

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Caracterização morfológica de larvas infectantes de
***Libyostrongylus douglassii* e *Libyostrongylus dentatus* (Nematoda,**
Trichostrongylidae) e adultos de *Codiostomum struthionis*
(Nematoda, Strongylidae) parasitas de
avestruzes, *Struthio camelus*

Nicole Brand Ederli

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE LARVAS INFECTANTES DE
Libyostrongylus douglassii E *Libyostrongylus dentatus* (NEMATODA,
TRICHOSTRONGYLIDAE) E ADULTOS DE *Codiostomum struthionis*
(NEMATODA, STRONGYLIDAE) PARASITAS DE
AVESTRUZES, *Struthio camelus*

NICOLE BRAND EDERLI

Sob a Orientação da Professora

Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues

e Co-orientação do Professor

Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de concentração em Parasitologia Veterinária.

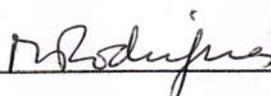
Seropédica, RJ
Fevereiro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

NICOLE BRAND EDERLI

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

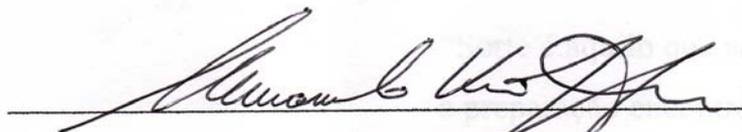
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13/02/2009



Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues. Ph.D. UFRRJ-(Orientadora)



Débora Henrique da Silva Anjos. Ph.D. UFRJ



Marcelo Knoff. Ph.D. Fiocruz

“Sorte é aquilo que acontece quando
a preparação encontra oportunidade.”

Autoria desconhecida

Ao

Meu filho Matheus, pelo carinho
e por ser a razão de minha luta
para atingir esta meta

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu filho Matheus Ederli Rezende, a quem eu amo demais, por entender o tempo em que não pude lhe dar a atenção merecida devido aos estudos, pelos momentos de alegria, pelos gestos de carinho nos momentos difíceis e por ser o motivo principal desta minha jornada;

À professora Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues pela orientação e paciência ao longo desses anos;

Ao professor, amigo e futuro orientador, Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira, a quem tenho sincera admiração, pela co-orientação, fundamental na realização deste trabalho, pela dedicação, atenção, paciência, confiança e apoio para atingir esta meta. Agradeço também por estar sempre presente e disposto a elucidar minhas dúvidas, por acreditar em mim, me dando força para seguir em frente e por ser tão importante em minha formação;

À minha mãe, Lucir Cléa Brand Ederli, pelo incentivo aos estudos, pela força, confiança e paciência que dedicou a mim durante todo o curso e pelo apoio emocional nesse período tão difícil do curso, e por cuidar muito bem de meu filhote, enquanto eu me dedicava na elaboração desta pesquisa;

À minha irmã Bianca Brand Ederli pelo apoio, atenção e paciência em esclarecer minhas dúvidas;

Às amigas Márcia Cavalcanti de Albuquerque, Michelle Daniele dos Santos, Cassandra Moraes Monteiro e Cíntia Lopes Schiffler pela amizade e apoio nos bons e maus momentos;

Ao grande amigo Murilo de Oliveira Bôa Morte pela amizade, apoio nas coletas, companheirismo e pelos momentos de descontração durante esta longa jornada;

Ao professor Carlos Wilson Gomes Lopes, pela contribuição nos trabalhos, sendo de fundamental importância;

À técnica Beatriz Ferreira Ribeiro e ao Professor Flávio Costa Miguens pela colaboração no processamento do material para microscopia eletrônica de varredura;

Um agradecimento especial a todos os colegas de turma que fizeram parte desta conquista, pelos momentos de alegria e de batalha, pela amizade, por tudo o que aprendi com

cada um deles, todos tão importantes que eu não poderia escolher apenas alguns nomes para citar;

Àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela ótima formação de pós-graduação;

Ao Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, onde a presente pesquisa foi realizada, pela utilização das instalações;

Ao CNPq e à FAPERJ pela concessão auxílios para a elaboração de projetos de pesquisa ao professor Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira, sendo fundamental na realização deste trabalho;

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

BIOGRAFIA

NICOLE BRAND EDERLI, filha de Jorge Luiz Ederli e Lucir Cléa Brand Ederli, nasceu em 28 de outubro de 1981, na cidade do Rio de Janeiro – RJ. Coursou o ensino fundamental e médio no Instituto São José – Salesiano, em Resende, RJ.

Em março de 2000, ingressou no curso de Agronomia, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, em Seropédica, RJ, porém em março de 2004, ingressou na forma de transferência no curso de bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, em Campos dos Goytacazes – RJ, graduando-se em setembro de 2006. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) na área de Parasitologia Veterinária, desde março de 2005 até o término do curso.

Foi admitida em março de 2007 no curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, na área de concentração Parasitologia Veterinária, no nível de mestrado, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, em Seropédica – RJ, com bolsa de estudos da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, submetendo-se a defesa de dissertação para a conclusão do curso em 13 de fevereiro de 2009, e já aprovada, em 1º lugar, no doutorado, no curso de Ciência Animal, Área de Concentração em Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, com bolsa de estudos da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

RESUMO

EDERLI, Nicole Brand. **Caracterização morfológica de larvas infectantes de *Libyostrongylus douglassii* e *Libyostrongylus dentatus* (Nematoda, Trichostrongylidae) e adultos de *Codiostomum struthionis* (Nematoda, Strongylidae) parasitas de avestruzes (*Struthio camelus*).** 2009. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

O presente trabalho tem como objetivo diferenciar larvas infectantes de *Libyostrongylus douglassii*, *L. dentatus* e *Codiostomum struthionis* permitindo o diagnóstico diferencial dessas espécies através de culturas fecais. Para isto, 10 avestruzes adultos foram abatidas, seus proventrículos e cecos removidos e coletado parasitas adultos. Fêmeas adultas *L. douglassii* e *L. dentatus* foram separadas em cinco amostras de 100 fêmeas cada. As amostras foram maceradas individualmente e misturadas com fezes secas esterilizadas e foi realizada cultura fecal padrão para obtenção de larvas infectantes. Parasitas adultos de *C. struthionis* recolhidos no ceco foram lavados em solução fisiológica (NaCl 0,09%), quantificados. Todos os parasitas foram fixados em A.F.A. para microscopia óptica e adultos de *C. struthionis* e larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. foram fixados em solução Karnovsky para microscopia eletrônica de varredura. Todos os proventrículos e 90% dos cecos analisados estavam parasitados por *Libyostrongylus* spp. e *C. struthionis*, respectivamente. É possível distinguir *L. douglassii* de *L. dentatus* e *C. struthionis* pela morfologia e comprimento da cauda da bainha que em *L. douglassii* é curta e com terminação aguda ao contrário das outras duas espécies que são longas e filamentosas. Para o diagnóstico diferencial entre *L. dentatus* e *C. struthionis* é mais confiável a utilização da morfologia da terminação da cauda da larva que, em *L. dentatus* apresenta uma protuberância arredondada na extremidade, caractere este não observado em *C. struthionis*. Assim, este continua sendo o melhor parâmetro para a diferenciação entre estas duas espécies de nematóides gastrintestinais das avestruzes. A diferenciação das larvas infectantes de *L. douglassii*, *L. dentatus* e *C. struthionis* através de culturas fecais irá facilitar o diagnóstico das espécies, por pesquisadores e criadores, favorecendo o conhecimento da biologia destes nematóides.

Palavras-chave: avestruzes, *Libyostrongylus* spp., *Codiostomum struthionis*.

ABSTRACT

EDERLI, Nicole Brand. **Morphological characterization of infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* and *Libyostrongylus dentatus* (Nematoda, Trichostrongylidae) and adults of *Codiostomum struthionis* (Nematoda, Strongylidae) parasite of ostriches (*Struthio camelus*).** 2009. 111p. Dissertation (Master Science in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The aim of this work was differentiate infective larvae of *Libyostrongylus douglassii*, *L. dentatus* and *Codiostomum struthionis* allowing the differential diagnosis of those species among fecal cultures. For this, 10 adult ostriches were slaughtered, their proventriculum and caeca were removed and adult parasites were collected. Females adults of *L. douglassii* and *L. dentatus* were separate in five samples of 100 females each. The samples were macerated individually and mixed with sterilized feces and culture fecal was performed to obtaining of infective larvae. Adults parasites of *C. struthionis* collected in the caeca were washed in saline solution (NaCl 0,09%) and quantified. All the parasites were fixed in A.F.A. for optical microscopy and adults of *C. struthionis* and infective larvae of *Libyostrongylus* spp. were fixed in Karnovsky solution for scanning electron microscopy. All proventriculum and 90% of the analyzed caeca were positive to the infection by *Libyostrongylus* spp. and *C. struthionis*, respectively. It is possible to distinguish *L. douglassii* of *L. dentatus* and *C. struthionis* by the morphology and length of the larvae sheath tail, that in *L. douglassii* is short and with acute ending different the other two species that are long and filamentous. For the differential diagnosis between *L. dentatus* and *C. struthionis* is more reliable the use of the morphology of the ending of the larvae tail that, in *L. dentatus* presents a knob in the extremity, this character is not observed in *C. struthionis*. Like this, this continues being the best parameter for the differentiation among these two species of gastrointestinal nematodes of the ostriches. The differentiation of the infective larvae of *L. douglassii*, *L. dentatus* and *C. struthionis* among fecal cultures will facilitate the diagnosis of this species, by researchers and breeders, favoring the knowledge of the biology of these nematodes.

Key-words: ostriches, *Libyostrongylus* spp., *Codiostomum struthionis*.

LISTA DE TABELAS

PARTE PRINCIPAL

Tabela 1.	Número de avestruzes abatidos nos principais países nos anos de 2005 e 2006. (AICHINGER et al., 2007)	6
------------------	---	---

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Estatística descritiva das medidas do comprimento total de larvas infectantes de <i>Libyostrongylus</i> spp. de avestruzes, <i>Struthio camelus</i>	32
------------------	--	----

Tabela 2.	Estatística descritiva das medidas de comprimento da cauda da bainha de larvas infectantes de <i>Libyostrongylus</i> spp. de avestruzes, <i>Struthio camelus</i>	34
------------------	--	----

Tabela 3.	Estatística descritiva da razão do comprimento total sobre o comprimento da cauda da bainha de larvas infectantes de <i>Libyostrongylus</i> spp. de avestruzes, <i>Struthio camelus</i>	36
------------------	---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1.	<i>Codiostomum struthionis</i> adultos coletados em cecos de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> , em abatedouro do Município de Quissamã-RJ, Brasil	59
------------------	--	----

Tabela 2.	Estatística descritiva das medidas de comprimento total de larvas infectantes de <i>Libyostrongylus douglassii</i> , <i>L. dentatus</i> e <i>Codiostomum struthionis</i> de Avestruzes, <i>Struthio camelus</i> pelo Teste de Tukey	77
------------------	---	----

Tabela 3.	Estatística descritiva das medidas de comprimento da cauda da bainha de larvas infectantes de <i>Libyostrogylus douglassii</i> , <i>L. dentatus</i> e <i>Codiostomum struthionis</i> de Avestruzes, <i>Struthio camelus</i> pelo Teste de Tukey	78
Tabela 4.	Estatística descritiva da razão do comprimento total sobre o comprimento da cauda da bainha de larvas infectantes de <i>Libyostrogylus douglassii</i> , <i>L. dentatus</i> e <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> pelo Teste de Tukey	79
Tabela 5.	Medidas em micrometros de machos de <i>Codiostomum struthionis</i> (Horst, 1885) Railliet e Henry, 1911 parasita de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> , médias com maior e menor medida entre parênteses	82
Tabela 6.	Medidas em micrometros de fêmeas de <i>Codiostomum struthionis</i> (Horst, 1885) Railliet e Henry, 1911 parasita de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> , médias com maior e menor medida entre parênteses	83

LISTA DE FIGURAS

PARTE PRINCIPAL

- Figura 1.** Distribuição do plantel nacional de avestruzes no ano de 2006 (AICHINGER et al., 2007) 5
- Figura 2.** Localização dos principais parasitas encontrado nas avestruzes. (Adaptado de Foreyt, 2005) 8

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Libyostrongylus douglassii* (conforme descrito por McKenna 2005) 19
- Figura 2.** Micrografia óptica de *Libyostrongylus* spp. de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Ovijetor de *L. douglassii*. Barra: 250 µm; **B.** Ovijetor de *L. dentatus*. Barra: 220 µm. Espaço entre as setas indicam o comprimento dos ovijetores 27
- Figura 3.** Micrografia óptica de *Libyostrongylus* spp. de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Cauda de uma fêmea de *L. douglassii*, com ausência de inchaço cuticular ao nível do ânus e ponta da cauda arredondada (seta). Barra: 125 µm; **B.** Cauda de uma fêmea de *L. dentatus*, com inchaço cuticular ao nível do ânus (ponta de seta), ponta da cauda digitiforme (seta) e fortemente curvada ventralmente. Barra: 110 µm 28

