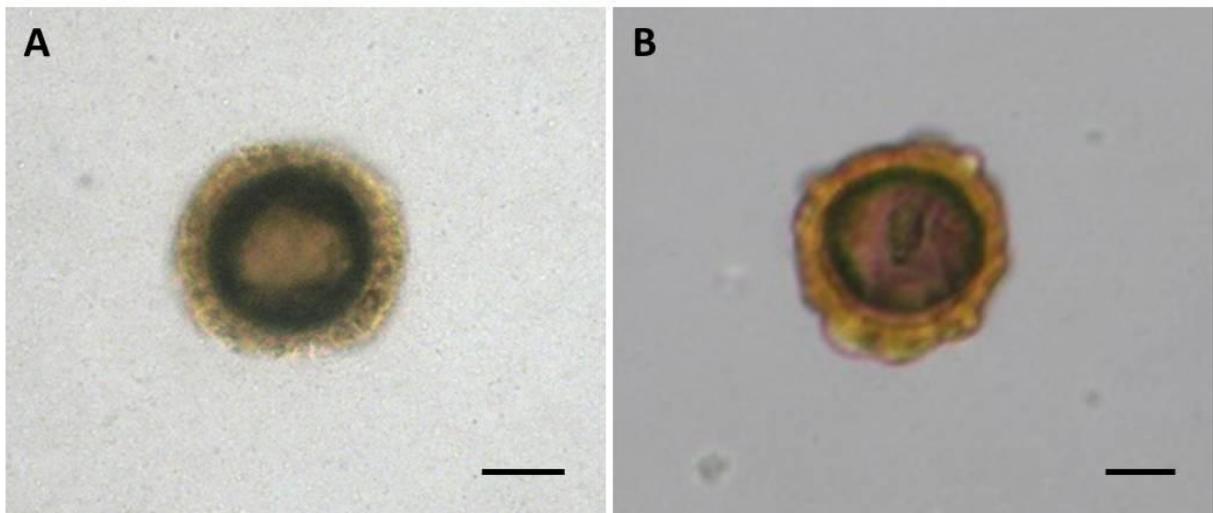


Figura 4. Foto microscopia de ovos de nematóides do tipo Cestoda presentes em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*, em solução saturada de sacarose. Observar formas diferentes de acordo com o desenvolvimento. Em **A** e **B**, barras com 20 e 10 μm , respectivamente.

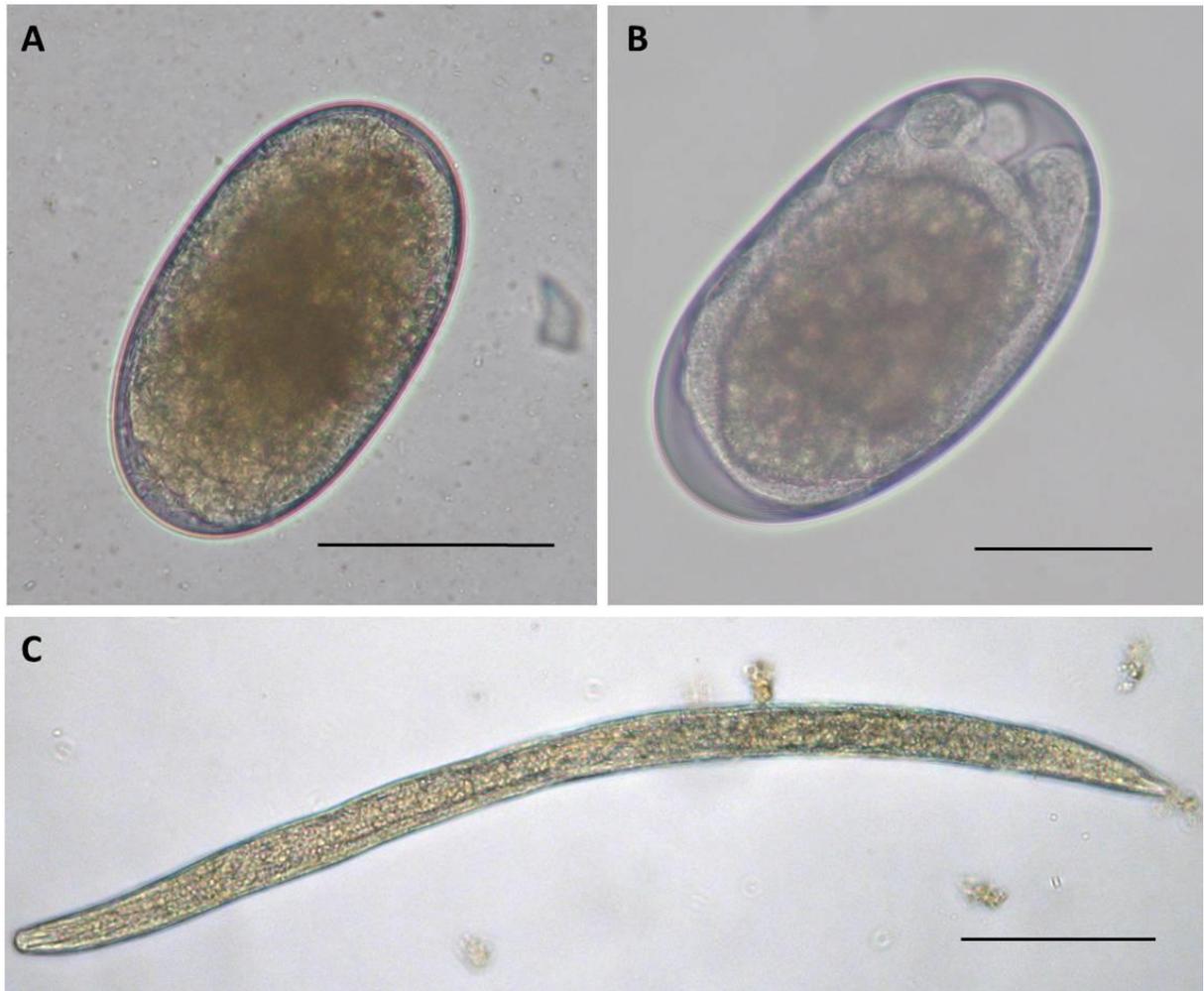


Figura 5. Foto microscopia de ovos e larva de nematóides do tipo Strongylida, presentes em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*, em solução saturada de sacarose. Barras de 50 μm .

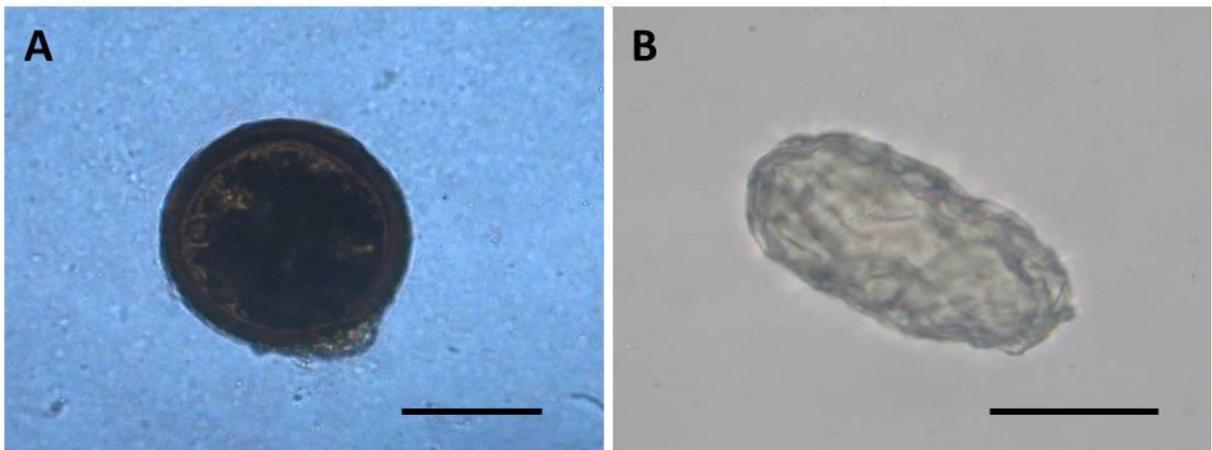


Figura 6. Foto microscopia de ovo fértil de *Baylisascaris* sp. em **A** e em **B**, ovo infértil do tipo *Ascaridia* observados em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae* em solução saturada de sacarose. Barras de 50 μ m.

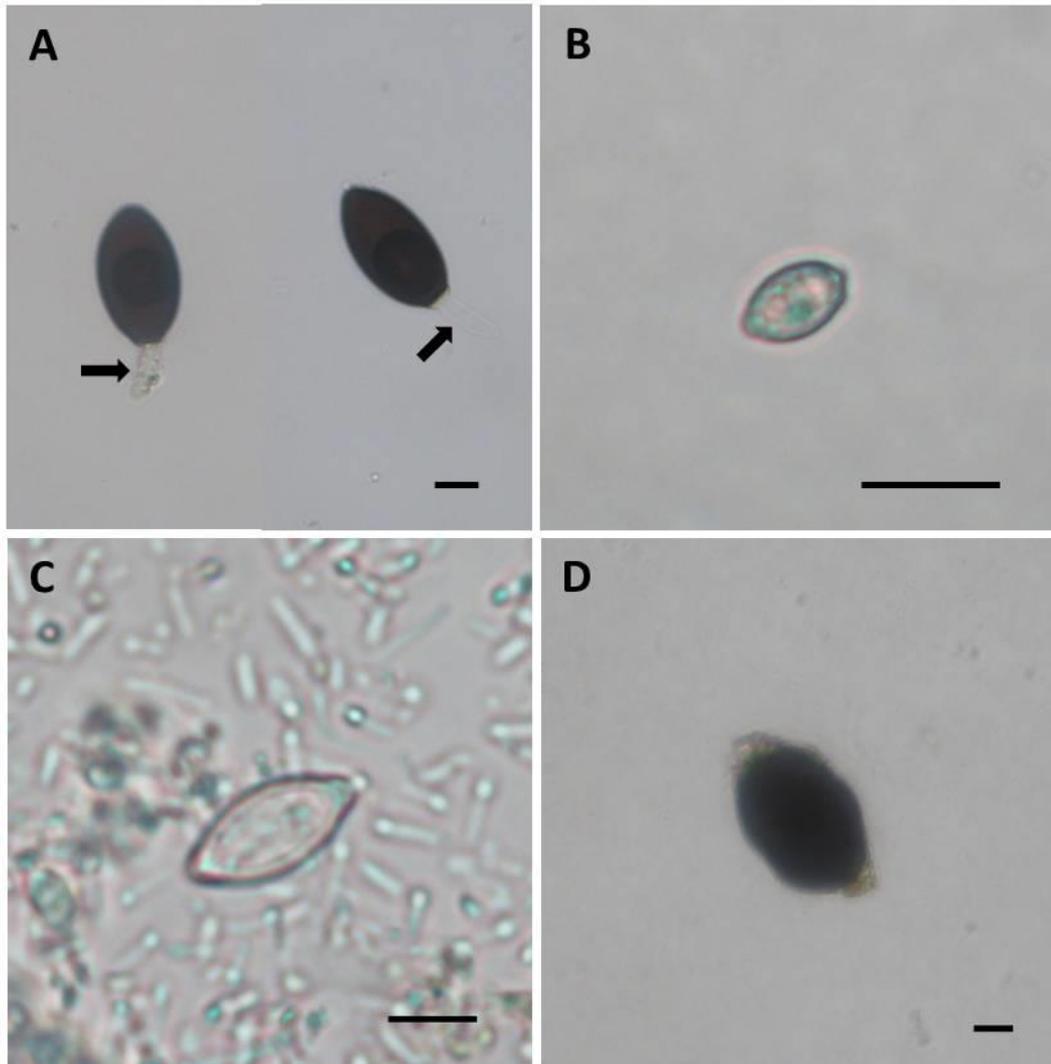


Figura 7. Foto microscopia de ovos de nematóides operculados (A e B) e bioperculados (C e D) observados em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae* em solução saturada de sacarose. Em destaque (**seta**), estrutura aderida ao opérculo de alguns ovos. Barras de 10 μm .