Figura 4.	Micrografia óptica de <i>Libyostrongylus</i> spp. de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Extremidade cefálica de <i>L. douglassii</i> ; B. Extremidade cefálica de <i>L. dentatus</i> , seta mostra presença de dentes proeminentes esofageais. Barras: 30 µm	29
Figura 5.	Micrografia óptica de larvas infectantes de <i>Libyostrongylus</i> spp. obtidas através de culturas fecais de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Extremidade posterior de larva infectante de <i>L. dentatus</i> . B. Extremidade posterior de larva infectante de <i>L. douglassii</i> . Setas evidenciam distância entre a ponta da cauda da larva e a ponta da cauda da bainha. Barras: 30 µm	30
Figura 6.	Desenho feito utilizando-se microscópio óptico acoplado a câmera clara de larvas infectantes de <i>Libyostrongylus</i> spp. obtidas através de culturas fecais de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Extremidade posterior de larva infectante de <i>L. dentatus</i> . B. Extremidade posterior de larva infectante de <i>L. douglassii</i> . Setas evidenciam distância entre a ponta da cauda da larva e a ponta da cauda da bainha. Barras: 30 µm	31
Figura 7.	Micrografia eletrônica de varredura de larvas infectantes de <i>Libyostrongylus</i> spp. obtidas através de culturas fecais de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Extremidade posterior de uma larva infectante de <i>L. dentatus</i> ; B. Extremidade posterior de uma larva infectante de <i>L. douglassii</i> . Barras: 30 µm	33
Figura 8.	Micrografia óptica de larvas infectantes de <i>Libyostrongylus</i> spp. obtidas através de culturas fecais de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Extremidade cefálica de larva infectante de <i>L. dentatus</i> . B. Extremidade cefálica de larva infectante de <i>L. douglassii</i> . Barras: 30 µm	35

CAPÍTULO II

Figura 1.	Esquema da nomenclatura dos raios da bolsa copuladora, segundo Durette-Desset e Chabaud (1981)	55
Figura 2.	Esquema dos diferentes tipos de bolsa copuladora, segundo a organização dos raios da bolsa (Durette-Desset; Chabaud, 1981). A. Tipo 2-1-2, raios 2 e 3, e raios 5 e 6 agrupados e raio 4 isolados; B. Tipo 1-3-1, raios 2 isolados e raios 3 a 5 agrupados e raios 6 isolados; C. Tipo 2-2-1, raios 2 e 3 e raios 4 e 5 agrupados e raios 6 isolados; D. Tipo 2-3, raios 2 e 3 e raios 4 a 6 agrupados; E. Tipo 3-2, raios 2 a 4 e raios 5 e 6 agrupados	56
Figura 3.	Porção final da luz do ceco de uma avestruz, <i>Struthio camelus</i> . Exemplares de machos e fêmeas de <i>Codiostomum struthionis</i> à fresco na mucosa cecal. Barra: 6 mm	60
Figura 4.	Micrografia óptica de ovo de <i>Codiostomum struthionis</i> , típico de Strongylidae. Barra: 30 μ m	61
Figura 5.	Larvas infectantes de <i>Codiostomum struthionis</i> , de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Micrografia óptica da extremidade anterior; B. Micrografia óptica da extremidade posterior; C. Desenho feito utilizando-se microscópio óptico acoplado à câmara clara da extremidade posterior. Setas evidenciam distância entre a ponta da cauda da larva e a ponta da cauda da bainha. Barras: 30 μ m	62

Figura 6.	Desenhos feitos utilizando-se microscópio óptico acoplado à câmera clara de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Extremidade cefálica, evidenciando a estrutura do esôfago, cápsula bucal, e posição do anel nervoso. Barra: 300 µm; B. Vista apical desenhada com base em micrografia eletrônica de varredura, evidenciando a estrutura da abertura oral, distribuição das papilas cefálicas e anfídeos e coroa frangeada. Barra: 50 µm; C. Cápsula bucal evidenciando coroa frangeada e anel cuticular na extremidade. Barra: 100 µm; D. Extremidade posterior de uma fêmea, evidenciando útero, ovijetor, vulva (v) e abertura do ânus (a), e ponta da cauda em formato de espinho. Barra: 300 µm; E. Espículos e gubernaculo de um macho. Barra: 200 µm; F. Bolsa copuladora de um macho mostrando a organização dos raios da bolsa. Barra: 100 µm; G. Gubernaculo em vista lateral de um macho. Barra: 30 µm; H. Gubernaculo em vista ventral de um macho. Barra: 30µm	64
Figura 7.	Micrografia óptica de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . Extremidade anterior mostrando estrutura do esôfago, cápsula bucal, anel nervoso e válvula esôfago-intestinal. Barra: 300µm	65
Figura 8.	Micrografia óptica de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . Cápsula bucal evidenciando coroa frangeada e anel cuticular na extremidade cefálica. Barra: 100 µm	66
Figura 9.	Micrografia eletrônica de varredura de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . Extremidade cefálica, evidenciando abertura oral (Ao), anfídeos (seta), papilas cefálicas (pontas de seta), coroa frangeada (Cf) e anel cefálico (Ac). Barra: 100 µm	67
Figura 10.	Micrografia óptica de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Bolsa copuladora de um macho, vista ventral; B. Bolsa copuladora de um macho, vista lateral. Barras: 200 µm	68

Figura 11.	Micrografia óptica de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . Raio dorsal da bolsa copuladora de um macho. Barra: 200 µm	69
Figura 12.	Micrografia óptica de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Gubernaculo de um macho, vista ventral; B. Gubernaculo de um macho, vista lateral. Barras: 30µm	71
Figura 13.	Micrografia óptica de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . Cone genital de um macho. Barra: 50 µm	72
Figura 14.	Micrografia óptica de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Extremidade posterior de uma fêmea com inflação cuticular ao nível da vulva (seta), evidenciando vulva (v) e abertura do ânus (a); B. Extremidade posterior de uma fêmea sem inflação cuticular ao nível da vulva, evidenciando vulva (v) e abertura do ânus (a). Barras: 200 µm	73
Figura 15.	Micrografia eletrônica de varredura de <i>Codiostomum struthionis</i> de avestruzes, <i>Struthio camelus</i> . A. Extremidade posterior de uma fêmea sem inflação cuticular ao nível da vulva, evidenciando ponta da cauda em forma pontiaguda, abertura do ânus (a) e vulva (v). Barra 100 µm; B. Extremidade posterior de uma fêmea com inflação cuticular ao nível da vulva (seta), mostrando abertura do ânus (a) e vulva (v). Barra: 200 µm	74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A Avestruz	3
2.2. Principais Nematóides Gastrintestinais das Avestruzes	7
2.3. Controle Sanitário	9
CAPÍTULO I - DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA DE LARVAS INFECTANTES DE <i>Libystrongylus douglassii</i> (Cobbold, 1882) Lane, 1923 E <i>L. dentatus</i> Hoberg, Lloyd e Omar, 1995 (NEMATODA, TRICHOSTRONGYLIDAE)	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1.1. INTRODUÇÃO	14
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	15
1.2.1. Histórico	15
1.2.2. Larvas Infectantes de <i>Libystrongylus</i> spp	15
1.2.3. Epidemiologia.....	16
1.2.4. Especificidade de Hospedeiro	17
1.2.5. Ciclo de Vida e Desenvolvimento	17
1.2.6. Longevidade e Sobrevivência	20
1.2.7. Diagnóstico e Patologia	21
1.3. MATERIAL E MÉTODOS	23
1.3.1. Coleta de Nematóides Adultos	23
1.3.2. Obtenção de Larvas Infectantes de <i>Libystrongylus douglassii</i> e <i>L. dentatus</i> ...	23
1.3.3. Microscopia Óptica	24

1.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura	24
1.3.5. Análise Estatística	25
1.4. RESULTADOS	26
1.5. DISCUSSÃO	37
1.6. CONCLUSÕES	39
1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE <i>Codiostomum struthionis</i> (Horst, 1885) Railliet e Henry, 1911 (NEMATODA, STRONGYLIDAE)	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47
2.1. INTRODUÇÃO	48
2.2. REVISÃO DE LITERATURA	49
2.2.1. Histórico	49
2.2.2. Considerações Gerais	49
2.2.3. Morfologia	50
2.2.4. Diagnóstico	51
2.2.5. Epidemiologia	51
2.3. MATERIAL E MÉTODOS	52
2.3.1. Nematóides Adultos.....	52
2.3.2. Larvas Infectantes	53
2.3.3. Microscopia óptica e Medidas dos Nematóides Adultos	54
2.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura	54
2.3.5. Análise Estatística	57
2.4. RESULTADOS	58
2.4.1. Caracterização de Larvas Infectantes	58
2.4.2. Caracterização dos Adultos de <i>Codiostomum struthionis</i>	63
2.4.2.1. Depósito dos espécimes representativos	63
2.4.2.2. Descrição geral	63
2.4.2.3. Machos	63
2.4.2.4. Fêmeas	73

2.5. DISCUSSÃO	76
2.5.1. Larvas Infectantes	76
2.5.2. Adultos	81
2.6. CONCLUSÕES	85
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
3. CONCLUSÕES GERAIS	89
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	90
ANEXOS	96
Artigos Referentes à Dissertação de Mestrado	97

EDERLI, N.B.; OLIVEIRA, F.C.R.; LOPES, C.W.G.; DAMATTA, R.A.; SANTOS, C.P.; RODRIGUES, M.L.A. Morphological diagnosis of infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 and *L. dentatus* Hoberg, Lloyd and Omar, 1995 (Nematoda: Trichostrongylidae) of ostriches. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 323-327, 2008. 98

EDERLI, N.B.; OLIVEIRA, F.C.R.; RODRIGUES, M.L.A. Further study of *Codiostomum struthionis* (Horst, 1885) Railliet and Henry, 1911 (Nematoda, Strongylidae) parasite of ostriches (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) (Aves, Struthioniformes). **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 275-283, 2008. 103

1. INTRODUÇÃO GERAL

A criação comercial de ratitas, principalmente as avestruzes, *Struthio camelus*, vem ganhando grande importância econômica em diversas regiões do Brasil pela boa adaptação das aves e potencial lucrativo. A introdução e a produção de avestruzes no Brasil tiveram início na década de 90 e hoje estima-se que o rebanho ultrapasse as 400 mil aves. Mesmo com as dificuldades que surgiram decorrentes da falta de conhecimento técnico, a avicultura tornou-se um mercado promissor sendo alvo de grandes investidores principalmente nas regiões Nordeste, Centro-oeste e Sudeste do país (ACAB, 2007).

A avicultura no Estado do Rio de Janeiro cresce à medida que novos, pequenos e grandes produtores procuram esta prática, estimulada pela criação de abatedouros especializados localizados nos municípios de Três Rios e Quissamã.

Uma variedade de espécies pode parasitar as avestruzes, incluindo protozoários, trematódeos, *Philophthalmus gralli*, cestóides, *Houttuynia struthionis*, nematóides, *Libyostrongylus* spp. e *Codiostomum struthionis*, e artrópodes ectoparasitos.

Com exceção de *H. struthionis*, todos os outros parasitas apresentam ciclo de vida direto, o que facilita sua transmissão entre o rebanho e a disseminação entre outras propriedades.

Existem poucos estudos a respeito das parasitoses que acometem as avestruzes. Uma variada fauna de parasitas pode incidir estas aves, dentre as quais os helmintos possuem representantes importantes que limitam o desenvolvimento da avicultura, como é o caso do *Libyostrongylus* spp., nematóides gastrintestinais, provocando mortalidade acima de 50% em aves juvenis e está presente de maneira enzoótica nos rebanhos comprometendo a produtividade e ocasionalmente, em infecções graves em indivíduos adultos, pode levar à morte estas aves.

Codiostomum struthionis é outro nematóide diagnosticado nas avestruzes, não havendo estudos sobre sua morfologia, patogenicidade e efeitos sobre o parasitismo na produtividade das criações.

Estudos sobre infecções parasitárias são importantes na medida em que abrem caminho para a geração de conhecimento sobre estas enfermidades e de recursos humanos especializados, o que ajudará no processo de controle visando um aumento na produtividade.

O presente trabalho teve como objetivo a descrição morfológica dos principais nematóides parasitas das avestruzes encontrados no Estado do Rio de Janeiro, permitindo a diferenciação morfológica das larvas infectantes de *L. douglassii*, *L. dentatus* e *C. struthionis* e a caracterização morfológica e ultraestrutural dos adultos de *C. struthionis*, visto a ausência de estudos a respeito do assunto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Avestruz

As avestruzes, *Struthio camelus*, são aves pertencentes ao grupo das ratitas, assim como as emas, *Rhea americana*, os kiwis, *Apteryx* spp., os cassuares, *Casuarius casuarius* e os emús, *Dromaius novaehollandiae*. Essas aves são classificadas como ratitas, termo originado do latim *ratis*, que significa canoa, pela aparência do osso esterno que é achatado e pode ser utilizado para se defender nas brigas contra outros machos. A avestruz é herbívora, monogástrica e de estômago simples, sendo a maior ave viva na natureza (HUCHZERMEYER, 2005). É um animal de atividade diurna, criado em grupos quando jovens e para o abate, e em casais ou trios quando em reprodução (AICHINGER et al., 2007). A espécie *S. camelus* é subdividida em cinco diferentes subespécies: *S. camelus camelus*, *S. camelus massaicus*, *S. camelus molybdophanes*, *S. camelus australis* e *S. camelus syriacus*. As raças hoje conhecidas partiram de cruzamentos entre as subespécies, que ocupam regiões específicas do continente africano. As principais raças comercializadas são a African Black, Red Neck e Blue Neck. Entre elas a de maior importância comercial é a African Black (*S. camelus* var. *domesticus*), cujo processo de seleção teve início em 1863 tendo como principais características selecionadas a docilidade, o menor porte, produção de grande quantidade de plumas de boa qualidade e maior área da pele, para a produção de couro (CARRER; KORNFELD, 1999).

Estas aves podem atingir uma altura máxima de três metros, e pesando cerca de 150 kg. Os machos adultos são pretos e brancos, enquanto que as fêmeas são castanhas pardas. Cada fêmea bota 60 ovos por ano em média, produzindo até 20 filhotes por ano. Os ovos medem entre 15 e 20 cm pesam de 1 a 2 kg e sua incubação dura 42 dias. Os animais estão prontos para o abate com 15 meses de idade, pesando em torno de 100 kg, com aproveitamento de 30 kg de carne, 1,4 m² de couro, além das plumas. A carne da avestruz é vermelha, macia, é uma excelente fonte de ferro, ômega 3, ômega 6 e ômega 9, é menos

calórica, comparada às outras espécies, e contém baixos índices de colesterol e gorduras. A vida produtiva de uma fêmea é de 30 a 35 anos e seu início de postura acontece aos dois anos de idade. Já o macho inicia sua vida reprodutiva aos dois anos e meio de idade. A expectativa de vida das avestruzes é de 65 a 70 anos (ACAB, 2007). Embora o couro e a carne sejam as maiores fontes de lucro, as plumas representam excelente abertura no mercado brasileiro, onde 15 toneladas/ano são importadas para festas populares.

A exploração das avestruzes teve início entre os séculos 16 e 17 no continente africano com a finalidade de fornecer plumas para a realeza (BLACK, 2001). A estrutiocultura foi iniciada, na África do Sul, no fim do século XIX visando também à obtenção de plumas de forma padronizada. Com o tempo o interesse pelo couro e pela carne cresceu progressivamente (HUCHZERMEYER, 2002). Atualmente os maiores países criadores de avestruzes são: África do Sul, Israel, Austrália, Canadá, Estados Unidos, Itália, Espanha, França e China (ACAB, 2007).

A exploração racional da avestruz no Brasil teve seu início em 1995, quando começaram as primeiras importações de aves provenientes dos Estados Unidos e Espanha. Mesmo com as dificuldades que surgiram decorrentes da falta de conhecimento técnico, a estrutiocultura tornou-se um mercado promissor sendo alvo de grandes investidores. Os principais motivos desta escolha é que para a implantação de uma estrutiocultura não há necessidade de grandes extensões de terra, a reprodutividade é alta (uma fêmea pode gerar 20 pintos por ano) e o animal, ao ser abatido, possui grande versatilidade de produtos. O Brasil conta com um rebanho de aproximadamente 400 mil aves (Figura 1), 3.200 criadores, 29 associações estaduais e regionais, 25 cooperativas e respectivas federações regionais, com a maior concentração nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Estima-se que sua plena industrialização deva ocorrer nos próximos três anos (ACAB, 2007). O Brasil é o segundo maior produtor de avestruzes a nível mundial, ficando atrás apenas da África do Sul, país de onde a avestruz é originária e se destaca como o quinto país com o maior número de aves abatidas no ano de 2006 (Tabela 1) (AICHINGER et al., 2007).

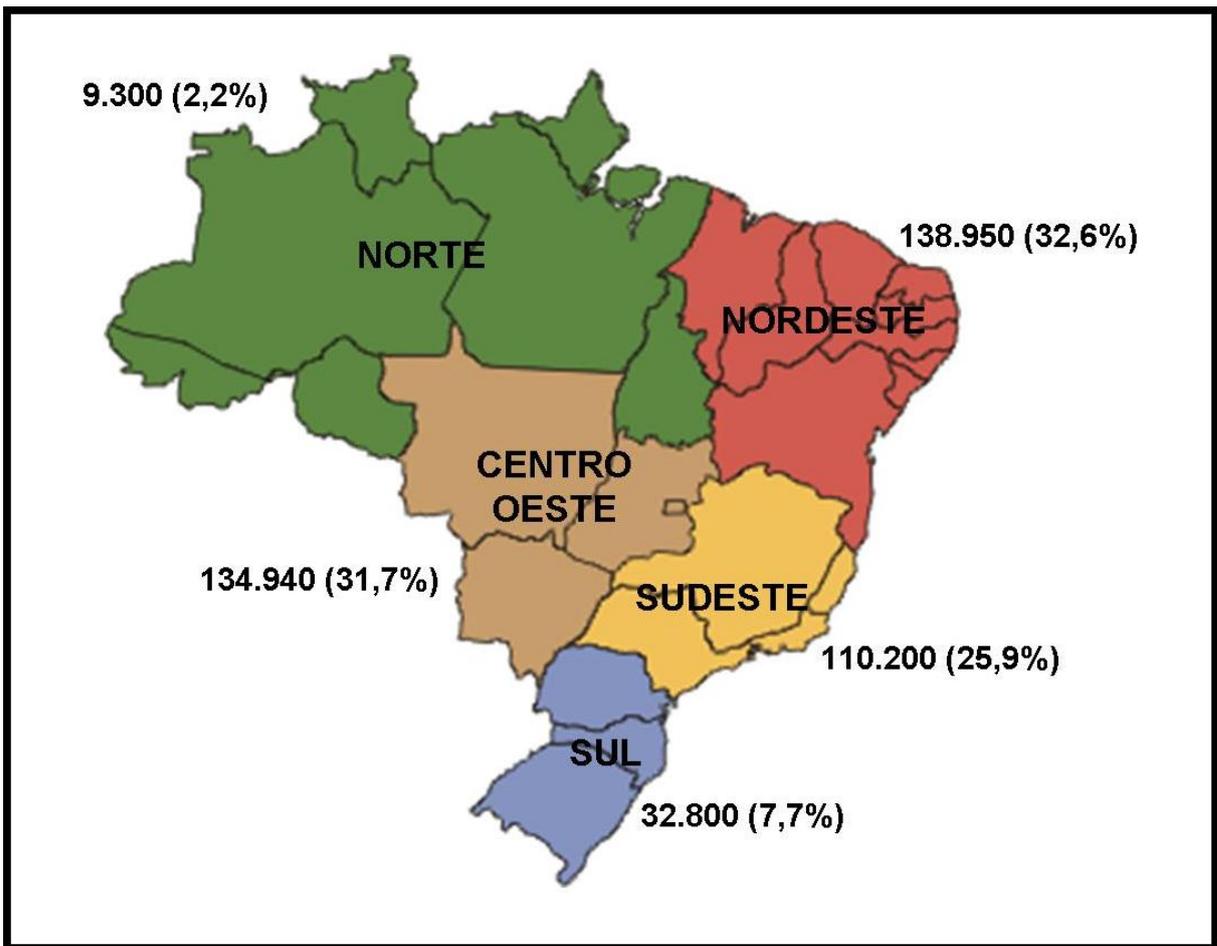


Figura 1. Distribuição do plantel nacional de avestruzes no ano de 2006 (AICHINGER et al., 2007).

Tabela 1. Número de avestruzes abatidos nos principais países nos anos de 2005 e 2006. (AICHINGER et al., 2007).

PAÍS	AVES ABATIDAS (2005)	AVES ABATIDAS (2006)
África do Sul	150.000	200.000
China	50.000	100.000
Austrália	12.000	22.500
Zimbabwe	20.000	20.000
BRASIL	1.774	14.306
EUA	10.000	13.500
Hungria	8.000	12.000
Israel	10.000	10.000
Filipinas	5.000	7.500
Espanha	7.000	7.000
Total	273.774	406.806

2.2. Principais Nematóides Gastrintestinais das Avestruzes

Uma variada fauna de helmintos pode ser encontrada parasitando as avestruzes (Figura 2). Segundo Huchzermeyer (2005), apenas *Libyostrongylus* spp. e *Houttuynia struthionis* são considerados primariamente específicos das avestruzes. No entanto, Zettermann et al. (2005) encontraram *H. struthionis* parasitando emas de vida livre em pesquisa realizada no Pantanal do Mato Grosso do Sul no Brasil. *Codiostomum struthionis* também pode ser encontrado no ceco das avestruzes, mas sem causar patologia aparente (HUCHZERMEYER, 2005).

Nematóides do gênero *Libyostrongylus* pertencem à família Trichostrongylidae, com coloração vermelha amarelada em vida (SOULSBY, 1982). Por ser hematófago é considerado patogênico para os animais. Localiza-se logo abaixo da membrana do proventrículo, enquanto as formas jovens penetram profundamente nas glândulas proventriculares, onde residem e obstruem os ductos, causando uma severa irritação, resultando em proventriculite difterítica (CRAIG; DIAMOND, 1996). A patologia causada por ele é denominada “vrotmaag”, que causa o apodrecimento do estômago, sendo responsável pela mortalidade de mais de 50% das aves juvenis na África do Sul (REINECKE, 1983).

O gênero *Libyostrongylus* é composto por três espécies, *L. douglassii*, *L. dentatus* e *L. magnus*, caracterizadas por diferenças morfológicas dos adultos. Dessas, *L. douglassii* é considerada a mais patogênica (HOBERG et al., 1995) sendo o principal parasita de avestruzes nos trópicos (MUKARATIRWA et al., 2004). É considerado um nematóide resistente às mudanças ambientais, resistindo à extremos de temperatura (JANSSON et al., 2002). Apenas *L. douglassii* e *L. dentatus* foram descritos fora do continente africano (HOBERG et al., 1995). Infecções mistas entre estas duas espécies são comuns (HOBERG et al., 1995; MCKENNA, 2005).

Libyostrongylus douglassii tem ciclo de vida direto, típico dos Trichostrongilideos, com um período de pré-patência de aproximadamente 36 dias (THEILER; ROBERTSON, 1915, *apud* MCKENNA, 2005).

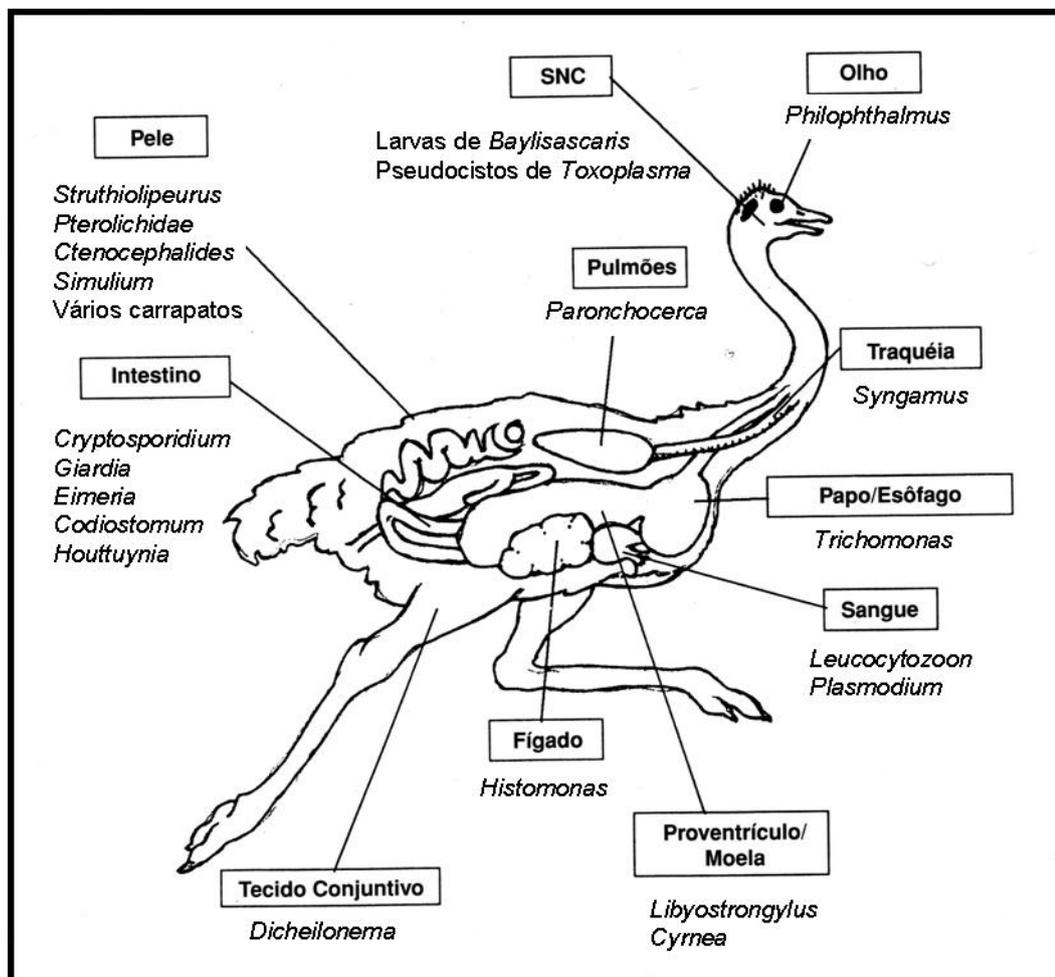


Figura 2. Localização dos principais parasitas encontrado nas avestruzes. (Adaptado de Foreyt, 2005).