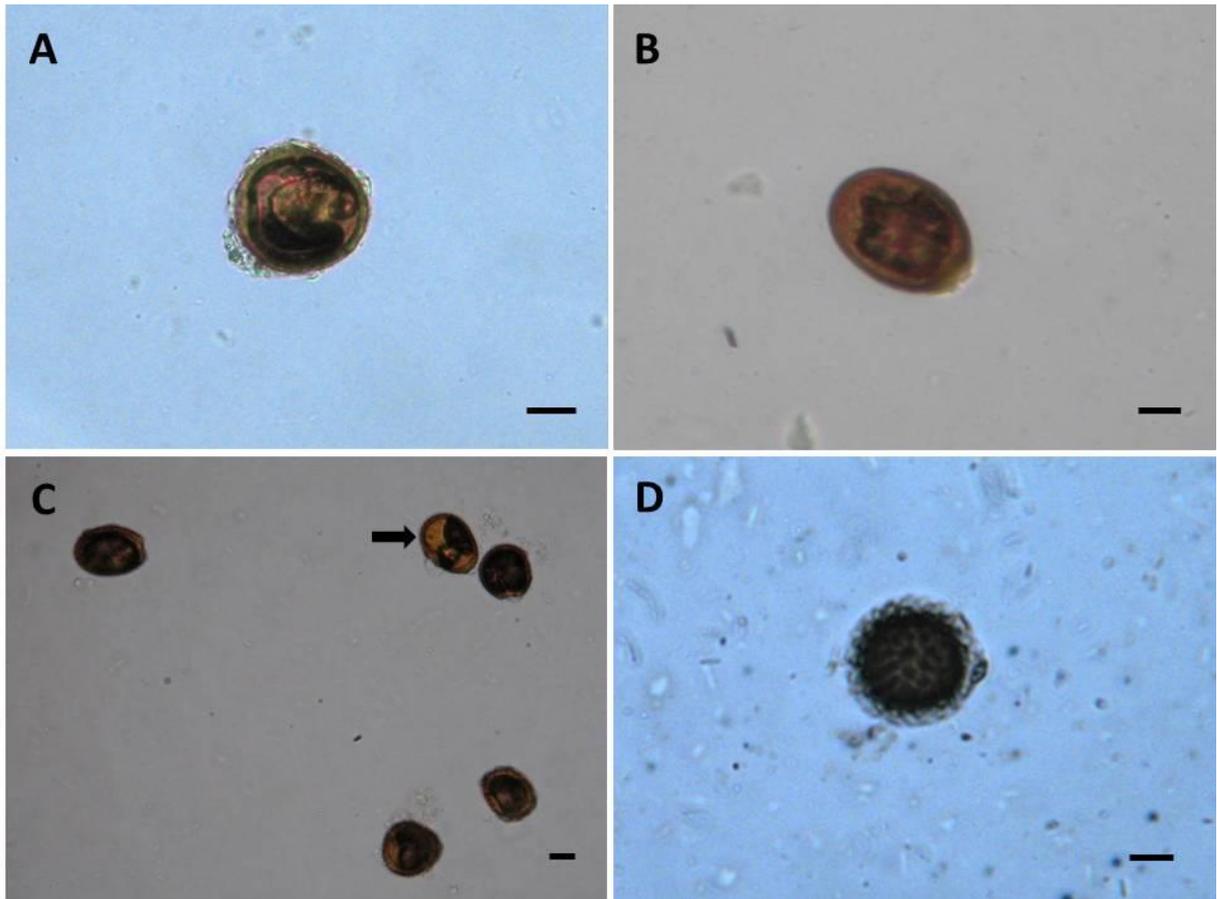


Figura 8. Protozoários não identificados em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*, observadas em solução saturada de sacarose. Em **A**, forma arredondada e parede espessa, com núcleo periférico; em **B**, forma ovalada a elipsóide parecido com um oocisto não esporulado; em **C**, observam-se três oocistos com forma indefinida e dois com formato ovalado a elipsóide, em destaque (**seta**) protozoário em esporulação; em **D**, uma forma arredondada com parede ciliada. Barras de 10 µm.

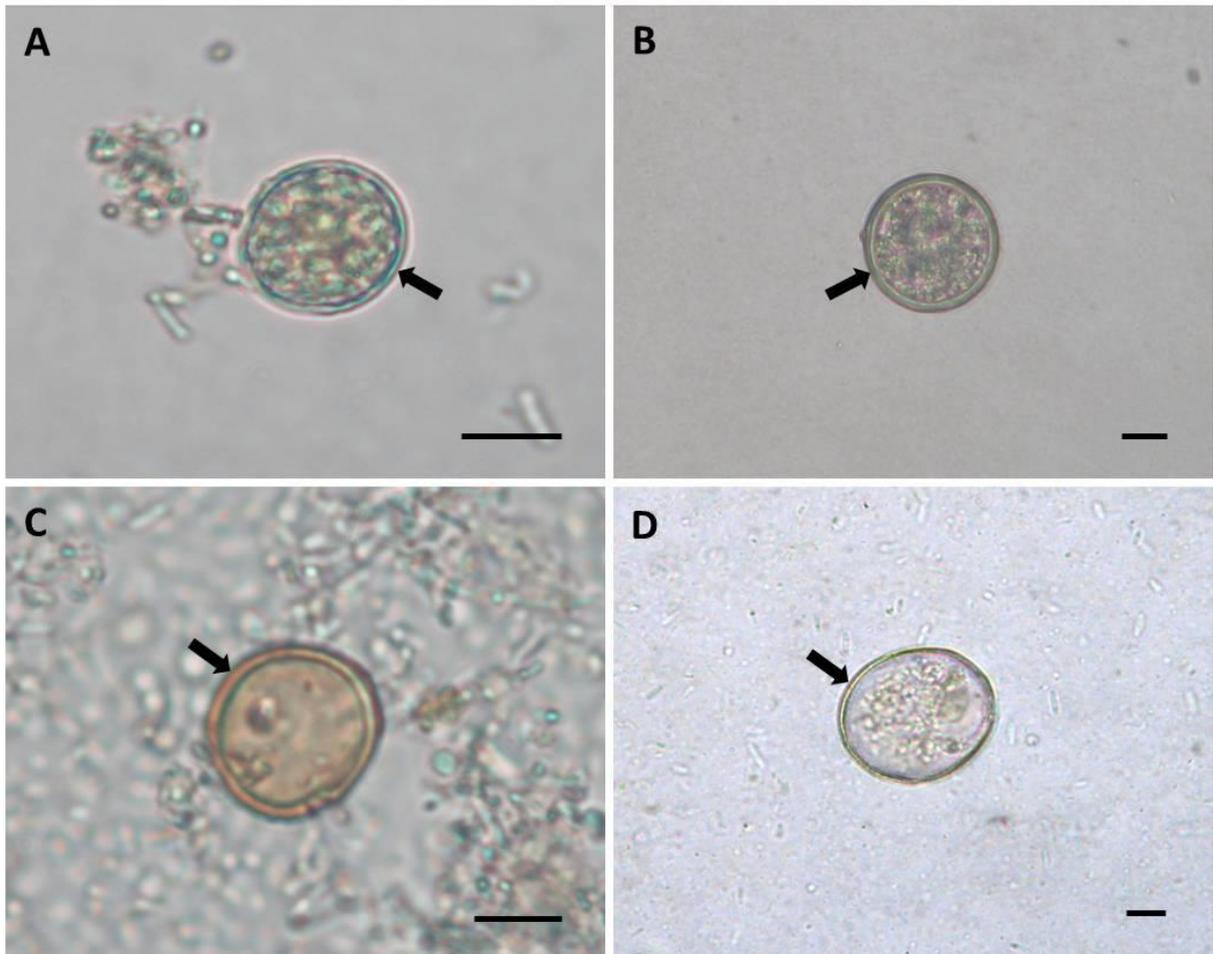


Figura 9. Foto microscopia de coccídeos observados em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*, após 10 dias de aeração forçada e concentrados em solução saturada de sacarose. Destaque para parede dupla característica de oocistos (**setas**), forma e tamanhos diferentes (**A, B, C e D**) e a não esporulação dos mesmos no período. Barras de 10 μ m.

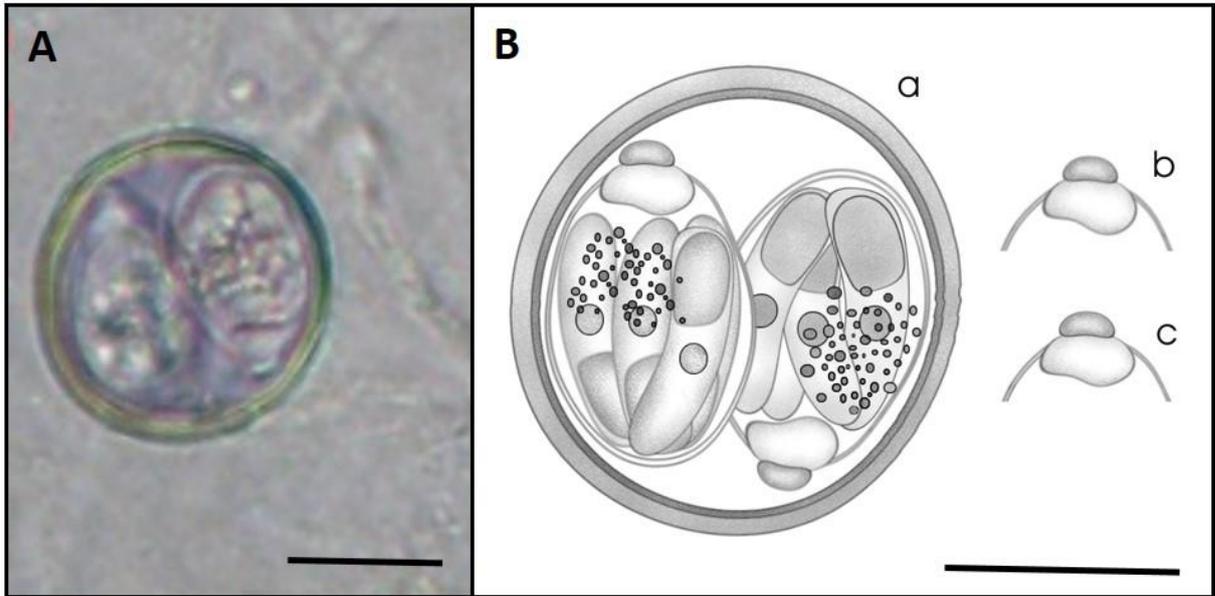


Figura 10. Oocisto esporulado de *Isospora* sp. isolado em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandae*. Em **A**, foto microscopia em solução saturada de sacarose e em **B**, fotomicrografia mostrando oocisto (a) com dois esporocistos e quatro esporozoítas em seu interior, além das variações (b e c) observadas do corpo de Stieda e substieda. Barra com 10 μ m.

Tabela 1. Morfometria de oocistos de *Isospora* sp. isolados de fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*

Parâmetros	n	Diâmetros (μm)		Índice Morfométrico
		MAIOR	menor	
Oocistos	62	21,59 \pm 2,92 (12,32-28,27)	19,82 \pm 2,75 (11,83-25,86)	0,92 \pm 0,04 (0,77-0,99)
Esporocistos	54	13,70 \pm 2,12 (9,22-18,92)	10,04 \pm 1,24 (7,5-13,51)	0,74 \pm 0,1 (0,59-0,97)
Corpo de Stieda	13	1,69 \pm 0,25 (1,38-2,12)	1,02 \pm 0,27 (0,61-1,42)	0,61 \pm 0,16 (0,32-0,87)
Corpo de Substieda	06	4,66 \pm 0,86 (3,34-5,69)	1,86 \pm 1,02(0,84-3,56)	0,40 \pm 0,22 (0,18-0,77)

Tabela 2. Morfometria de estádios de protozoários e helmintos observados em fezes de Emu, *Dromaius novaehollandiae*

Espécimes	n	Diâmetros (μm)		Índice Morfométrico
		MAIOR	menor	
<i>Entamoeba</i>				
sp.				
Trofozoitos	3	44,78 \pm 6,30 (39,01-51,51)	29,40 \pm 7,63 (21,39-36,57)	0,66 \pm 0,15 (0,49-0,78)
Cistos	11	27,72 \pm 9,62 (12,11-40,32)	25,61 \pm 8,91 (10,98-37,94)	0,93 \pm 0,05 (0,81-1,00)
Ovos				
Strongylida	29	103,81 \pm 22,16 (50,13-143,29)	57,48 \pm 14,08 (26,12-81,57)	0,55 \pm 0,07 (0,38-0,66)
Cestoda	9	47,37 \pm 13,06 (33,65-65,30)	44,30 \pm 12,05 (32,43-61,52)	0,94 \pm 0,02 (0,90-0,96)
Ascaris	9	89,22 \pm 34,75 (15,92-136,83)	79,00 \pm 35,14 (15,35-132,22)	0,90 \pm 0,17 (0,45-1,00)

5.2 BIOLOGIA MOLECULAR

Pela técnica de PCR não foi encontrada presença de *Cryptosporidium*spp. nas fezes dos emus analisados (Figura 11); porém as amostras foram diagnosticadas como positivas para os protozoários *Giardiaspp.* (Figura 12) e *Entamoebasp.* (Figura 13).

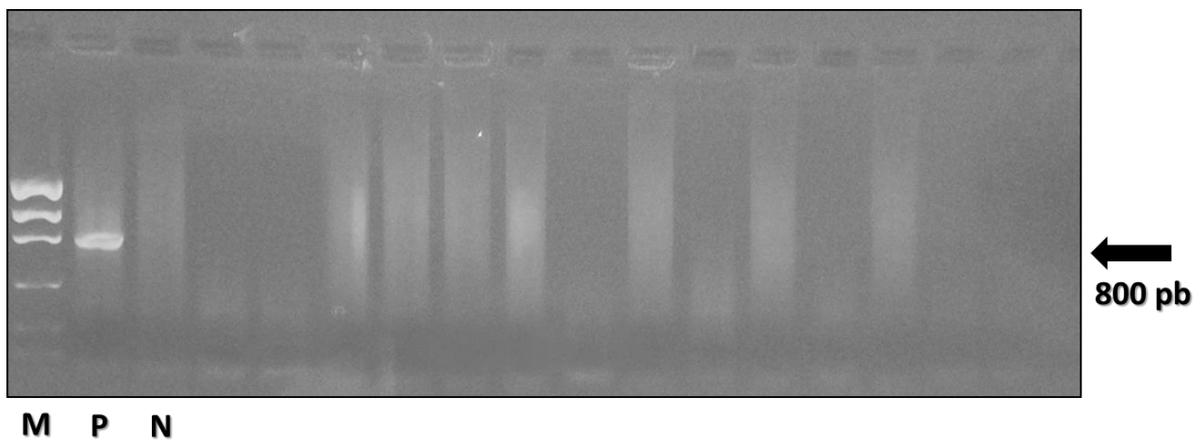


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose (1%) com produtos da *nested* PCR do gene 18S rRNA de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Marcador de peso molecular (**M**), controle positivo (**P**), controle nested negativo (**N**), e amostras negativas. A seta indica a posição relativa com o respectivo peso molecular do fragmento do DNA amplificado para *Cryptosporidium* spp.

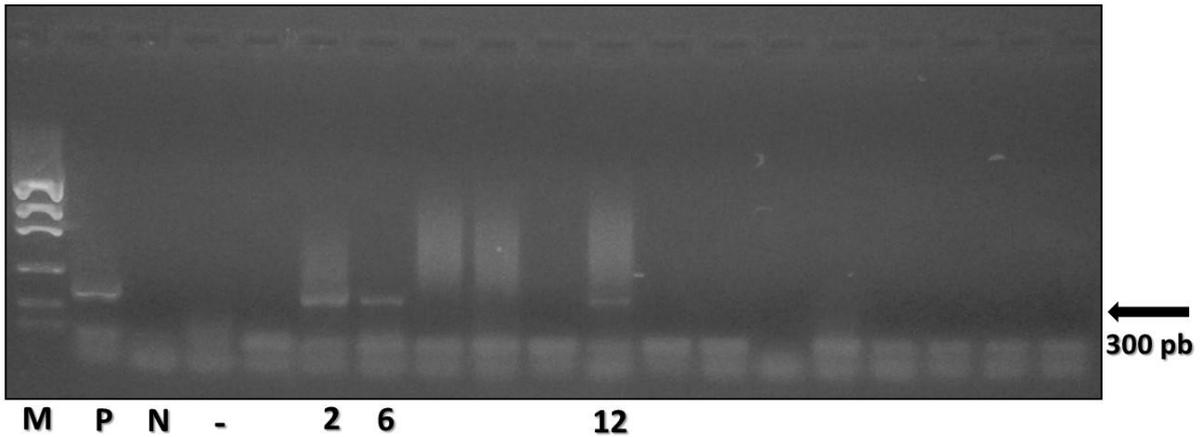


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de *Giardia* spp. Marcador de peso molecular (**M**), controle positivo (**P**), controle (nesterd) negativo (**N**), controle negativo (-) e as amostras 2, 6 e 12 positivas. A seta indica a posição relativa com o respectivo peso molecular do fragmento do DNA amplificado para o protozoário.

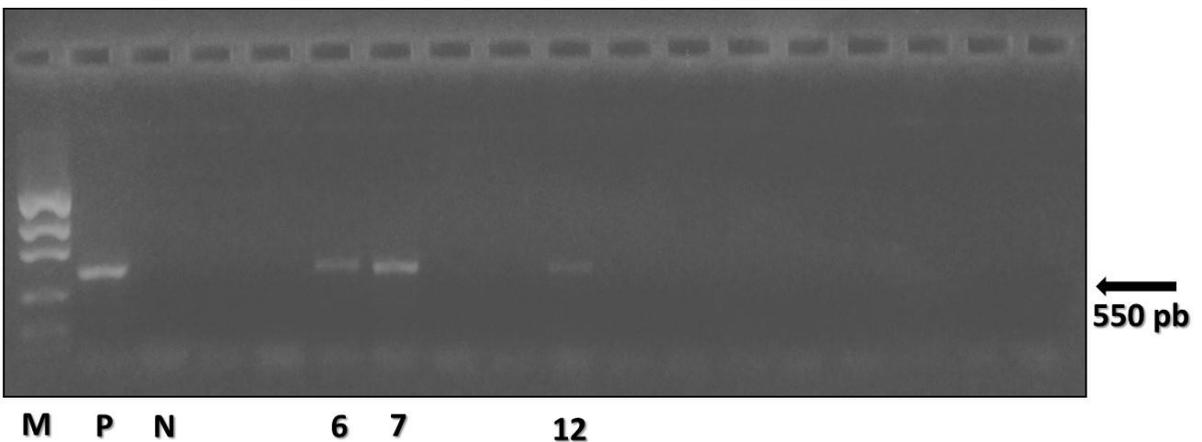


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de cistos e trofozoítos de *Entamoeba* sp. Marcador de peso molecular (**M**), controle positivo (**P**), controle negativo (**N**) e amostras 6, 7 e 12 positivas. A seta indica a posição relativa com o respectivo peso molecular do fragmento do DNA amplificado para o protozoário.

6 DISCUSSÃO

A prevalência de parasitas gastrintestinais é alta em locais onde as condições de vida e saneamento básico são insatisfatórios ou inexistentes. Muitos deles, como protozoários dos gêneros *Entamoeba* e *Giardia*, além de helmintos dos gêneros *Ascaris* e *Trichuris*, bem como muitas espécies de Cestodas são transmitidos pela água ou alimentos contaminados enquanto que outros helmintos do gênero *Strongyloides* são transmitidos por larvas presentes no solo (NEVES, 2005).