O diagnóstico da infecção por *Libyostrongylus* sp. é feito a partir da detecção de sinais clínicos e pela presença de ovos típicos de Tricostrongilídeos em amostras fecais colhidas dos animais ou através da observação de vermes adultos no proventrículo durante a necropsia das aves (COOPER, 2005). Os ovos típicos de Tricostrongilídeos medem aproximadamente 72 x 41 µm e não podem ser diferenciados dos ovos de *C. struthionis* que são aparentemente idênticos (BARTON; SEWARD, 1993).

Os sinais clínicos incluem: anorexia, perda de peso, anemia (BARTON; SEWARD, 1993), enfraquecimento generalizado da musculatura, letargia (MUKARATIRWA et al., 2004) e retardamento do desenvolvimento (SOULSBY, 1982).

2.3. Controle Sanitário

Provavelmente *Libyostrongylus* spp. foi introduzido no Brasil durante a importação de avestruzes a partir da década de 1990 devido a um sistema deficiente de controle e fiscalização sanitária dos animais importados.

Tanto os animais importados quanto os animais que serão transferidos de propriedade devem ser submetidos a exames para detecção de parasitoses e caso positivo, devem ser submetidos a tratamento anti-helmíntico antes da saída da propriedade de origem. Após a chegada ao local de destino esses animais devem ser mantidos em quarentena por cinco semanas (BARTON; SEWARD, 1993). Durante o período de quarentena as fezes devem ser coletadas e descartadas a cada dois dias (BARTON; SEWARD, 1993), impedindo o desenvolvimento dos ovos até o estágio de larvas infectantes.

Se após o período de quarentena, os exames para detecção de ovos nas amostras de fezes dos animais forem negativos, as aves podem ser introduzidas seguramente ao restante do rebanho, caso contrário, deve ser aplicado outro anti-helmíntico, e o animal deve permanecer em quarentena (BARTON; SEWARD, 1993).

Em propriedades onde o parasita já esteja presente, deve-se manter as aves jovens longe dos adultos e dos pastos infectados (MCKENNA, 2005). Como nos pastos contaminados as larvas em estágio de desenvolvimento podem estar presentes por um longo período, sugere-se que o pasto seja semeado ou pastado por outros animais por, preferencialmente, dois anos (CRAIG; DIAMOND, 1996). Deve ser realizado regularmente o tratamento anti-helmíntico para ajudar a reduzir a contaminação e aliviar os efeitos da infecção (MCKENNA, 2005) e as propriedades deveriam enviar rotineiramente amostras

fecais para análises laboratoriais para verificação da presença de parasitas (MUKARATIRWA et al., 2004).

Antes da administração de anti-helmínticos, deve-se realizar um exame para determinar se há ou não infecção, a fim de se evitar gastos desnecessários e resistência nos nematóides ao anti-helmíntico utilizado (CRAIG; DIAMOND, 1996).

Uma prática muito utilizada por algumas propriedades é o fornecimento de fezes de avestruzes adultos para os filhotes, com o intuito de estabilizar a flora intestinal (BUTTON et al., 1993). Esta prática não é recomendada devido ao rápido desenvolvimento dos ovos à larva infectante, aumentando assim os riscos de transmissão de infecções. (MCKENNA, 2005). Caso o proprietário queira insistir nesta prática deve utilizar fezes de animais saudáveis com idade inferior a um mês, pois é mais provável de estarem livres da infecção (BUTTON et al., 1993).

A disseminação de nematóides em avestruzes é favorecida pelo: (a) ciclo de vida direto do parasita, (b) falta de conhecimento adequado no manejo dos animais e em controle parasitológico entre os produtores, e (c) comércio dos animais sem verificação de parasitismo (PONCE GORDO et al., 2002).

Parasitas com ciclo de vida direto são mais facilmente transmitidos. O melhor procedimento para se evitar as infecções e subsequente perdas, é a prevenção da introdução dos parasitas no rebanho (CRAIG; DIAMOND, 1996).

Como medidas de biossegurança, devem-se evitar a criação de outras aves na mesma propriedade (COOPER, 2005), pois, o potencial de transmissão cruzada entre outras aves, especialmente entre outras ratitas, ainda não foi determinado (HOBERG et al., 1995). No Brasil, sugere-se manter os criatórios de avestruzes o mais distante possível de criatórios de emas a fim de se evitar a possível contaminação dessas ratitas endêmicas (BONADIMAN et al., 2006).

CAPÍTULO I

DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA DE LARVAS INFECTANTES DE *Libyostrogylus douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 E *Libyostrogylus dentatus* Hoberg, Lloyd e Omar, 1995 (NEMATODA, TRICHOSTRONGYLIDAE)

RESUMO

EDERLI, Nicole Brand. **Caracterização morfológica de larvas infectantes de *Libyostrongylus douglassii* e *Libyostrongylus dentatus* (Nematoda, Trichostrongylidae) e adultos de *Codiostomum struthionis* (Nematoda, Strongylidae) parasitas de avestruzes, *Struthio camelus***. 2009. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A diferenciação das espécies do gênero *Libyostrongylus* só é possível com a obtenção dos parasitas adultos do proventrículo ou moela das avestruzes. O presente trabalho confirma que é possível diferenciar as larvas infectantes de *L. douglassii* e *L. dentatus*, permitindo o diagnóstico diferencial dessas espécies através de culturas fecais. Para isto, 10 avestruzes foram abatidas, seus proventrículos removidos e espécimes de fêmeas adultas de ambas as espécies foram coletadas e separadas em cinco amostras de 100 fêmeas cada. As amostras foram maceradas individualmente e misturadas com fezes secas esterilizadas e foi realizada cultura fecal padrão. As larvas infectantes recuperadas foram identificadas, quantificadas e medidas. Todos os proventrículos analisados estavam parasitados por *Libyostrongylus* spp. e observou-se uma localização diferencial de ambas as espécies no proventrículo. As larvas infectantes das culturas fecais com macerados de *L. douglassii* apresentaram uma média do comprimento total de $874.3 \pm 33.80 \mu\text{m}$, e cauda da bainha da larva curta ($29.5 \pm 4.11 \mu\text{m}$) com terminação aguda. As larvas infectantes das culturas fecais com macerados de *L. dentatus* apresentaram uma média do comprimento total de $856.0 \pm 43.63 \mu\text{m}$ e cauda da bainha da larva longa ($61.2 \pm 9.52 \mu\text{m}$) com terminação filamentosa. As médias das medidas das caudas da bainha das larvas de ambas as espécies apresentaram diferença estatística significativa. A diferenciação das larvas infectantes de *L. douglassii* e *L. dentatus* através de culturas fecais irá facilitar o diagnóstico de ambas as espécies, favorecendo o conhecimento da biologia destes nematóides.

Palavras-Chave: *Libyostrongylus douglassii*, *Libyostrongylus dentatus*, *Struthio camelus*.

ABSTRACT

EDERLI, Nicole Brand. **Morphological characterization of infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* and *Libyostrongylus dentatus* (Nematoda, Trichostrongylidae) and adults of *Codiostomum struthionis* (Nematoda, Strongylidae) parasite of ostriches, *Struthio camelus*.** 2009. 111p. Dissertation (Master Science in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The differentiation of the species of the *Libyostrongylus* genus is only possible with the obtainment of the adult parasites in the ostriches proventriculus and gizzard. The present work confirms that it is possible to differentiate the infective larvae of *L. douglassii* and *L. dentatus* allowing the differential diagnosis of these species by fecal culture. For that, 10 adult ostriches, were slaughtered, the proventriculus removed, and adult females specimens from both species collected and separated in five samples of 100 females each. The samples were macerated individually and mixed to sterilized feces for standard fecal cultures. The infective larvae were recovered, identified, quantified and measured. All proventriculus analyzed were parasitized by *Libyostrongylus* spp. and a clear heterogeneous location for both species was observed. The infective larvae from the fecal cultures of macerated of *L. douglassii* presented a mean total length of $874.3 \pm 33.80 \mu\text{m}$, short sheath tail ($29.5 \pm 4.11 \mu\text{m}$) with acute termination. The infective larvae from the macerated *L. dentatus* presented mean total length of $856.0 \pm 43.63 \mu\text{m}$, long sheath tail ($61.2 \pm 9.52 \mu\text{m}$) with filamentous termination. The mean measure of the tails of both species had a significant difference. The differentiation of the infective larvae of *L. douglassii* and *L. dentatus* by fecal cultures will facilitate the diagnosis of both species further helping the understanding of the *Libyostrongylus* biology.

Keywords: *Libyostrongylus douglassii*, *Libyostrongylus dentatus*, *Struthio camelus*.

1.1. INTRODUÇÃO

Nematóides do gênero *Libystrongylus* são pequenos vermes hematófagos, encontrados logo abaixo da membrana do proventrículo de avestruzes. Pertencentes a família Trichostrongylidae são responsáveis pela mortalidade de mais de 50% das aves juvenis e ocasionalmente adultos (REINECKE, 1983). O gênero é composto pelas espécies *L. douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923, *L. dentatus* Hoberg, Lloyd e Omar, 1995 e *L. magnus* Gilbert, 1937. Destes, apenas as duas primeiras espécies foram encontradas parasitando avestruzes no Brasil (EDERLI et al. 2008) e infecções mistas entre estas espécies são comuns (HOBERG et al., 2005). O diagnóstico da infecção por *Libystrongylus* spp. é feito a partir da detecção dos sinais clínicos que incluem anorexia, perda de peso, anemia e impactação do conteúdo proventricular (HUCHZERMEYER, 2005), e pela presença de ovos típicos de Strongylidae nas fezes com subsequente realização de cultivos fecais para a diferenciação das larvas infectantes que se assemelham com as de *Codiostomum struthionis* ou através da observação e identificação de vermes adultos no proventrículo durante necropsia (BARTON; SEWARD, 1993; COOPER, 2005).

Até o momento a diferenciação entre as espécies do gênero *Libystrongylus* é possível apenas pela caracterização dos adultos, sendo necessário a coleta destes durante a necropsia do proventrículo ou moela. Estudos realizados por Bonadiman et al. (2006) indicaram diferenças morfológicas na cauda da bainha das larvas infectantes obtidas através de culturas fecais, através de microscopia óptica e eletrônica de varredura, sugerindo possíveis diferenças entre as duas espécies. Esta hipótese se confirmada poderia ser usado para o diagnóstico diferencial de *L. douglassii* e *L. dentatus*, uma vez que foram notificadas infecções mistas nos rebanhos da região analisada (EDERLI et al., 2008). O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as diferenças morfológicas de larvas infectantes de *L. douglassii* e *L. dentatus*, permitindo o diagnóstico destas espécies pela cultura fecal, e assim, possibilitar o estudo de suas prevalências separadamente.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Histórico

Em 1880, nematóides foram coletados do proventrículo de uma avestruz na África do Sul, por Arthur Douglass e enviadas ao Dr. Cobbold que identificou os vermes e em homenagem à quem o coletou, denominou-a *Strongylus douglassii* (COBBOLD, 1882). Posteriormente, Lane (1923), estabeleceu o gênero *Libyostrongylus* para alguns Tricostrongilídeos africanos, com *L. douglassii* como espécie tipo de avestruzes, e *L. hebreanicus* Lane, 1923 em gorilas. Gilbert (1937) descreve uma nova espécie denominando-a *L. magnus*, sendo esta até hoje encontrada apenas em avestruzes do continente africano. Nesta espécie, as fêmeas são menores que os machos. Como *L. douglassii* e *L. hebreanicus* diferem na estrutura das bifurcações terminais do raio dorsal e no padrão dos raios laterais (raios 3-5) da bolsa copuladora, Ortlepp (1939) estabeleceu o gênero *Paralibyostrongylus*, sendo *P. wondwei* Ortlepp, 1939 a espécie tipo e *P. hebreanicus* e *P. nigeriae* Baylis, 1928, inclusas no novo gênero (HOBERG et al., 1995). Hoberg et al. (1995), descreveram uma outra espécie do gênero *Libyostrongylus*, que em decorrência da presença de dentes esofageais proeminentes, denominou-a *L. dentatus*. Assim, o gênero *Libyostrongylus* é composto por três espécies: *L. douglassii*, *L. magnus* e *L. dentatus*.