Muitos são os relatos de ovos de nematoides em fezes de ratitas, principalmente, avestruzes. Análise de amostras fecais de emas da Argentina, analisadas por Martínez-Díaz *et al.* (2013) revelaram ovos da ordem Strongylida com dimensões médias de 170 x 65 μm . Os autores concluíram que esses ovos eram compatíveis aos de *Deletrocephalus* descritos por Taylor *et al.* (2000), que encontraram medidas médias de 150-160 x 70 μm . Estes são menores que os ovos de *Paradeletrocephalus minor* que medem 190-200 x 60-70 μm (ACOMOLLI *et al.*, 2006). Da mesma forma, Chang Reissig *et al.* (2001), na Argentina, observaram ovos de *Trichostrongylus* sp. em fezes de emas. Estes apresentaram médias de 59,5 μm x 26,7 μm (48-72x 20-32 μm . Em estudo conduzido por Rickar *et al.* (1997), foram encontrados ovos sugestivos de *Deletrocephalus* ou *Paradeletrocephalus* em fezes de emu.

Os ovos do tipo Strongylida (Figura 5) encontrados em fezes de emus, desta pesquisa, apresentavam média de 103,81 x 57,48 μm (Tabela 2), caracterizados, portanto, como menores que os encontrados por Martínez-Díaz *et al.* (2013) e Taylor *et al.* (2000), e maiores que os de *Trichostrongylus* sp. descritos por Chang Reissig *et al.* (2001), mas dentro da faixa de tamanho de *P. minor* descrito por Acomolli *et al.* (2006). Porém, apesar da semelhança das características morfológicas e morfométricas dos ovos, encontrados nas fezes dos emus, podemos apenas caracterizar como ovos do tipo Strongylida.

No norte do estado do Rio de Janeiro, foi identificada uma infecção mista por *Libyostrongylus douglassii* e *L. dentatus* em avestruzes necropsiados (EDERLI *et al.*, 2008). *Libyostrongylus douglassii* é o parasita gastrintestinal mais significativo economicamente, quando se fala em criação de avestruzes, causando sérios prejuízos (NEMEJC e LUKESOVA, 2012). Uma larva foi visualizada (Figura 5) e, por

não existirem dados na literatura sobre larvas de helmintos de emus oriundos de culturas fecais que possam caracterizar as espécies, esta não pode ser identificada o que poderia complementar a identificação dos ovos visualizados. Andrade *et al.* (2011) encontrou *Lybiostrongylus* e *Codiostomum* em fezes de avestruzes de nove estados brasileiros. Soleiro (2009) diagnosticou *C. struthionis* em avestruzes adultas de criatórios comerciais no Rio de Janeiro e estes não apresentavam sinais clínicos sugestivos de infecção parasitária. Nenhum sinal clínico ou deletério característicos de helmintoses em ratitas foi observado, tal como descrito por Nemejc e Lulesova (2012), provavelmente, por estes estarem parasitados de forma endêmica como observados em avestruzes por outros pesquisadores (EDERLI *et al.*, 2008; SOLEIRO, 2009; ANDRADE *et al.*, 2011).

Em um estudo similar, porém, em outros criatórios e abrangendo outros municípios do Rio de Janeiro, Fagundes (2009) observou *C. struthionis* em 85,94% das aves adultas. Em 97,72% das aves na mesma faixa etária, observou ainda presença de protozoários, com identificação dos gêneros *Blastocystis*, *Entamoeba* e *Cryptosporidium* presentes em infecções simples ou mistas. Outros autores, ainda no norte do estado do Rio de Janeiro, analisaram fezes de avestruzes de seis fazendas e observaram presença de ovos do tipo *Strongylida* em cinco destas (BONADMAM, 2006). Em emus, foi encontrado um relato feito por Jansson e Christensson (2000) na Suécia, no qual identificaram ovos de nematoides como sendo de *Libyostrongylus* spp. e *Capillaria* spp., porém sem identificação através da larva. Da mesma forma, neste trabalho, não foi feita a identificação dos tipos de nematoides. Para tal, seria necessária a aplicação de técnicas específicas para que estes ovos eclodissem e, assim, fosse possível a identificação através da larva infectante.

Um nematoide de grande importância clínica para avestruzes é *Baylisascaris* spp. Este parasita pode ser transmitido por ovos presentes no material fecal de gambás e guaxinins, provocando graves lesões no sistema nervoso central e grandes perdas econômicas para as criações, já que esses ovos podem permanecer viáveis no solo por anos (NEMEJC e LUKESOVA, 2012).

No Rio Grande do Sul, fezes de 452 avestruzes foram analisadas e 300 animais estavam parasitados por ovos de *Heterakis* spp., *Ascaridia* sp., *Capillaria* spp., *Hymenolepis* spp., *Codiostomum* e pelos protozoários *Isospora* sp. e

Balantidium spp. (MATTOS *et al.*, 2011). Fezes de 50 avestruzes de Formiga, MG foram analisadas e tiveram ovos de Ascaridoidea em 10%. Resultados semelhantes foram encontrados por Rosa (2003). Em seu trabalho, o autor cita que ovos de endoparasitas das superfamílias Ascaridoidea e Strongiloidea são os mais comumente observados em testes simples de flutuação de fezes de ratitas. Após necropsia de um emu que apresentava problemas de locomoção e paralisia bilateral, foi encontrado parasita no cerebelo do animal sendo identificado como Ascaridoidea (WINTERFIELD e THACKER, 1977). Em nossa pesquisa, ovos do tipo áscaris e do tipo cestoide foram encontrados nas fezes dos emus, principalmente, *Baylisascaris* spp. A média dos ovos tipo *Ascaris* encontrados em emus foi 89,22 x 79,00 µm, enquanto que para ovos tipo cestoide foi 47,37 x 44,30 µm (Tabela 2). O único relato encontrado a respeito da ocorrência de *Baylisascaris* spp. em emu foi feito por Kazacos *et al.* (1982). Ovos do tipo *Ascaris* spp. são prevalentes em todo o mundo (REY, 2001) e são, frequentemente, observados em aves domésticas e outros animais (FOREYT, 2005; NADLER e HUDSPETH, 2000). A infecção por este nematoide causa grande impacto sobre o ganho de peso dos animais, retardando o crescimento por promoverem uma competição com o hospedeiro pelos nutrientes. Os ovos desse parasita ficam viáveis no ambiente por longos períodos, permitindo infecção e reinfecção dos animais (REY, 2001). A tênia *Houttuynia struthionis* é um parasita do intestino delgado e um importante cestóide de avestruzes e emas (NEMEJC e LUKESOVA, 2012), no entanto, não há relatos de cestóides em Emu e nem o impacto deste sobre estas aves muito menos seu potencial zoonótico. Desta forma, trabalhos que descrevam esta parasitose em emus são necessários inclusive com a descrição dos parasitas adultos coletados em necrópsias e seus respectivos ovos.

Cistos de *Entamoeba* sp. foram observados nas fezes dos emus (Figura 1 C - F). Os cistos encontrados eram uninucleados e multinucleados, nos quais puderam ser visualizados pelo menos seis núcleos, com médias de diâmetros 27,72 x 25,61 µm. Além disso, foram identificados ainda trofozoítos deste protozoário, com média de diâmetro de 44,78 x 29,4 µm (Figura 1 A e B). Em avestruzes da Grécia, foram identificados cistos de *Entamoeba* sp. de um núcleo com diâmetro de 10-15 µm (SOTIRAKI *et al.*, 2001). Os cistos de *E. galiinarum*, espécie descrita em aves,

possuem oito núcleos e são menores, tendo 12-15 μm , enquanto que os de *E.coli* possuem 10-33 μm (TYZZER, 1920; McDOWELL, 1953; LEVINE, 1985).

Em 2000, Martínez-Díaz *et al.* descreveram cistos de um núcleo de *Entamoeba* sp. em fezes de avestruz da Espanha. Quase 90% das amostras tinham cistos de um núcleo e diâmetro médio de 13,47 μm (8-20 μm), enquanto que os trofozoítos possuíam 19,88 μm (8-35 μm). A média dos cistos e trofozoítos encontrados em nosso estudo em emus foram maiores que os encontrados por este autor (Tabela 2). Mais tarde em 2004, Ponce-Gordo *et al.* analisaram geneticamente esses parasitas e, após encontrar diferenças na sequência de RNA, concluíram ser esta, uma nova espécie, nomeando-a *Entamoeba struthionis*. Em 2002, Ponce-Gordo *et al.* descreveram cistos de oito núcleos em emas da Europa. Estes possuíam morfometria de 20 μm em média, sendo menores que os encontrados nesta pesquisa. Os autores sugerem ainda, que há possibilidade desta nova espécie infectar outros hospedeiros além das ratitas. Em emas da Argentina, foram encontrados cistos de *Entamoeba* sp. de um e oito núcleos, sendo estas identificadas como *Entamoeba bovis-like* e *Entamoeba coli-like*, respectivamente. As amebas encontradas nas emas argentinas, possuíam 14 -22 μm (MARTÍNEZ-DÍAZ *et al.*, 2013). Os valores aqui encontrados estão acima dos citados em outras ratitas.

Os autores Craig e Diamond (1996) citaram presença de *Entamoeba* sp. em avestruzes, porém, em emus, não foram encontrados relatos. A presença de *Entamoeba* sp. nas fezes de emus foi confirmada pela técnica de PCR (Figura 13), além das medidas observadas nos emus de nossa pesquisa serem caracterizados como cistos e trofozoítos maiores que os encontrados em outras ratitas, que permitem hipoteticamente inferir que *Entamoeba* sp. observadas nos emus são diferentes das espécies já descritas em outras aves, inclusive ratitas. Todavia, o diagnóstico molecular com sequenciamento do produto da PCR é necessário antes que se afirme tal hipótese. Sabe-se que o tamanho dos trofozoítos pode variar de acordo com as condições ambientais, e o mesmo não acontece com os cistos (NEAL, 1966), mas mesmo assim é necessário o desenvolvimento de mais estudos, inclusive com infecção experimental, transmissão cruzada e genética para esclarecer qual ou quais espécies de *Entamoeba* os emus são hospedeiros.

Em trabalho realizado por Erlandsen e Bermick (1987) com fezes de periquito, trofozoítos de *Giardia* foram descritos medindo 14 µm de comprimento e 6 µm de largura, sendo totalmente diferente das espécies até então descritas e por isso foi nomeada como *G.pisittaci*. Trofozoítos do grupo de *G. duodenalis* possuem aproximadamente 10-12 µm por 5-7 µm. Esses organismos estão sendo isolados de seres humanos, cães, gatos, cobaias, castores, gerbis, aves e répteis, ovelhas e gado, e acredita-se que alguns dos animais atuem como reservatório para a infecção nos seres humanos (FAUBERT, 1988; BURET *et al.*, 1990). Este também já foi descrito em avestruzes e emus (WADE, 1992; STEWART, 1994; GREINER e RITCHIE, 1994; GRAHAM, 1995). Há somente duas espécies de *Giardia* descritas em aves, sendo *G. ardeae*, apresentando trofozoítos com diâmetro de 6,5 x 10 µm, e *G. psittaci* (THOMPSON, 2002). Esse mesmo autor descreve o tamanho dos trofozoítos das cinco espécies deste gênero, em que os diâmetros variam de 4 µm a 30 µm para diâmetro menor e maior. Nenhuma das espécies possui diâmetro compatível com o encontrado neste experimento. Em nossa pesquisa, dois cistos de *Giardia* spp. foram observados pela técnica de centrifugo-flutuação nas fezes dos emus, medindo 11,72 µm x 9,76 µm e 10,82 µm x 10,09 µm, além de um trofozoíto com diâmetro de 14,62 µm x 12,17 µm. Sua presença foi confirmada pela técnica de PCR.

Há muitos relatos de infecção por *Cryptosporidium* spp. em avestruzes (PENRITH *et al.*, 1993; PENRITH e BURGER, 1993; SOTIRAKI *et al.*, 2001; FAGUNDES, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012), e poucos em emas (PONCE-GORDO *et al.*, 2002; LUDWIG E MARQUES, 2008). *Cryptosporidium* é um gênero comumente encontrado em fezes de avestruzes (HUCHZERMEYER, 2002) e o mesmo parece não ocorrer com emus. Neste experimento, não foram encontrados oocistos deste coccídeo em nenhuma das técnicas executadas (Figura 11).

Na Europa, 500 avestruzes e algumas emas foram analisados para presença de ectoparasitas e endoparasitas, em que 29 espécies de parasitas foram identificadas, sendo a maioria protozoários. Oocistos não esporulados compatíveis com os das espécies de *Isospora* e *Eimeria* foram observados (PONCE-GORDO *et al.*, 2002). Em estudo conduzido por Batista *et al.* (2008), em criações de avestruzes do estado do Espírito Santo, apontou a presença de oocistos *Isospora* sp. Segundo

o autor, as aves se encontravam em boas condições de saúde, higiene e manejo, sendo estas, semelhantes a dos emus utilizados em nossa pesquisa.

A coccidiose tem sido descrita em avestruzes e emus, no entanto, a infecção não foi confirmada como um problema clínico importante em ratitas (JENSEN, 1993; STEWART, 1994), e é citada como sendo uma doença comum, principalmente, em filhotes de emu (JURAJDA, 2002). *Eimeria* spp., *Houttuynia struthionis* e *Libyostrongylus douglassii* pertencem aos parasitas que causam perdas econômicas mais graves em ratitas no mundo (NEMEJC e LUKESOVA, 2012). As referências das medidas e descrições de oocistos de *Isospora* sp. e *Eimeria* spp. em ratitas são ainda muito escassas. Oocistos não esporulados foram encontrados por Ponce-Gordo (2002) em fezes de emas e avestruzes; possuíam tamanho de 12-15 μm , mas não é possível chegar ao gênero somente pelo tamanho desses oocistos. Conforme já citado, poucos foram os oocistos de *Eimeria* spp. encontrados neste trabalho apresentando diâmetro maior médio de 16,04 e 16,47. Há relatos de uma espécie de *Eimeria* spp. em avestruzes do norte da América (JENSEN, 1992 e WADE, 1992).

Avestruzes de um zoológico da Espanha tiveram suas fezes coletadas e foram identificados oocistos de *Eimeria* spp. (PEREZ CORDON, *et al.*, 2008), porém, não foi feita a descrição morfológica ou morfométrica destes oocistos esporulados impossibilitando uma comparação. A análise das fezes de dois emus de um zoológico da Itália mostraram a presença de coccídeos, porém não foi feita a distinção entre os gêneros (PAPINI *et al.*, 2011).

Fezes de avestruzes coletadas por Mushi *et al.* (1998) apresentavam oocistos com formas que variavam de elipsoides a esféricos. Os oocistos elipsoides apresentavam média de tamanho de 28 x 22 μm . Os oocistos esféricos a subsféricos possuíam tamanho médio de 21 x 21 μm . Este autor não teve sucesso na esporulação e por isso não se sabe o gênero deste coccídeo. Ainda segundo este autor, o tamanho dos oocistos encontrados por eles se assemelham aos de *Eimeria tropicalis*, descritos por SOULSBY (1986), que apresentam forma esférica e subsféricas, tamanho de 19-24 x 18-23 μm , inclusive já tendo sido descrito em avestruz. Oocistos de *Eimeria* spp. com tamanho médio de 19 x 23 μm foram observados em 42% dos avestruzes estudados em fazendas gregas (SOTIRAKI *et al.*, 2001). Chang Reissig *et al.* (2001) observaram oocistos de *Eimeriaspp.* em

amostras fecais de emas, com diâmetro médio de 26 x 23,7 μm (24-28 x 20-28 μm), sendo estes oocistos maiores que os encontrados no presente trabalho em Emu. Oocisto de *Isospora* sp. foi descrito por Yakimoff (1940) em avestruz de um zoológico Russo, sendo a única espécie descrita em ratitas. Este oocisto era esférico e possuía diâmetro de 30,6 μm , sendo observada a presença de corpo de Stieda e denominado *I. struthionis*. A maior parte das descrições de oocistos do gênero *Isospora* foi feita de oocistos recuperados de pássaros (BERTO, *et al.*, 2009a; BERTO, *et al.*, 2009b; BERTO, *et al.*, 2009c).

Muitos foram os parasitas encontrados nos emus utilizados neste experimento. Este fato pode ser explicado pelo fato de emus possuírem hábitos de ciscagem e coprofagia o que pode influenciar na infecção por parasitas entre os animais. Outra justificativa é que locais planos dificultam o escoamento das águas pluviais, propiciando o desenvolvimento e manutenção de parasitas (DIAS *et al.*, 2008). Os emus utilizados nesta pesquisa não demonstram ser vulneráveis a estas infecções, não tendo sido observados sinais clínicos em nenhum dos animais, o que confirma a afirmação de autores de que alguns destes parasitas não possuem importância clínica.

7 CONCLUSÃO

Emus, *Dromaius novaehollandiae*, são hospedeiro de espécies de helmintos característico das ordens Strongilida e Ascaridida, bem como da classe cestoda, além de protozoários dos gêneros *Entamoeba*, *Giardia*, *Isospora* e *Eimeria*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

AL-ATTAR, M. A.; FERNANDO, M. A. Transport of *Eimeria necatrix* Sporozoites in the Chicken: Effects of Irritants Injected Intraperitoneally. **J. Parasitol.**, v. 73, p. 494-502, 1987

ALBUQUERQUE, R. Antimicrobianos como Promotores de Crescimento. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. **Farmacologia Aplicada a Avicultura**. São Paulo. Ed. Roca, 1 ed. Cap. 9, p.149-160, 2005

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. **Clin. Microb. Vet.**, v.15, p. 58-65, 2002

ANDRADE, J.G.; LELIS, R.T.; DAMATTA, R.A.; SANTOS, C.P. Occurrence of nematodes and anthelmintic management of ostrich farms from different Brazilian states: *Libyostrongylus douglassii* dominates mixed infections. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 129-133, 2011

AVIAN WEB (2012). *Avian Web* [ON LINE]. Disponível em <www.avianweb.com>. Acesso em: 14 fev. 2012

BATISTA, A. M. B.; PEREIRA, M. A. V. C.; VITA, G. F. Parasitismo Intestinal em Avestruzes (*Struthio camelus australis* Linnaeus, 1786) da Região Sul do Espírito Santo, no ano de 2006. **Rpcv**, v.103, 567-568, p.189-193, 2008

BERENQUER, J. G. **Manual de Parasitologia: Morfologia e Biologia dos Parasitos de Interesse Sanitário**. Ed Argos, Chapecó, 602 f., 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.R.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. Two new *Isospora* species from Brazilian tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) of South America. **Parasitol Res**. V.105, 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

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K.; JOACHIN, A.; KNOBLOCK, J.; ZELCK, E.U. Comparison of Fluorescence, Antigen and PCR Assays to Detect *Cryptosporidium parvum* in Fecal Specimens. **Diagnostic of Microbiology Infection Diseases**, v. 43, p. 283 – 288, 2002

BONADIMAN, S. F.; EDERLI, N. B.; SOARES, A. K. P.; NETO, A. H. A. M.; SANTOS, C. P.; DaMATTa, R. A. Occurrence of *Lybiostrongylus* sp. (Nematoda) in ostriches (*Struthius camelus* Linnaeus, 1758) from the north region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.175-179, 2006

BOUZID, M; STEVERDING, D; TYLER, K. M. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. **Current Opinion Biotechnol.**, v. 19, p. 302-306, 2008

BROWN, M. A.; BALL, S. J.; SNOW, K. R. Coccidian Parasites of British Wild Birds. **Journal of Natural History**. v. 44, 43-44, p. 2669-2691, 2010

BURET, A.; DENHOLLANDER, N.; WALLIS, P. M.; BEFUS, D.; OLSON, M. E. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. **J. Infect. Dis**, v.162, p. 231-237, 1990

CARNEIRO, J. R.; CAMPOS, D. B.; LINHARES, G. C.; RODRIGUES, N. *Eimeria* em Bovinos Mestiços Zebu-Holandês Procedentes da Bacia Leiteira de Goiânia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 355-360, 1988

CARVALHO, T. T. R. Estado Atual do Conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. **Revista Patologia Tropical**, v. 38, n. 1, p. 1-16, 2009

CASAS, M. C.; DUSZYNSKY, 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 (2013). *Centers for Disease Control and Prevention* [ON LINE]. Disponível em: <www.cdc.gov>. Acesso em: 12 de fev. 2013

CHANG REISSIG, E.; OLAECHEA, F.; ROBLES, C.A. Parasitological findings of lesser rhea, *Pterocnemia pennata* (D'orbigny) in faeces from northern patagonian, Argentina. **Arch. med. Vet.**, v.33, n.2, 2001

CHAPPEL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. *Cryptosporidium parvum*. Intensity of Infection and Oocyst Excretion Patterns in Healthy Volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 173, P. 232 – 236, 1996

CLIPSHAM, R. (1995). Avian pathogenic flagellated enteric protozoa. In A. M. Fudge e R.E. Schmidt (Eds) *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v.4, n.3, p. 112-125. Philadelphia: W.B. Saunders Company

COLNAGO, G.L. A Coccidiose como Doença Nutricional. In: Simpósio Internacional sobre Coccidiose Aviária, 2.1999. Foz do Iguaçu. **Anais...**: facta, p.35-44, 1999

CONBOY, G. *Giardia*. **Can. Vet. J.**, v. 38, p. 245-247, 1997

CORDEIRO, T. G. P.; MACEDO, H. W. Amebíase. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, p. 119-128, 2007