1.2.2. Larvas Infectantes de *Libyostrongylus* spp.

As larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. têm comprimento médio de 830 µm, 16 células intestinais triangulares e uma característica típica que é a presença de uma protuberância na ponta da cauda (BARTON; SEWARD, 1993), que se assemelha a ponta de um cotonete, com aproximadamente 4 µm de diâmetro à 23 µm da ponta da cauda da bainha da larva (CRAIG; DIAMOND, 1996). Foram observadas nas regiões Norte e Baixada

Litorânea do Estado do Rio de Janeiro diferenças no comprimento da cauda da bainha das larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp., cauda longa e cauda curta, sugerindo que essas características podem distinguir duas espécies deste gênero (BONADIMAN et al., 2006), uma vez que nestas regiões foram encontrados durante a necropsia de três avestruzes espécimes adultos de *L. douglassii* e *L. dentatus* parasitando o proventrículo destes animais (EDERLI et al., 2008).

1.2.3. Epidemiologia

Libyostrongylus spp. foi originalmente descrito na África do Sul por Cobbold em 1882, podendo ser endêmico ou comum do sul da África (HOBERG et al., 1995). *L. douglassii* é considerado o primeiro nematóide Tricostrongilideo patogênico encontrado no proventrículo de avestruzes (JANSSON et al., 2002).

Atualmente o gênero *Libyostrongylus* está amplamente distribuído pelo mundo, sendo relatado na África do Sul (REINECKE, 1993; MALAN et al., 1988; FOCKEMA et al., 1985), Austrália (BUTTON et al., 1996; MORE, 1996; BARTON; SEWARD, 1993), Estados Unidos (HOBERG et al., 1995), Itália (PINTORI et al., 2000), Escócia (PENNYCOTT; PATTERSON, 2001), Espanha, Bélgica, Portugal e Holanda (PONCE GORDO et al., 2002), Suécia (JANSSON et al., 2002), Nova Zelândia (MCKENNA, 2005; MACKERETH, 2004), Zimbábwe (MUKARATIRWA et al., 2004) e Brasil, nos Estados de São Paulo (GOMES et al., 2002), Rio de Janeiro (BONADIMAN et al., 2004, 2006; EDERLI et al., 2008) e Rio Grande do Sul (MOREIRA et al., 2007). Houve um relato da presença de ovos típicos de Strongilideos em amostras fecais de avestruzes na Grécia, provavelmente pertencentes ao gênero *Libyostrongylus* em 43% das amostras analisadas. A cultura das fezes não foi realizada para distinguir se os ovos encontrados eram de *Libyostrongylus* spp. ou *Codiostomum struthionis* (SOTIRAKI et al., 2001), sendo assim, esta ocorrência não pode ser confirmada.

Provavelmente, *Libyostrongylus* spp. foi introduzido no Brasil, a partir das avestruzes importadas da Espanha e Estados Unidos durante a década de 1990, estando atualmente distribuído pelo país. No Estado de São Paulo foi notificado que 78% dos animais investigados apresentaram infecções com ovos típicos de Strongilideos e larvas com as características típicas do gênero *Libyostrongylus* (GOMES et al., 2002). Nas regiões Norte e

Baixada Litorânea do Estado do Rio de Janeiro, cinco das seis (83,3%) propriedades investigadas apresentaram o parasita (BONADIMAN et al., 2006).

1.2.4. Especificidade de Hospedeiro

Embora houver relato de um caso de ocorrência deste nematóide no emú (*Dromaius novaehollandiae*) na Suécia (JANSSON; CHRISTENSSON, 2000, *apud* PONCE GORDO et al., 2002), o gênero *Libyostrongylus* parece apresentar especificidade de hospedeiro, sendo parasita exclusivo das avestruzes. No entanto, o potencial de transmissão cruzada para outras aves domésticas e em particular outras ratitas, ainda não foi determinado (HOBERG et al., 1995; MCKENNA, 2005).

Análises feitas por Zettermann et al. (2005) para a detecção de helmintos em emas no Estado de São Paulo, Brasil, mostraram que nenhuma das oito emas adultas de vida livre e doze emas juvenis de cativeiro apresentaram infecções por *Libyostrongylus* spp. Nas emas analisadas foram encontradas outras sete espécies de parasitas. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de transmissão de *Libyostrongylus* spp. para a ema com a chegada das avestruzes no Brasil.

1.2.5. Ciclo de Vida e Desenvolvimento

Os dados sobre o ciclo de vida de *Libyostrongylus* spp. refere-se apenas a *L. douglassii*, que apresenta ciclo de vida direto, típico dos Trichostrongilidae, com um período de pré-patência de aproximadamente 36 dias (THEILER; ROBERTSON, 1915, *apud* MCKENNA, 2005) (Figura 1). Os ovos são eliminados nas fezes do hospedeiro infectado, se desenvolvem no ambiente em larvas de primeiro (L₁), segundo (L₂) e terceiro (L₃) estágio (larva infectante). Isto ocorre a uma temperatura mínima de 7-10 °C e máxima de 37 °C. As larvas infectantes possuem geotropismo negativo e tendem a subir para a ponta da vegetação através da camada de umidade (MCKENNA, 2005). Abaixo das condições ótimas de temperatura (36 °C) o desenvolvimento até a larva de terceiro estágio ocorre em aproximadamente 60 horas (BARTON; SEWARD, 1993).

A avestruz se infecta ingerindo a larva infectante (L₃), que se desenvolve a larva de quarto estágio (L₄) no interior do proventrículo num período de 4 a 5 dias. Após aproximadamente 20 dias, torna-se larva juvenis e após seu amadurecimento ocorre a cópula e a liberação dos ovos pode ser observada por volta de 33 dias após a ingestão da larva infectante no proventrículo. São necessários aproximadamente 4 dias para os ovos surgirem nas fezes do hospedeiro (MCKENNA, 2005).

Os nematóides imaturos penetram profundamente nas glândulas proventriculares, enquanto que os adultos parasitam a superfície da mucosa, onde sugam o sangue causando inflamação severa. A invasão das glândulas do proventrículo causa proventriculite difterítica e impactação, e como consequência ocorre fermentação do conteúdo proventricular. Os sinais clínicos da infecção aguda incluem anemia, anorexia, perda de peso, debilidade e morte do animal (MCKENNA, 2005).

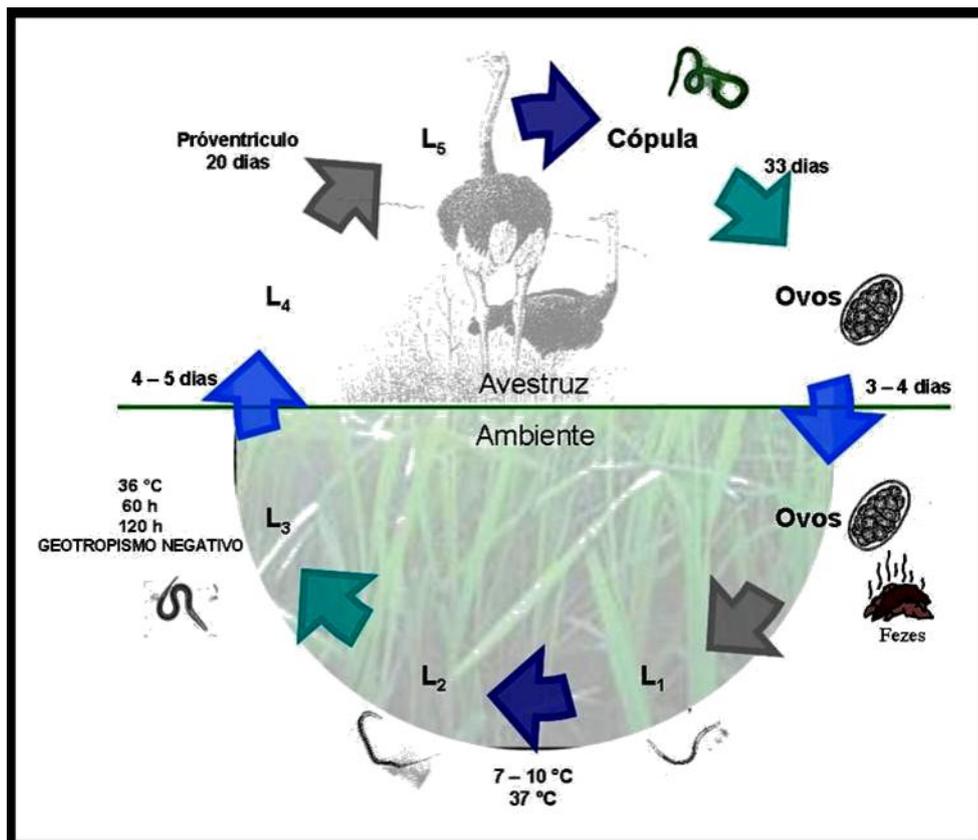


Figura 1. Ciclo de vida de *Libyostrongylus douglassii*. (EDERLI, 2006).

1.2.6. Longevidade e Sobrevivência

Avestruzes adultas bem nutridas podem manter elevada carga parasitária sem apresentar sinais clínicos (BARTON; SEWARD, 1993), podendo viver assim por vários anos. Esta tolerância indica, provavelmente, grande adaptabilidade do animal adulto a este parasita. Durante este período, uma ave aparentemente saudável elimina em média 2000 ovos por grama de fezes. Levando-se em conta que uma avestruz adulta excreta por volta de 1.750 gramas de fezes por dia, estima-se que uma única ave infectada pode eliminar 3,5 milhões de ovos de *Libyostrongylus* spp. por dia (MCKENNA, 2005).

Os ovos e as larvas de primeiro estágio de *Libyostrongylus* spp. presentes nas fezes podem sobreviver à dessecação por até 30 dias, podendo amadurecer na presença de umidade enquanto que as larvas infectantes podem sobreviver, abaixo das condições naturais, por aproximadamente 14 meses (BARTON; SEWARD, 1993). A luz solar direta é letal para as larvas de primeiro estágio desprotegidas, por outro lado, as larvas infectantes, em dias claros, saem das fezes em decomposição e vão rapidamente para o solo (MCKENNA, 2005). Segundo Jansson et al. (2002), os ovos podem sobreviver à dessecação por três anos podendo amadurecer quando re-hidratados. As larvas infectantes continuam vivas durante nove meses de dessecação. Os ovos acondicionados em fezes sob refrigeração (0,0° a 7,8°C) podem manter-se viáveis por até três meses e as larvas infectantes refrigeradas em água por 11 dias (BARTON; SEWARD, 1993).

A duração das infecções dos pastos é maior se as fezes presentes permanecerem intactas. As chuvas e forças mecânicas desprotegem os ovos em desenvolvimento e as larvas, impedindo que alcancem o estágio infectante (CRAIG; DIAMOND, 1996). Em baixas temperaturas, o desenvolvimento das larvas é apenas retardado, não cessando durante o inverno, mas as larvas mantidas em freezer (temperatura de -20°C) morrem (JANSSON et al., 2002).

Os ovos e as larvas de *Libyostrongylus* spp. resistem às altas temperaturas da África do Sul e continuam viáveis durante o frio intenso do inverno na Suécia (JANSSON et al., 2002). Desta forma, o clima do Brasil, por ser um país tropical, é favorável para o desenvolvimento e disseminação de *Libyostrongylus* spp. por todo o ano.

1.2.7. Diagnóstico e Patologia

O diagnóstico da infecção por *Libyostrongylus* spp. é feito a partir da detecção de sinais clínicos e pela presença de ovos típicos de strongilídeos em amostras fecais colhidas dos animais ou através da observação de vermes adultos no proventrículo durante a necropsia (COOPER, 2005). Os sinais clínicos incluem: anorexia, perda de peso, anemia (BARTON; SEWARD, 1993), enfraquecimento generalizado da musculatura, letargia (MUKARATIRWA et al., 2004) e retardamento do desenvolvimento (SOULSBY, 1982).

Em infecções graves, os vermes são claramente visíveis a olho nu, logo abaixo da membrana do proventrículo durante a necropsia, enquanto que em infecções leves é necessária a observação utilizando-se uma lupa (MCKENNA, 2005). Para confirmar a presença de *Libyostrongylus* spp., os vermes recolhidos podem ser comparados com as descrições já publicadas (HOBERG et al., 2005; EDERLI et al., 2008).

A presença de ovos nas fezes pode ser quantificada pela concentração de ovos por grama de fezes (OPG) através da técnica modificada Gordon e Withlock (1939). Os ovos típicos de strongilídeos medem aproximadamente 72 x 41 µm e não podem ser diferenciados dos ovos de *C. struthionis* que são aparentemente idênticos (BARTON; SEWARD, 1993), sendo o diagnóstico diferencial feito através de culturas fecais e morfologia das larvas infectantes.

As larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. apresentam uma protuberância arredondada na ponta da cauda da larva, sendo este caractere diagnóstico do gênero *Libyostrongylus* (BARTON; SEWARD, 1993). As larvas infectantes de *C. struthionis*, por outro lado, possuem cauda da bainha maior e parecida com um chicote, típico dos strongilídeos (PONCE GORDO et al., 2002; CRAIG; DIAMOND, 1996).

Embora as aves adultas bem nutridas aparentem tolerar alta carga parasitária sem mostrar sinais clínicos da doença, os níveis de infecção que devem interferir nos processos fisiológicos normais dessas aves ainda não foram determinados (MUKARATIRWA et al., 2004). A infecção pode persistir por vários anos sem comprometer a vida do animal (MCKENNA, 2005).

Os parasitas imaturos de *Libyostrongylus* spp. fazem escavações na camada de revestimento interno do proventrículo (membrana coileia) e da moela, causando uma reação inflamatória grave (HUCHZERMEYER, 2005), e penetram profundamente no lúmen das glândulas proventriculares (SOULSBY, 1982), causando proventriculite difterítica, tendo como seqüelas comuns a impactação e fermentação do conteúdo proventricular (MCKENNA,

2005). Os adultos vivem na superfície epitelial (mucosa) do proventrículo sugando o sangue e causando severa irritação (SOULSBY, 1982).

À necropsia são encontradas lesões características no proventrículo, onde este se encontra dilatado, com necrose severa. A mucosa se apresenta inchada e coberta com grande quantidade de muco consistente, podendo chegar à 10 mm. A mucosa se descama em pedaços e pseudomembranas podem estar presentes, recobrando áreas hemorrágicas. Os vermes podem ser encontrados dentro e abaixo do muco e das pseudomembranas (SOULSBY, 1982).

Estudos histopatológicos realizados por Bastianello et al. (2005) revelaram múltiplas erosões da mucosa, infiltração heterofílica associada a mucosa subjacente à lâmina própria, membrana coilina e às glândulas, necrose multifocais e fibrose. Observaram também hiperplasia das células mucosas das glândulas da submucosa e inúmeros fragmentos de nematóides inseridos na membrana coilina, lâmina da mucosa e glândulas da submucosa.

Em infecções severas, os vermes rompem a membrana que reveste o proventrículo, expondo a mucosa à ação das secreções gástricas, bactérias e fungos, resultando na aparência de apodrecimento da superfície interna do estômago (HUCHZERMEYER, 2002), assim, a libiostrongilose é conhecida como “vrotmaag”, que quer dizer apodrecimento do estômago. Não há relatos publicados sobre mudanças no padrão hematológico nas infecções por *Libyostrongylus* spp. (FUDGE, 1996).

1.3. MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1. Coleta de Nematóides Adultos

Dez avestruzes adultos de ambos os sexos foram abatidos no município de Quissamã, no Estado do Rio de Janeiro, e seus proventrículos foram separados do restante do aparelho digestivo e após a retirada de seu conteúdo estes foram acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados, armazenados em caixas isotérmicas e encaminhadas ao Setor de Clínica Média dos Grandes Animais Domésticos do Hospital Veterinário, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Espécimes do gênero *Libyostrongylus* foram coletados do proventrículo com auxílio de estereomicroscópio, que depois de lavados foram mantidos em solução fisiológica (NaCl 0,09%) em temperatura ambiente até a separação por espécies e sexos.

1.3.2. Obtenção de Larvas Infectantes de *Libyostrongylus douglassii* e *L. dentatus*

Logo após a coleta dos vermes adultos, separou-se as fêmeas de *L. douglassii* das de *L. dentatus*, com base nos seguintes caracteres morfológicos: comprimento do ovijetor; comprimento total do corpo e presença ou ausência de inchaço cuticular ao nível do ânus e de dentes proeminentes esofageais (HOBERG et al., 1995; EDERLI et al., 2008).

Separou-se cinco amostras contendo 100 fêmeas adultas com ovos presentes no interior do ovijetor de cada espécie, em tubos tipo Falcon contendo 4 ml de solução fisiológica (NaCl 0,09%) em temperatura ambiente.

As fêmeas de cada amostra foram maceradas em gral com pistilo. Aos macerados foram adicionados os 4 ml da solução fisiológica onde as fêmeas eram mantidas, dois gramas de maravalha e fezes secas esterilizadas de ovinos até a obtenção de umidade ideal de cultura. Essa mistura foi transferida para um copo plástico descartável com capacidade para 50 ml,

previamente identificados. Os copos plásticos contendo as amostras foram incubados em caixas plásticas contendo fina camada de água destilada ao fundo e coberta com filme plástico para prevenir a perda de umidade durante 10 dias à temperatura de 25 – 27 °C. Após a incubação, cada copo plástico foi preenchido com água destilada, sobre este foi colocada uma placa de Petri descartável de 65 mm de diâmetro, seguindo-se a inversão do conjunto copo-placa. Às placas de Petri foram adicionados 10 ml de água destilada e após 4 horas as larvas infectantes que migraram do copo para a placa foram pipetadas. Estas foram acondicionadas em tubo tipo Falcon de 15 ml e armazenadas sob refrigeração. Após 24 horas, as larvas presentes no sedimento foram identificadas, quantificadas e medidas. A identificação das larvas do gênero *Libyostrongylus* foi feita de acordo com os critérios estabelecidos por Barton e Seward (1993), utilizando-se microscópio óptico Zeiss - Axiostar Plus equipado com câmera digital Canon - PowerShot A640 para captura de imagem e Software Zeiss AxionVision Sample Images para análise de imagens sob aumento de 100 e 400 vezes.

1.3.3. Microscopia Óptica

Para Microscopia óptica os nematóides foram fixados em A.F.A. quente (70 °C) por 24 horas e transferidos posteriormente para uma solução contendo álcool 70°GL (90%) e glicerina (10%). Os parasitas foram clarificados em glicerina, montados entre lâmina e lamínula e observados ao microscópio óptico com captura de imagens Zeiss - Axiostar Plus.

1.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os nematóides foram fixados por 2 horas em solução Karnovski contendo 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído recém preparado, 5 mM cloreto de Cálcio pH 7,4 em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7.2, lavados em tampão cacodilato 0,1 M e pós-fixados em solução contendo 2% tetróxido de ósmio, 5 mM cloreto de Cálcio e 0,8 ferrocianeto de Potássio em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 1 hora e lavados novamente em tampão cacodilato 0,1 M. As amostras foram desidratadas em série crescente com acetona à 30, 50, 70 e 90% por uma hora cada, seguida de três repetições também de uma hora em acetona à 100%, secadas no aparelho de ponto crítico com dióxido de Carbono (CO₂), montados em

suporte para MEV com fita de carbono e aterradas com cola de prata, metalizadas em ouro e observadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss 962, operado com 15 Kv.

1.3.5. Análise Estatística

As medidas do comprimento total, comprimento da cauda da bainha e da razão entre o comprimento total e o comprimento da cauda da bainha das larvas infectantes de *L. douglassii* e *L. dentatus* foram submetidos à análise descritiva, definindo-se os valores médios, os desvios padrões, erros padrões e os valores mínimos e máximos. As médias foram comparadas utilizando-se o teste *t* de Student. A correlação entre o comprimento total e o comprimento da cauda da bainha foi estimada pelo coeficiente de correlação de Pearson (SAMPAIO, 2007). Todos os cálculos foram feitos utilizando-se o programa Graph Pad InStat Copyright 1992-2000. Graph Pad Software, versão 3-05 for Windows.

1.4. RESULTADOS

Todos os proventrículos analisados apresentaram infecções mistas por *L. douglassii* (Figuras 2 a, 3 a, 4 a) e *L. dentatus* (Figuras 2 b, 3 b, 4 b). Os nematóides foram encontrados logo abaixo da membrana do proventrículo. *L. douglassii* foi localizado mais superficialmente e abaixo da membrana, enquanto que *L. dentatus* encontrava-se enovelado e inserido na membrana coilina.

As larvas de ambas as culturas apresentaram a terminação da cauda com uma protuberância semelhante a um cotonete (Figuras 5 e 6), conforme descrito por Barton e Seward (1993) e comprimentos totais médios de $957,90 \pm 33,80 \mu\text{m}$ e $941,01 \pm 43,63 \mu\text{m}$ para *L. douglassii* e *L. dentatus*, respectivamente (Tabela 1).

Todas as larvas provenientes das culturas realizadas com as fêmeas adultas maceradas de *L. douglassii* tinham cauda da bainha curta com medidas médias de $36,31 \pm 4,11 \mu\text{m}$ e terminação aguda (Figuras 5, 6 e 7), enquanto que as larvas de *L. dentatus* apresentaram cauda da bainha longa com medidas médias de $84,01 \pm 9,52 \mu\text{m}$ (Tabela 2) e terminação filamentosa (Figuras 5, 6 e 7).

A extremidade cefálica das larvas infectantes de *L. douglassii* foi menos arredondada e se afina mais abruptamente, comparada com a extremidade das larvas infectantes de *L. dentatus* (Figura 8).

O maior e menor valor observados na razão do comprimento total sobre o comprimento da cauda da bainha das larvas infectantes de *L. douglassii* e *L. dentatus* foram de 42,38 e 23,25; 20,32 e 10,81 respectivamente (Tabela 3).

Não foram observadas correlações notáveis entre o comprimento total da larva e o comprimento da cauda da bainha ($r = 0,42$ (0,19 a 0,61) e ($r = 0,13$ (-0,13 a 0,37) para *L. dentatus* e *L. douglassii*, respectivamente.

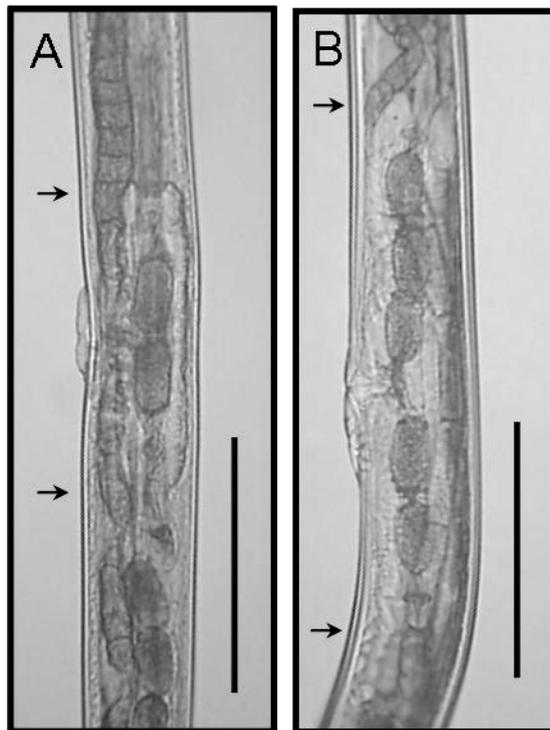


Figura 2. Micrografia óptica de *Libyostrongylus* spp. de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Ovidutor de *L. douglassii*. Barra: 250 µm; **B.** Ovidutor de *L. dentatus*. Barra: 220 µm. Espaço entre as setas indicam o comprimento dos ovidutores.

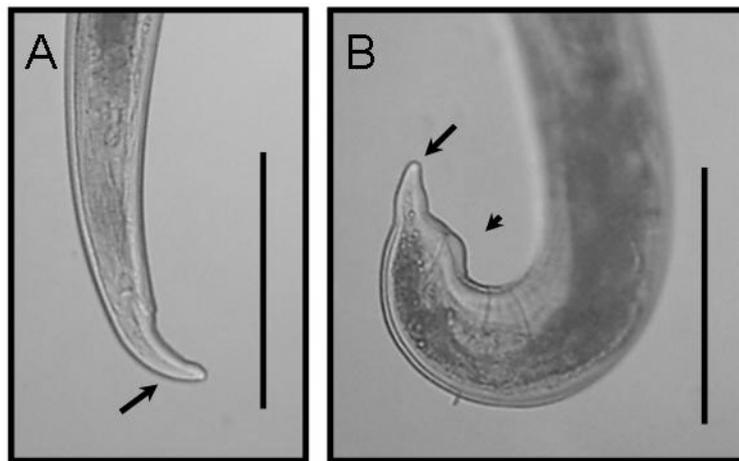


Figura 3. Micrografia óptica de *Libyostrongylus* spp. de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Cauda de uma fêmea de *L. douglassii*, com ausência de inchaço cuticular ao nível do ânus e ponta da cauda arredondada (seta). Barra: 125 μm ; **B.** Cauda de uma fêmea de *L. dentatus*, com inchaço cuticular ao nível do ânus (ponta de seta), ponta da cauda digitiforme (seta) e fortemente curvada ventralmente. Barra: 110 μm

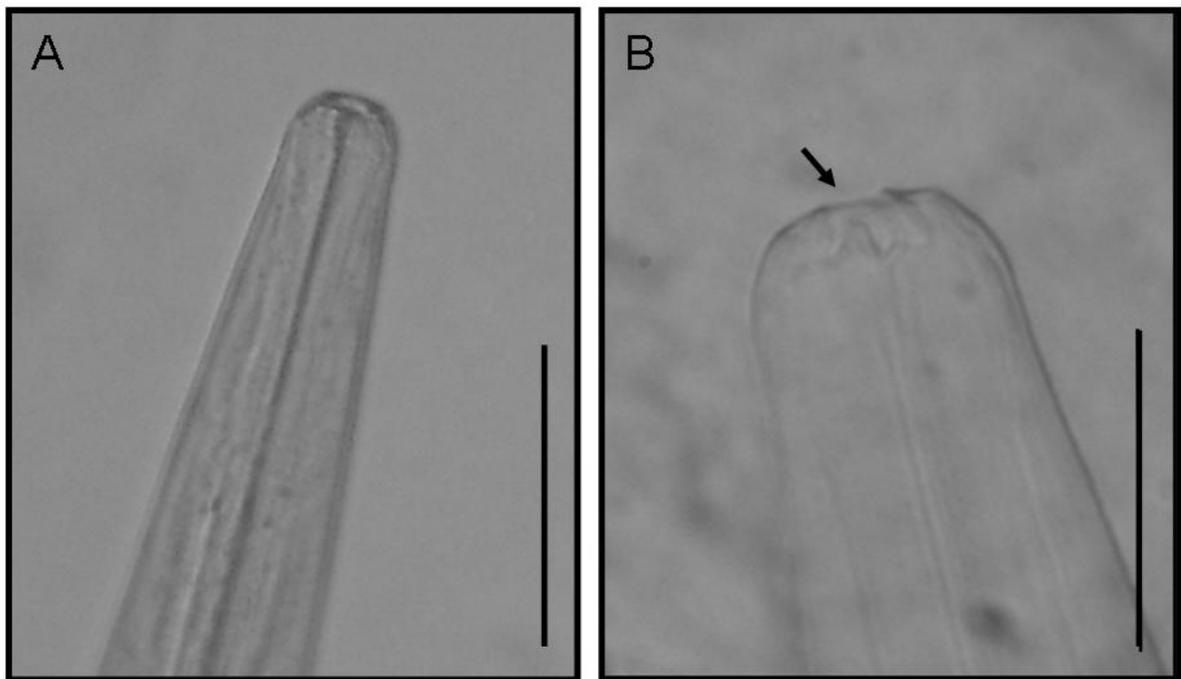


Figura 4. Micrografia óptica de *Libyostrongylus* spp. de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Extremidade cefálica de *L. douglassii*; **B.** Extremidade cefálica de *L. dentatus*, seta mostra presença de dentes proeminentes esofageais. Barras: 30 μ m

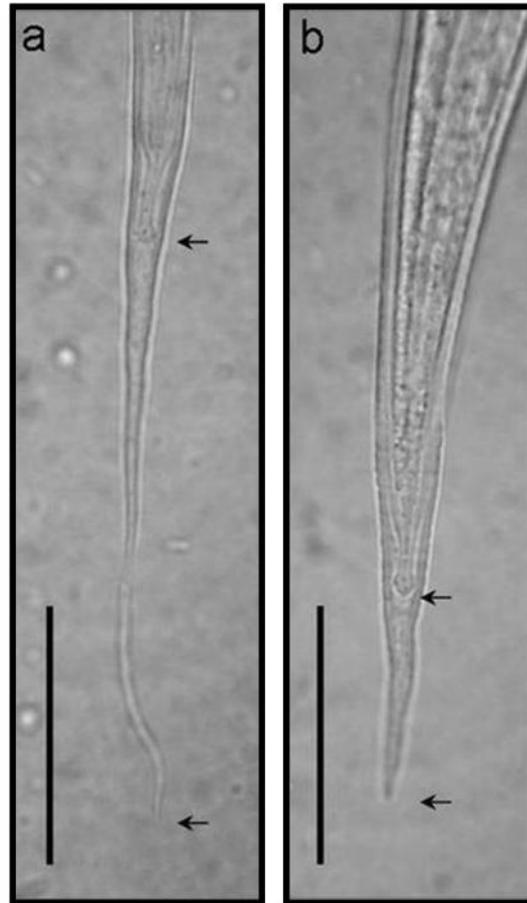


Figura 5. Micrografia óptica de larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. obtidas através de culturas fecais de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Extremidade posterior de larva infectante de *L. dentatus*. **B.** Extremidade posterior de larva infectante de *L. douglassii*. Setas evidenciam distância entre a ponta da cauda da larva e a ponta da cauda da bainha. Barras: 30 μm .

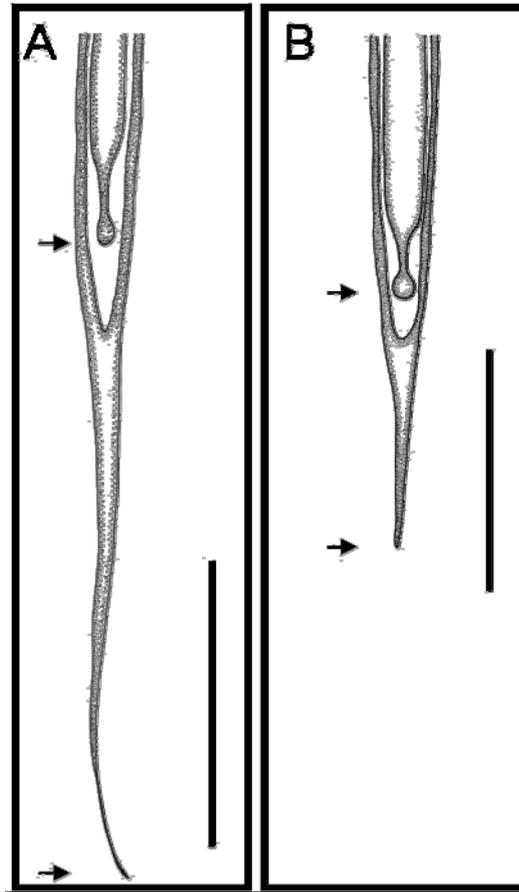


Figura 6. Desenho feito utilizando-se microscópio óptico acoplado a câmera clara de larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. obtidas através de culturas fecais de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Extremidade posterior de larva infectante de *L. dentatus*. **B.** Extremidade posterior de larva infectante de *L. douglassii*. Setas evidenciam distância entre a ponta da cauda da larva e a ponta da cauda da bainha. Barras: 30 μm .

Tabela 1. Estatística descritiva das medidas do comprimento total de larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. de avestruzes, *Struthio camelus*.

Parâmetros	Espécies	
	<i>L. douglassii</i>	<i>L. dentatus</i>
Número amostral	58	60
Menor medida (µm)	875,35	861,78
Maior medida (µm)	957,90	941,01
Média	874,33	856,04
Desvio Padrão	33,80	43,63
Erro padrão	4,44	5,63
Valor de P (Teste <i>t</i>)	0,0124	

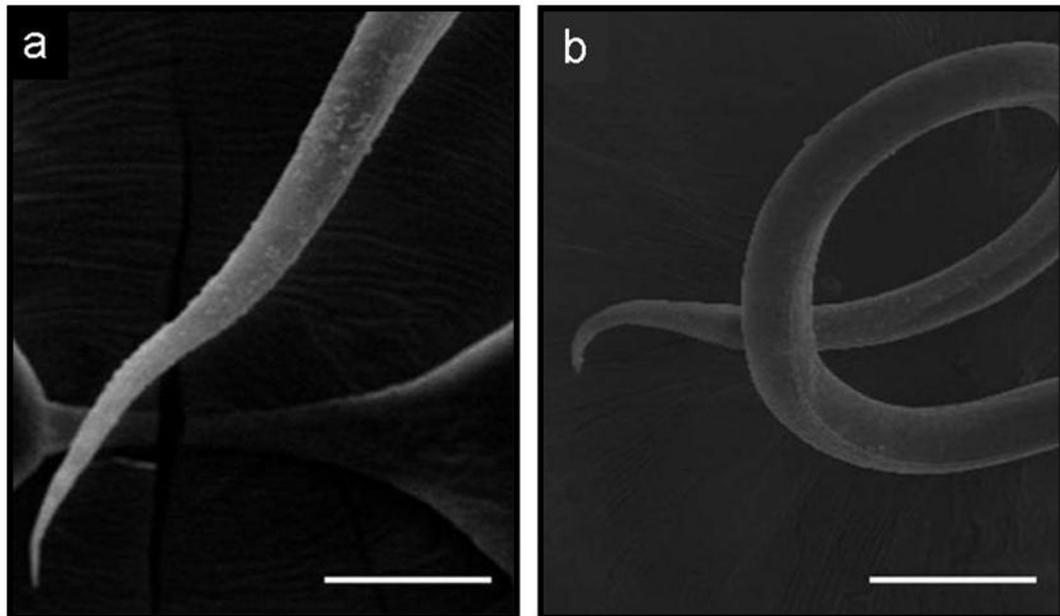


Figura 7. Micrografia eletrônica de varredura de larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. obtidas através de culturas fecais de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Extremidade posterior de uma larva infectante de *L. dentatus*; **B.** Extremidade posterior de uma larva infectante de *L. douglassii*. Barras: 30 µm.

Tabela 2. Estatística descritiva das medidas de comprimento da cauda da bainha de larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. de avestruzes, *Struthio camelus*.

Parâmetros	Espécies	
	<i>L. douglassii</i>	<i>L. dentatus</i>
Número amostral	58	60
Menor medida (µm)	20,62	40,01
Maior medida (µm)	36,31	84,01
Média	29,52	61,20
Desvio Padrão	4,11	9,52
Erro padrão	0,54	1,23
Valor de P (Teste <i>t</i>)	< 0,0001	

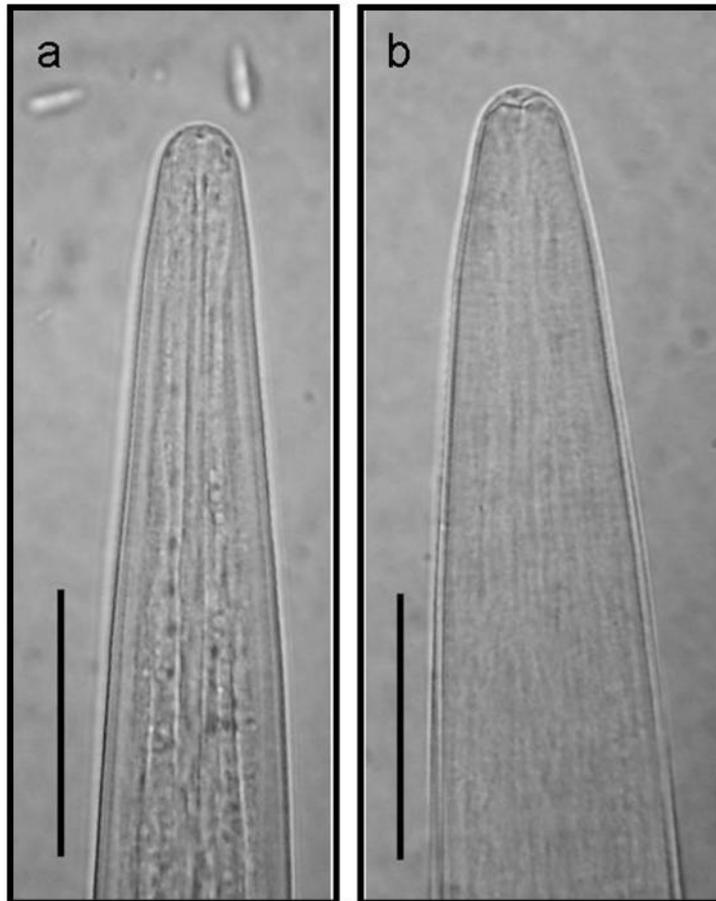


Figura 8. Micrografia óptica de larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. obtidas através de culturas fecais de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Extremidade cefálica de larva infectante de *L. dentatus*. **B.** Extremidade cefálica de larva infectante de *L. douglassii*. Barras: 30 μm .

Tabela 3: Estatística descritiva da razão do comprimento total sobre o comprimento da cauda da bainha de larvas infectantes de *Libystrongylus* spp. de avestruzes, *Struthio camelus*.