CORDÓN, G. P.; PRADOS, A. H.; ROMERO, D.; MORENO, M. S.; PONTES, A.; OSUNA, A.; ROSALES, M.J. Intestinal parasitism in the animals of the zoological garden "Pena Escrita" (Almunecar, Spain). **Veterinary Parasitology**. V. 156, p. 302–309, 2008

CORDÓN, G. P.; PRADOS, A. H.; ROMERO, D.; MORENO, M. S.; PONTES, A.; OSUNA, A.; ROSALES. Intestinal and haematic parasitism in the birds of the Almuñecar (Granada, Spain) ornithological Garden. **Veterinary Parasitology**. V. 165, n. 3–4, p. 361–366, 2009

CORPET, D. E. Microbiological hazards for humans of Antimicrobial Growth Promoter use in Animal Production. **R. Med. Vet.** v.147, n. 12, p.851-862, 1996

COURA, J. R. Síntese das doenças infecciosas e parasitárias. Ed. Guanabara Koogam, Rio de Janeiro. 2008

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

CRAIG, T. Natural Parasites of Ratites. In: Proceedings of Annual Ratite Conference, p. 1–2. **College of Veterinary Medicine**, Texas, Texas A & M University, 1993

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The Life Cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) Infecting Chickens. **J. Protozool.**, v. 33, p. 289 – 296, 1986

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

DANFORTH, H. D.; AUGUSTINE, P. C. *Eimeria tenella*: use of a Monoclonal Antibody in Determining the Intracellular Fate of the Refractile Body Organelles and the Effect on *in vitro* Development . **Exp. Parasitol.**, v. 68, p. 1 - 7, 1989

De CARLI, G. A.; MOURA, H. Métodos de Coloração para Coccídeos Intestinais. In.: De CARLI, G. A. Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. São Paulo: Atheneu, p. 223 - 264, 2001

DESPORTES-LIVAGE, I.; DATRY, A. Infections à Microsporidies, *Isospora* et *Sarcocystis*. **EMC - Maladies Infectieuses**, v. 2, p. 178 – 196, 2005

DHILLON, A. S.; THACKER, H. L.; DIETZEL, A. V.; WINTERFIELD, R. W. Respiratory Cryptosporidiosis in Broiler Chickens. **Avian Dis.**, v. 25, p. 747 – 751, 1981

DIAS, G.M.F.; BEVILACQUA, P.D.; BASTOS, R.K.X.; OLIVEIRA, A.A.; CAMPOS, G.M.M. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n. 6, p. 1291-1300, 2008

DINGLE, J.; SHANAWANY, M. M. (1999): Ostrich Production Systems: FAO *Animal Production and Health Paper* 144. 1 ed., FAO, Rome, 256 p.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* Oocyst from Cat Faeces. **J. Exp. Med.**, v. 132, p. 636 - 662, 1970

DUBREMETZ, J. F.; FERREIRA, E.; DISSOUS, C. Isolation and Partial Characterisation of Rhoptries and Micronemes from *Eimeria nieschulzi* Zoites (Sporozoa, Coccidia). **Parasitol. Res.**, v. 75, p. 449-54, 1989

DUPONT, H. L.; CHAPPEL, C. L.; STERLING, C. R.; OKHUYSEN, P.C.; ROSE, J. B.; JAKUBOWSKI, W. I. The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. **N. Eng. J. Med.**, v. 332, p. 855 – 859, 1995

DURETTE-DESSET, M. C.; BEVERIDGE, I.; SPRATTJ, D. M. The origins and evolutionary expansion of the Strongylida (nematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1139-1165, 1994

DUSZYNSKI, D.D; WILBER, P.G. A guideline for the preparation of species descriptions in the eimeriidae. **J.Parasitol.**, v. 83, n.2, p.333-336, 1997

EDERLI, N. B.; BONADIMAN, S. F.; NETO, A. H.A. M.; DaMATTA, R. A.; SANTOS, C. P. Mixed infection by *Libyostrongylus douglassii* and *L. dentatus* (Nematoda: Trichostrongylidae) in *Struthio camelus* (Ratites: struthioniformes) from Brazil with further morfological characterization of adults. **Veterinary Parasitology**. V. 151,p. 227-232, 2008

EICHINGER, D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, 41(1): 17-21, 2001

ENTZEROTH, R.; DUBREMETZ, J. F.; HODICK, D.; FERREIRA, E. Immunoelectron Microscopic Demonstration of the Exocytosis of Dense Granules into the Secondary Parasitophorous Vacuole of *Sarcocystis muris* (Protozoa, Apicomplexa). **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 41, p. 182-188, 1986

ERLANDSEN, S. L.; BERMICK, W. J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **The Journal of Parasitology**. v. 73, n.3, p. 623-629,1987

ESPINOZZA-CANTALLANO, M.; MARTINEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 2, p. 318-331, 2000

EOI (2012). *Emu Oil Institute* [ON LINE]. Disponível em: <www.emu-oil.com>. Acesso em: 14 fev. 2012

FABER, J.E.; KOLLMANN, D.; HEISE, A.; BAUER, C.; FAILING, K.; BURGER, H.J.; ZAHNER, H. *Eimeria* Infections in Cows in the Parturient Phase and Their Calves: Oocyst Excretion and Levels of Specific Serum and Colostrum Antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 1, p.1 - 17, 2002

FAGUNDES, T. F. **Ocorrência e Sazonalidade de Parasitos Gastrointestinais em Avestruzes (*Struthio camelus*) de Três Faixas Etárias em uma Criação no Município de Areal, RJ**. Seropédica, RJ, 2009. 41 f. Tese de Mestrado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

FAUBERT, G. M. Evidence that giardiasis is a zoonosis. **Parasitol. Today** V. 4, p. 66-68, 1988

FAYER, R. Epidemiology of Protozoan Infections: the Coccidian. **Veterinary Parasitology**, v. 6, 1-3, p. 75 - 103, 1980

FAYER, R. **Cryptosporidiosis: Current Strategies to Meet a Widespread Problem**. In: Barta JR and Fernando MA (eds). Proceedings of the 6th International Coccidiosis Conference. Guelph, Canadá. p. 95 – 101, 1993

FAYER, R. Effects of High Temperature on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 2732 – 2735, 1994

FAYER, R. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. Boca Raton CRC Press, 251 f., 1997

FAYER, R.; LEWIS, E. J.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium parvum* in Systems from Commercial Harvesting Sites in the Chesapeake Bay. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, p. 706 - 716, 1999

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, Detection and Identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, - 2 p. 1305 - 1322, 2000

FAYER, R.; NERAD, T. Effects of Low Temperature on Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1431 – 1433, 1996

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. **General Biology of *Cryptosporidium***. In: DUBEY, J.P., SPEER, C.A., FAYER, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1 – 29, 1990

FAYER, R.; UNGAR, B. L .P. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. **Microbiology Reviews**, v. 50, p. 458 - 483, 1986

FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. 2 ed. Boca Raton CRC Press, 560 p., 2008

FERNANDEZ, S.; PAGOTTO, A. H.; FURTADO, M. M.; KATSUYAMA, A. M.; MADEIRA, A. M.; GRUBER, A. A Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection and Discrimination of the Seven *Eimeria* Species that Infect Domestic Fowl, **Parasitology**, v. 127, n. 4, p. 317–325, 2003

FERNANDO, M. A. Pathology and Pathogenicity. **The Biology of the Coccidian**. Baltimore: Univ Park press, 502 f. 1982

FILICE, F.P., 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from a laboratory rat. **University of California Publications in Zoology**, v. 57,p. 53–146

FIUZA, V.R.S.; COSENDEY, R.I.J.; OLIVEIRA, F.C.R. Criptosporidiose suína associada aos sistemas de produção no Estado do Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p.224-229, 2008

FITZGERALD, P. R. The Economic Impact of Coccidiosis in Domestic Animals. **Adv Vet. Sci. Comp. Med.**, v. 24, p.121-143, 1980

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

FOGGIN, C. M. 1992. Veterinary problems of ostriches. In: Hallam MG (ed.), *The Topaz Introduction to Practical Ostrich Farming.*, p. 61–96. **The Ostrich Producers' Association of Zimbabwe**, Harare

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Ver Panam Infectol**. V.9, n.1, p.36-43, 2007

GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D. A. **Diagnostic Medical Parasitology**. 3ed. Washington: ASM Press, p. 54 - 89 e 411-433, 1997

GEURDEN, T.; CLAEREBOU, E.; VERCRUYSSSE, J.; BERKVEN, D. Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a Bayesian approach. **International Journal for Parasitology**. V. 34, p. 1121–1127, 2004

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural *Giardia* infection in calves. **Veterinary Parasitology**. V. 142, p. 367–371, 2006

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 98-106, 2010

GORDON, N. M.; WITHLOCK, H. V. A new Technique for Counting Nematode Eggs in Sheep Faeces. **J. Comm.Cient. Indust.Res.Org.**, v.12, p. 50 – 52, 1939

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

HAQUE, R.; CHRISTOPHER, D. H.; HOUGHES, M.; HOUP, E.; PETRI JR., W. A. Current concepts: Amebiasis. **N.Engl.J.Med.**, v. 348, n. 16, p. 1565-1573, 2003

HERESI, G.; CLEARY, T.G. **Giardia. Pediatrics in Review**, v.18, n.7, p.243–247, 1997

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; NG'ANZO, M.; RYAN, U. M.; OLSON, M. E.; COX, P. T.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. **Int J Parasitol.**, v.34, p. 769-777, 2004

HOBERG, E. P.; LLOYD, S.; OMAR, H. *Libyostrongylus dentatus* (Nematoda:Trichostrongylidae) from ostriches in North America, with comments on the genera *Libyostrongylus* e *Paralibyostrongylus*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 1, p. 85 – 93, 1995

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, p.44-51, 1997

HUCHZERMEYER, F.W. 1999. Veterinary Problems. In: Deeming, D.C. **The ostrich**

biology, production and health. Cabi Publishing, NewYork, USA

HUCHZERMEYER, F.W. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 21, n. 2, p. 265-276, 2002

JANSSON, D. S.; CHRISTENSSON, D. Gastrointestinala parasiter hos strutsfåglar i Sverige. **Svensk Veterinär Tidning**, v. 52, p. 621–626, 2000

JENSEN, J. M., 1993. Infection and parasitic diseases of ratites. In: M.E. FOWLER (Ed.), Zoo and wild animal medicine. 3 ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia. USA

JURAJDA V. (2002): Chov a nemoci pštrosů. 1st edition, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno, 92 p.

KANGAROO EDUCATION (2012). *Kangaroo Education* [ON LINE]. Disponível em: <www.kangaroo.com.br>. Acesso em: 14 fev. 2012

KANYARI, P. W. N. Experimental Infections With Coccidiosis and Serum Antibody Quantitation in two Breeds of Goats. **Veterinary Parasitology**. v. 28, n. 12, p. 11 - 18, 1988

KARANIS, P; KOURENTI, C; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J Water Health**. v.5, p.1-38, 2007

KATZ, D. E.; HEISEY-GROVE, D.; BEACH, M.; DICKER, R. C.; MATYAS, B. T. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. **Epidem Infect.**, v. 134, p. 935-941, 2006

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

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

KEE (2012). *Kalaya Emu Estate* [ON LINE]. Disponível em: <www.kalayaemuestate.com>. Acesso em: 14 fev. 2012

KEI (2012). *Kansas Emu Institute* [ON LINE]. Disponível em: <www.kansasemu.com>. Acesso em: 14 fev. 2012

KORICH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S.; SINCLAIR, N. A.; STERLING, C.R. Effects of Ozone, Chlorine Dioxide, Chlorine, and Monochloramine on *Cryptosporidium parvum* Viability. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 1423 – 1428, 1990

KREIER, J. P., BAKER, J. R., 1987. Parasitic Protozoa. Allen & Unwin, Inc., 8 **Winchester Place**, Winchester, Mass. 01890, USA. 93, p. 93

LAWN, A. M.; ROSE, M. E. Mucosal Transport of *Eimeria tenella* in the Caecum of the Chicken. **J. Parasitol.**, v. 68, p. 1117 - 1123, 1982

LEAV, B., A.; MACKAY, M.; WARD, H. D. *Cryptosporidium* Species: New Insights and Old Challenges. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 903 – 908, 2003

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology.**, 1^a ed. Ames: ISUPress, 414 f., 1985

LEWTHWAITE, P.; GILL, G. V.; HART, C. A.; BEECHING, N. J. Gastrointestinal Parasites in the Immunocompromised. **Cur. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 427 – 435, 2005

LICHTENFELS, J.R., 1980. In: ANDERSON, R.C., CHABAUD, A.G., WILLMOTT, S. (Eds.), CIH Key to the Nematode Parasites of vertebrates. *Common wealth Agricultural Bureaux*, Farnham Royal, Bucks, 1980, p. 1-41

LILLEHOJ, H. S.; CHOI, K. D.; JENKINS, M. C.; VAKHARIA, V. N.; SONG, K. D.; HAN, J. Y.; LILLEHOJ, E. P. A Recombinant *Eimeria* Protein Inducing Chicken Interferon-g Production. Comparison of Different Gene Expression Systems and Immunization Strategies for Vaccination Against Coccidiosis. **Avian Diseases**, v. 4, p. 379 – 389, 2000

LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Avian coccidiosis. A Review of Acquired Intestinal Immunity and Vaccination Strategies. **Avian Diseases**, v. 44, n. 408 - 425, 2000

LILLEHOJ, H. S.; TROUT, J. M. Avian Gut-associated Lymphoid Tissues and Intestinal Immune Responses to *Eimeria* Parasites. **Clinical Microbiology Review**, v. 9, p. 349– 360, 1996

LIMA, J. D. Coccidiose dos Ruminantes Domésticos. **Rev. Bras. Parasitol.Vet.**, v.13, suplemento 1, p. 9 - 13, 2004

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, FL, p. 133 – 148, 1990

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Biology of Mammalian *Isospora*. **Parasitology Today**, v. 10, n. 6, p. 214-220, 1994

LONG, P. L.; JOYNER, L. P. Problems in the Identification of Species of *Eimeria*. **J. Protozool.**, v. 31, n. 4, p. 535 - 541, 1984

LONG, P. L.; MILLARD, B. J.; JOYNER, L. P.; NORTON, C. C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. **Folia Vet. Lat.**, v.6, p. 201-217, 1976

LONG, P. L.; MILLARD, B. J. *Eimeria*: further studies on the immunization of young chickens kept in litter pens. **Avian Pathology**, v. 8, p. 213-228, 1979

LUDWIG, R.; MARQUES, S. M. T. Primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. em emas (*Rhea americana*) cativas de zoológico no Brasil. **Parasitol Latinoam**. V.63, p. 76 - 80, 2008

LUQUETTI, B. C.; FARIA, H., N.; da SILVA, B. R.; GIMENEZ, D.; CASAGRANDE, C.; LEITE, F., M.; CASTELLANI, R., S. Coccidiose Aviária e Agentes Tróficos. **Ciê. Agr. Saúde**, v. 6, p. 60 - 67, 2006

MALAN, F.S., GRUSS, B., ROPER, N.A., ASCHBURNER, A. J., DU PLESSIS, C. A., 1988. Resistance of *Libyostrongylus douglassi* in ostriches to levamisole. **J. South Afr. Vet. Asses**. 59, 202–203

MARKELL, E. K.; JOHN, D.J.; KROTOSKI, W.A. Lumen- dwelling protozoa. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999

MARQUARDT, W. C. Host and Site Specificity in the Coccidia: a Perspective. **Journal of Protozoology**, v. 28, n. 2, p. 243 – 244, 1981

MARTINAUD, G.; BILLAUDELLE, M.; MOREAU, J. Circadian Variation in Shedding of Oocysts of *Isospora turdi* (Apicomplexa) in Blackbirds (*Turdus merula*): An Adaptive Trait Against Desiccation and Ultraviolet Radiation. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, p. 735 – 739, 2009

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

MARTINEZ-DIAZ, R. A; MARTELLA, M. B.; NAVARRO, J. L.; PONCE-GORDO, F. Gastrointestinal parasites in greater rheas (*Rhea americana*) and lesser rheas (*Rheas pennata*) from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 194, n.1, p. 75-78, 2013

MARTINEZ-PALOMO, A. (Ed.) (1988). Biology of Amebiasis: Progress and Perspectives in the Biology of Parasitism. Alan R. Liss, New York

MASON, P.; THOMPSON, L. Wire worm (*Libyostrongylus douglassii*) and Ostrich. A paper for the New Zealand Ostrich Association, July 2004. Disponível em <<http://www.ostrichnz.com>>. Acesso em 25 de agosto de 2007

MATHIS, G. F.; McDOUGALD, L. R. Evaluation of Interspecific Hybrids of the Chicken, Guinea Fowl, and Japanese Quail for Innate Resistance to Coccidia. **Avian Diseases**, v. 31, p. 740 – 745, 1987

MATTOS, M.J.T; RIBEIRO, V.S.; MARQUES, S.M.T. Parasitismo gastrintestinal e aspectos do manejo de avestruzes (*Struthio camelus*) de pequenas propriedades do Rio Grande do Sul, Brasil. **Veterinária em Foco Canoas**. v.8, n.2, p.143-151, 2011

McDONALD, V.; STAPLES, R.; WARHURST, D. C. *In vitro* Cultivation of *Cryptosporidium parvum* and Screening for Anti-cryptosporidial Drugs. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 34, p. 1498-500, 1990

MCDOWELL, S. A morphological and taxonomic study of the caecal protozoa of the common fowl, *Gallus gallus* .**L. J. Morphol.**, V. 92, p. 337–399, 1953

McKENNA, P. B. *Libyostrongylus* infections in ostriches—a brief review with particular reference to their detection in New Zealand. **New Zeland Veterinary Association**, v. 53, p. 267–270, 2005

MELONI, B. P.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. 1989. Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 40, p. 629–637

MIRELMAN, D.; NUCHAMOWITZ, 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*. **J Clin Microbiol.**, v. 35, P. 2405-2407, 1997

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* e *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Inf Gen Evol**. V. 3, p. 233-244, 2003

MORGAN, U.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S.; FAYER, R.; LAL, A. A.; ELLOT, A.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian Ring-necked Parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 182 – 183, 2000

MOREIRA, P. V.; CHIMINAZZO, C.; QUEIROLO, M. T.; FESER, M.; CERESER, V. H.; ESMERALDINO, A. T.; DIFINI, R.; FALLAVENA, L. C. B. Ventriculite parasitária por *Libyostrongylus* sp em avestruz (*Struthio camelus*) e identificação de ovos do parasita em amostras de fezes de ratitas de diferentes criatórios do Estado do Rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**, v. 4, n. 2, p. 169 – 176, 2007

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

NADLER, S. A.; HUDSPETH, D. S. S. Phylogeny of the ascaridoidea (nematoda: ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. **J. Parasitol**. v. 86, n. 2, p. 380-393, 2000

NAKAMURA, K.; ABE, F. Respiratory (especially pulmonary) and Urinary Infections of *Cryptosporidium* in layer Chickens. **Avian Pathol.**, v. 17, p. 703 – 711, 1988

NEAL, R. A. Experimental studies on *Entamoeba* with reference to speciation. **Advances in parasitology**, v.4, p.1-51, 1966

NEMEJC, K.; LUKESOVA, D. Parasite Fauna of Ostriches, Emus and Rheas. **Agricultura tropica et subtropical**, v. 45, n. 1, 2012

NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 11^a ed. São Paulo: Atheneu; 2005. 494 p.

NEWMAN, L. J. Coccidiosis Control With Vaccine: Been There, Done that. Or Have we? In: Arkansas Poultry Symposium, 1999, Springdale. **Proceedings** Arkansas, p. 52-55, 1999

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

OLIVEIRA, A. A. **Nematódeos Gastrointestinais e *Cryptosporidium* spp. em Avestruzes (*Struthio camelus* L. 1758) do Pólo Regional do Paraguaçu, Estado da Bahia, e Fatores Associados à Transmissão.** 2009. 51 f. Tese de Mestrado – Universidade Federal da Bahia

OURO FINO (2012). *Ouro Fino* [ON LINE]. Disponível em: <www.ourofino.com.br>. Acesso em: 27 fev. 2012

PAGE, C. D. D. V. M; HADDAD, K. B. A. Coccidial Infections in Birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 4, n. 3, p.138-144, 1995

PAPINI, R.; GIRIVETTO, M.; MARANGI, M.; MANCIANTI, F.; GIANGASPERO, A. Endoparasite Infections in Pet and Zoo Birds in Italy. **The Scientific World Journal**. V. 2012, p. 1- 9, 2011

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

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, Diagnosis, Host Spectrum, Specificity and the Environment. **Rem. Klin. Mikrobiol**, v. 3, p. 290–301, 1999

PENHA, G. A.; SUZUKI, E. Y.; UEDA, F. S.; BOCARDO, M.; PERES, R. E. P. Coccidiose Aviária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n. 11, 2008

PENRITH, M. L.; BEZUIDENHOUT, A. J.; BURGER, W.P.; PUTTERILL, J.F. 1993. Evidence for cryptosporidial infection as a cause of prolapse of the phallus and cloaca in ostrich chicks (*Struthio camelus*). **Onderstepoort J. Vet. Res**, v. 61, p. 283-289

PENRITH, M. L.; BURGER, W. P. 1993. A *Cryptosporidium* sp. in an ostrich. **Jl. S. Afr. vet. Ass**, v. 64, p. 60-61

PEREIRA, D. A.; DAMIN, J.; LIMA, L. M.; ULIANO, R. W. *Isospora belli*: Aspectos Clínicos e Diagnóstico Laboratorial. **RBAC**, v. 41, n. 4, p. 283-286, 2009

PEREIRA, J. T. **Métodos de Desinfecção em Água Contendo *Cryptosporidium parvum* (apicomplexa: Cryptosporidiidae) e sua Detecção por Técnica de Biologia Molecular**. 2007. 104 f. Tese de Mestrado – Universidade Federal do Paraná

PEREIRA, M. G. C.; ATWILL, E. R.; BARBOSA, A. P. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás state, Brazil. **Ver. Inst. Med. Trop**. São Paulo. 2007; 49(3):139-45

PONCE-GORDO, F; HERRERA, S.; CASTRO, A. T.; DURÁN, B. G.; DÍAZ, R. A. M. Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. **Veterinary Parasitology**. V.107, p.137–160, 2002

PONCE-GORDO, F.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. Taxonomía y filogenia del género *Entamoeba*. Una revisión histórica. **Ver. Ibero-Latinoam. Parasitol.**, v. 69, n.1, p. 5-37, 2010

PONCE GORDO, F.; MARTINEZ DIAZ, R. A.; HERRERA, S. *Entamoeba struthionis* n.sp. (Sarcomastigophora: Endamoebidae) from ostriches (*Struthio camelus*) **Veterinary parasitology**, v. 119, p. 327 – 335, 2004

PROCTOR, E. M. Laboratory diagnosis of amebiasis. **Clin Lab Med**, v. 11, n.4, p. 829-859, 1991

QUEVEDO, A.; GRUBER, A. Diagnóstico Molecular da Coccidiose. **Avicultura Industrial**, v. 10, p. 44-45, 2004

RAVDIN, J. I. Amebiasis Human Infection by *E. histolytica*. Ed. John Wiley e Sons, p. 126-149, 1988

QUE, X.; REED, S.L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 2, p. 196-206, 2000

RESILIENCE SCIENCE (2012). *Resilience Science* [ON LINE]. Disponível em: <rs.resalliance.org>. Acesso em: 14 fev. 2012

REY, L. Bases da parasitologia médica. Ed. Guanabara Koogam, Rio de Janeiro. 2 ed. 2002

REY, L. Parasitologia e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Ed. Guanabara Koogam, Rio de Janeiro. 3 ed. 2001

RICKAR, L.G.; STEINOHRT, L.A.; BLACK, S.S. Subclinical cyathostomiasis and unidentifield helminthiasis in a juvenile emu (*Dromaius novaehollandiae*). **Avian diseases**, v. 41, p. 993-996, 1997

ROSA, F. G. D. I. Apostila de criação de avestruzes. Struthio Consult. 2003

ROSE, M. E.; HESKETH, P. *Eimeria tenella*: Localization of the Sporozoites in the Caecum of the Domestic Fowl. **Parasitology**, v. 102, p. 317 - 324, 1991

ROBERTSON, L. J.; CAMPBELL; A. T.; SMITH; H. V. Survival of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Under Various Environmental Pressures. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 58, p. 3494 – 3500, 1992

RYAN, U. *Cryptosporidium* in Birds, Fish and Amphibians. **Experimental Parasitology**, v. 124, p.113 – 120, 2010

RYAN, U.; XIAO, L. Avian Cryptosporidiosis. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, p. 395 – 418, 2008

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, p.103-117, 2004

SANTOS, M. M. A. B.; PEIRÓ, J. R.; MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: Clinical, Morphological and Molecular Studies.

Brazilian Journal of Poultry Science, v. 7, n. 2, p. 113 -117, 2005

SANTOS, R. F. S.; KAVAVATA, G. M.; ALMEIDA, S. M.; HISANO, M.; CALIXTO, L. F. L.; MEIRELES, M. V. Ocorrência de *Eimeria* sp. em Frangos de Corte de São Paulo. **Ars Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 230 - 234, 2003

SOGAYAR, .M.I.T.L; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D.P., **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v.22, p.203–208, 2006

SCHNITZLER, B. E.; THEBO, P. L.; TOMLEY, F. M.; UGGLA, A.; SHIRLEY, M. W. PCR Identification of Chicken *Eimeria*: a Simplified Read-out, **Avian Pathology**, v. 28, n. 1, p. 89–93, 1999

SHANE, S.M. Disease Prevention in Ostrich Production. **Bio-Tek Industries Inc.** Atlanta, Georgia, 32 f. 1994

SHIRLEY, M., W. Research on Avian Coccidia: Un Update. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 6, p. 479-499, 1992

SILVA, E. F.; GOMES, M. A. Parasitologia humana. 11 ed. Ed. Atheneu, São Paulo. 2005

SILVA, E. F.; NEVES, D. P. Parasitologia humana. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro. 9 ed. 1997

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

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of comparative Pathology*, v. 65, p. 262-266, 1955

SMITH, C. K.; LEE, D. E. Monosaccharide Transport by *Eimeria tenella* Sporozoites. **Journal of Parasitology**, v. 72, p. 163 - 169, 1986

SMITH, H. V.; CACCIÓ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Vet Parasitol.** V. 149, p. 29-40, 2007

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today**, v. 14, p. 14 - 22, 1998

SOARES, J. F.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; SILVA, M. K.; MARISCANO, G.; SALOMÃO, E. L.; MONTEIRO, S. G. Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. *Cienc. Rural.* v. 38, n.2, p. 23-24, Santa Maria, 2008

SOLEIRO, C. A. **Parasitos Gastrointestinais de Avestruzes (*Struthio camelus*) de Diferentes Idades e sua Ocorrência nas Épocas Seca e Chuvosa em um Criatório no Município de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro.** Seropédica, RJ. 2009. 42 f. Tese de Mestrado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SOTIRAKI, S. T., GEORGIADES, G., ANTONIADOU-SOTIRIADOU, K., HIMONAS, C. A. Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*). **Vet. Rec.** V.148, p. 84–86, 2001

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

SRÉTER, T.; SZÉLL, Z. The Low Sedimentation Speed of *Cryptosporidium* Oocysts: A Further Explanation for Waterborne Outbreaks. **J. Protozool. Res.** v. 8, p. 58–63, 1998

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in Birds – A Review. **Veterinary Parasitology.** v. 87, p. 261 - 279, 2000

STEWART, J.S. 1994. Ratites. In: B.W. RITCHIE, G.J. HARRISON, L.R. HARRISON (Eds.), Avian medicine: Principles and application. Wingers Publishing, Florida. USA.

SUKPRASERT, S.; RATTAPRASERT, P.; HAMZAH, Z.; SHIPIN, O. V.; CHAVALITSEWINKOON-PETMITR, A. 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

SVOBODOVÁ, M.; CIBULKOVÁ, M. *Isospora* sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in Icterine Warbler (*Hippolais icterina*, Passeriformes: Sylviidae): the Possibility of Parents to Nestlings Transmission. **Acta Protozool.** v. 34, p. 233–235, 1995

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. (2007): *Veterinary Parasitology*. 3rd edition, Blackwell Publishing, UK, 874 p.

TALLBIRD EMU (2012). *Tallbird Emu Farm* [ON LINE]. Disponível em: <www.tallbirdemu.com>. Acesso em: 14 fev. 2012

TAYLOR, D. W.; EVANS, C. B.; ALEY, S. B.; BARTA, J. R.; DANFORTH, H. D. Identification of an Apically-located Antigen that is Conserved in Sporozoan Parasites. **Protozool.** V. 37, p. 540-5, 1990

THEILER, A.; ROBERTSON, W., 1915. Investigations into the life history of the wireworm in ostriches. **Rep. Dir. Vet. Res.**, 3 (4), Department of Agriculture, United States of Africa, pp. 293–345

THOMPSON, R.C.A. 2002. Towards a better understanding of host specificity and the transmission of *Giardia*: The impact of Molecular epidemiology. In: OLSON, B.E., OLSON, M.E., WALLIS, P.M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. CAB International, Wallingford, UK, p. 55–69

THOMPSON, R. C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet Parasitol.** V.126, p.15-35, 2004

THOMPSON, R. C., MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology.** V. 58, p. 69–137, 2004

THOMPSON, R. C.; REYNOLDSON, J. A.; MENDIS, A. H. *Giardia* and giardiasis. **Advances in Parasitology.** V. 32, p. 71–160, 1993

TOLENTINO, A. C. V. **Avaliação de Infecção por Eimerídeos em Rebanhos Caprinos de Sete Lagoas, MG.** Belo Horizonte, MG. 1999. 49 f. Tese de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais

TORTUGA. Cuidado com a Coccidiose [ON LINE]. Disponível em: <www.farmpoint.com.br>. Acesso em: 14 fev. 2012

TULLY, T. N.; SHANE, S. M. Husbandry Practices as Related to Infections and Parasitic Diseases of Farmed Ratites. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 15, n. 1, p. 73–89, 1996

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. **Japan Internacional Cooperation Agency**, 4 ed. Tóquio, Japan, 143p. 1998

UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin Microbiol Ver.** v. 4, n. 1, p.150-164, 2001

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M. Parasitologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987

VERONENSIS, R.; FOCACCIAR, R. Tratado de infectologia. Editora Atheneu, São Paulo. 1997

VERWEIJ, J.J; ANTON, M.; POLDERMAN; CLARK, C.G. Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, p.1644-1646, 2001

WADE, J.R. 1992. Ratite pediatric medicine and surgery. **Proceedings of the Association of Avian Veterinarians:** 340–353

WIDMER, K. W.; OSHIMA, K. H.; PILLAI, S. D. Identification of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by an Artificial Neural Network Approach. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, n. 3, p. 1115 – 1121, 2002

WILLIAMS, R. B. Anticoccidial Vaccines for Broilers Chickens: Pathways to Success. **Avian Pathology**, v. 31, p. 317-353, 2002

WINTERFIELD, R.W.; THACKER, E. H.L. Verminous encephalitis in the emu. **Avian diseases.** v. 22, n. 2, p. 336- 339, 1977

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Amoebiasis. **Wkly Epidemiol Rec.** 1997; v. 72, p. 97-100

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. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 1578 – 1583, 1999

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clinical Microbiology Review**, v.17, n. 1, p.72-97, 2004

XIAO, L.; HERD, R. P. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Veterinary Parasitology**. V. 55, p. 257–262, 1994

XIAO, L.; SAEED, K.; HERD, R. P. 1996. Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. **Veterinary Parasitology** 61, 165–170

YAKIMOFF, W. L. *Isospora struthionis* n. sp., coccidie de l'autruche africaine. **Annales de Societe Belge de Medecine Tropical**, v. 20, p. 137-138, 1940

ZAJAC, A. M. Giardiasis. **The compendium Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 5, p. 604-11, 1992