Parâmetros	Espécies	
	<i>L. douglassii</i>	<i>L. dentatus</i>
Número amostral	58	60
Menor valor	23,25	10,81
Maior valor	42,38	20,32
Média	30,22	14,29
Desvio Padrão	4,61	2,17
Erro padrão	0,60	0,28
Valor de P (Teste <i>t</i>)	0,0001	

1.5. DISCUSSÃO

Libyostrongylus spp. é o principal parasita das avestruzes (REINECKE, 1983) estando amplamente distribuído pelo mundo (COBBOLD, 1882; BARTON; SEWARD, 1993; PONCE GORDO et al. 2002; HOBBERG et al., 1995; BONADIMAN et al., 2006; EDERLI et al., 2008). Embora existam três espécies de *Libyostrongylus*, apenas *L. douglassii* e *L. dentatus* vem sendo relatados fora do continente africano. Além disso, *L. dentatus* foi detectado apenas por dois grupos de pesquisadores (HOBBERG et al., 1995; EDERLI et al., 2008), mostrando que esta espécie não é encontrada ou é negligenciada pelos pesquisadores. O presente trabalho demonstrou que é possível diferenciar ambas as espécies através da observação morfológica do tamanho e formato da terminação da cauda da bainha das larvas infectantes recuperadas através de cultivos fecais. Mostrou-se também que *L. douglassii* foi mais comum nos proventrículos examinados, apresentando localização diferencial quando comparado com *L. dentatus*. Estes achados confirmam que a diferenciação morfológica das larvas infectantes pode ser utilizada no diagnóstico diferencial de ambas as espécies deste gênero como proposto anteriormente por Bonadiman et al. (2006), o que pode promover o conhecimento da distribuição, biologia e patologia das espécies de *Libyostrongylus* separadamente.

Pela primeira vez foi observado diferenças na localização de *L. douglassii* e *L. dentatus* no proventrículo. Mostrou-se também que o número de exemplares de *L. douglassii* encontrado parasitando as avestruzes foi muito superior aos exemplares de *L. dentatus*.

O pequeno número de relatos de *L. dentatus* parasitando as avestruzes pode ser devido a sua localização e não devido ao seu pequeno tamanho como descrito por Huchzermeyer, (2005), o que pode estar acarretando diagnósticos falso negativo.

Todos os artigos publicados responsabilizam *L. douglassii* pela impactação do conteúdo proventricular que levam as avestruzes a morte (MORE, 1996; SOTIRAKI et al., 2001; PONCE GORDO et al., 2002; MACKERETH, 2004; MUKARATIRWA et al., 2004; BASTIANELLO et al., 2005; TISLJAR et al., 2007). Embora encontrou-se um número

relativamente maior desta espécie nos proventrículos examinados, não podemos descartar a hipótese de que *L. dentatus* também é responsável pela patologia. Além disso, ambas as espécies podem contribuir para causar lesões que levam enfermidades. Mais estudos são necessários para um melhor conhecimento da libyostrongylose causada por estes parasitas.

Embora, observando-se diferença estatística entre os tamanhos das larvas pelo teste *t*, na prática, pode haver erro no diagnóstico diferencial das espécies em consequência do elevado desvio padrão.

A medida média do comprimento da cauda da bainha foi considerada extremamente significativa ($p < 0,0001$) quando comparadas pelo teste *t*. A grande diferença das médias aferidas e o pequeno desvio padrão observado, aliados à morfologia terminal das larvas (Figura 5, 6 e 7) permitem a diferenciação com segurança das larvas infectantes de *L. douglassii* e *L. dentatus* em culturas fecais. Barton e Seward (1993) descreveram as larvas infectantes de *L. douglassii* com 830 μm de comprimento, com a pontada cauda da larva à aproximadamente 23 μm da extremidade posterior da bainha. No entanto, Craig e Diamond (1996) caracterizaram *L. douglassii* com a cauda da bainha medindo aproximadamente 85 μm , não associando esta diferença no comprimento da cauda da bainha como um parâmetro na diferenciação entre as larvas infectantes *L. douglassii* e *L. dentatus*, como suspeitaram Bonadiman et al. (2006), e confirmado nesta pesquisa.

Devido à baixa correlação entre o comprimento total e o comprimento da cauda da bainha, este fator não pode ser uma característica para a distinção entre as espécies de *Libyostrongylus*. No entanto, as médias da razão do comprimento total sobre o comprimento da cauda da bainha das larvas infectantes comparadas entre as espécies foram consideradas extremamente significativas, o que determina que este parâmetro possa ser utilizado para a diferenciação das larvas das espécies *L. douglassii* e *L. dentatus*.

1.6. CONCLUSÕES

- A diferenciação morfológica das larvas infectantes de *L. douglassii* e *L. dentatus* possibilita o diagnóstico das infecções por estas duas espécies através da realização de cultivos fecais, permitindo o estudo da distribuição destes parasitas nos rebanhos.
- A presença de *L. douglassii* e *L. dentatus* em 100% dos animais analisados, permite inferir que infecções mistas são comuns no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.
- Estudos sobre a distribuição das espécies analisadas no presente estudo, bem como sua patogenicidade são necessários para determinar sua prevalência, danos causados aos animais e perdas produtivas nos rebanhos, principalmente pelo *L. dentatus*, que até o momento, é considerado não patogênico.

1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTON, N.J., SEWARD, D.A. Detection of *Libyostrongylus douglassii* in ostriches in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, p. 31-32, 1993.

BASTIANELLO, S., MCKENNA, P.B., HUNTER, J., JULIAN, A. Clinical and pathological aspects of *Libyostrongylus* infection in ostriches. **Surveillance**. V. 32, p. 3-6. 2005

BONADIMAN, S.F., SALES, A.K.P., SANTOS, C.P., DAMATTA, R.A., 2006. Occurrence of *Libyostrongylus* sp. (Nematoda) in ostriches (*Struthio camelus*) in the North Fluminense region: preliminary results. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2004, Ouro Preto. Resumos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 23, p. 253-253, 2004.

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

BUTTON, N.J., BARTON, N.J., VEALE, P.I., OVEREND, D.J. A survey of *Libyostrongylus douglassii* on ostriches farms in Eastern Victoria. **Australian Veterinary Journal**. v. 70, p. 76.1996.

COBBOLD, T.S. New entozoon from the ostriches. **Journal of the Linnean Society**. v. 16, p. 184-188. 1882.

COOPER, R.G. Bacterial, fungal and parasitic infections in the ostriches (*Struthio camelus* var. *domesticus*). **Animal Science Journal**. v. 76, p. 97-106, 2005.

CRAIG, T.M., DIAMOND, P.L. Parasites of ratites. *In*: TULLY. T.N., SHANE, S.N., (Eds), Ratite management, **Medicine and Surgery**. Kreiger Publishing Company, Florida, pp. 115-126. 1996.

EDERLI, N.B. Diagnóstico e caracterização morfológica de *Libyostrongylus douglassii* e *L. dentatus* (Nematoda: Trichostrongylidae) em avestruzes das regiões Norte e Baixada Litorânea do Estado do Rio de Janeiro. (Monografia) Ciências Biológicas. **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF)**, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ. 61p. 2006.

EDERLI, N.B., BONADIMAN, S.F., MORAES NETO, A.H.A., 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 morphological characterization of adults. **Veterinary Parasitology**. v. 151, p. 227-232, 2008.

FOCKEMA, A., MALAN, F.S., COOPER, G.G., VISSER, E. Anthelmintic efficacy of fembendazole against *Libyostrongylus douglassii* and *Houttuynia struthionis* in ostriches. **Journal of South Africa Veterinary Association**. v. 56, p. 47-48. 1985.

FUDGE, A.M. Hematology and chemistry of ratites. *In*: TULLY. T.N., SHANE, S.N., (Eds), Ratite management, **Medicine and Surgery**. Kreiger Publishing Company, Florida, pp. 105-114. 1996.

GILBERT, L.I. New nematode *Libyostrongylus magnus*, n. sp., parasitic in an African ostrich. In Papers on helminthology, 30 year jubilee (K.J. Skrjabin, ed.). **Lenin Academy of Agricultural Science**, Moscow, 180-182. 1937.

GOMES, R.A., NASCIMENTO, A.A., BONUTI, M.R., NASCIMENTO, C.G., TEBALDI, J.H., ZETTERMANN, C.D. Ocorrência de *Libyostrongylus* sp. (Nematoda: Trichostrongylidae) em avestruzes (*Struthio camelus*) no estado de São Paulo, Brasil. *In*: **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, RJ, resumos. CD-ROM R313. 2002

- GORDON, N.M., WITHLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Council Scientific Industry Research Australia**. v. 12, p. 50-52. 1939
- HOBERG, E.P., LLOYD, S., OMAR, H. *Libyostrongylus dentatus* n. sp. (Nematoda: Trichostrongylidae) from ostriches in North America, with comments on the genera *Libyostrongylus* and *Paralibyostrongylus*. **Journal of Parasitology**. v. 81, p. 85-93, 1995.
- HUCHZERMEYER, F.W. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**. v. 21(2), p. 265-276. 2002.
- HUCHZERMEYER, F.W. **Doenças de avestruzes e outras ratitas**. 2ed. Jaboticabal, SP. Funep. 2005. 392 p.
- JANSSON, D.S., CHRISTENSSON, D.A., CHRISTENSSON, B.E. Winter survival in Sweden of L₃-stage larvae of the ostrich wireworm *Libyostrongylus douglassii*. **Veterinary Parasitology**. v. 106, p. 69-74. 2002.
- LANE, C. Some Strongylata. **Parasitology**. v. 15, p. 346-364. 1923.
- MACKERETH, G. *Libyostrongylus douglassii* in New Zealand ostriches. **Surveillance**. v. 31, p. 14-16, 2004.
- MALAN, F.S., GRUSS, B., ROPER, N.A., ASHBURNER, A.J. & DUPLESIS, C.A. Resistance of *Libyostrongylus douglassii* in ostriches to levamisole. **Journal of the South African Veterinary Association**. v. 59, p. 202-203. 1988.
- MCKENNA, P.B. *Libyostrongylus* infections in ostriches – a brief review with particular reference to their detection in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 53, p. 267-270. 2005.
- MORE, S.J. The performance of farmed ostrich hens in eastern Australia. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 29, p. 107-120, 1996.

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 avestruzes (*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, p. 169-176. 2007.

MUKARATIRWA, S., CINDZI, Z.M., MAONONGA, D.B. Prevalence of *Libyostrongylus douglassii* in commercially reared ostriches in the highveld region of Zimbabwe. **Journal of Helminthology**. v. 78, p. 333-336, 2004.

ORTLEPP, R.J. South African helminthes, Part VI. Some helminthes, chiefly from rodents. **Onderstepoort Journal of Veterinary Sciences and Animal Industry**. v. 12, p. 75-101. 1939.

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

PINTORI, A., SCALA, A., GIANNETTO, S., MASCIA, M., DE ROSA, R. Parasitoses of ostriches (*Struthio camelus*) in Sardinia (Italy). **Acta Parasitologica**. v.45, p. 164. 2000.

PONCE GORDO, F.P., 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.

REINECKE, R.K. **Veterinary Helminthology**. Butterworth, Durban, 1983. 295 p.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3ed., Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia: Belo Horizonte, 2007. 264p.

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

SOULSBY, E.J.W. **Helminthes, arthropods and protozoa in domesticated animals**. 7ed., Bailliere Tindall, London: Lea and Febiger, Philadelphia, 1982. 824 pp..

TIŠLJAR, M., BECK, R., COOPER, R.G., MARINCULIĆ, A., TUDJA, M., LUKAČ-NOVAK, I., GRABAREVIĆ, Ž., PERKOVIĆ-HERAK, V., ŠIMPRAGA, B. First finding of libyostrongylosis in farm-reared ostriches (*Struthio camelus*) in Croatia: Unusual histopathological finding in brain of two ostriches, naturally infected with *Libyostrongylus douglasi*. **Veterinary Parasitology**. v. 147, p. 117-124, 2007.

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

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Codiostomum* *struthionis* (Horst, 1885) Railliet e Henry, 1911 (NEMATODA, STRONGYLIDAE)

RESUMO

EDERLI, Nicole Brand. **Caracterização morfológica de larvas infectantes de *Libyostrongylus douglassii* e *Libyostrongylus dentatus* (Nematoda, Trichostrongylidae) e adultos de *Codiostomum struthionis* (Nematoda, Strongylidae) parasitas de avestruzes, *Struthio camelus*.** 2009. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Com o objetivo de melhor caracterizar morfológicamente adultos e larvas infectantes de *Codiostomum struthionis*, dez cecos de avestruzes adultos, de ambos os sexos foram coletados. Estes foram lavados em solução fisiológica (NaCl 0,09%), machos e fêmeas foram quantificados separadamente. Parte dos nematóides foi fixada em A.F.A. para microscopia óptica e a outra parte foi fixada em solução Karnovsky para microscopia eletrônica de varredura. Para obtenção de larvas infectantes, amostras fecais foram coletadas nos locais de maior concentração de parasitas no próprio ceco e realizados cultivos fecais. Estas foram identificadas e medidas utilizando-se microscópio óptico. Dos dez animais abatidos, nove estavam parasitados por *C. struthionis*. Os nematóides foram encontrados no terço final do ceco. Foi encontrado um total de 566 parasitas, sendo dentre estes 234 machos e 332 fêmeas, não havendo diferença estatística entre estes. Todas as larvas recuperadas das culturas fecais tinham características de *C. struthionis*. Estas apresentavam a porção cefálica arredondada com a extremidade achatada, terminação da cauda da larva aguda e cauda da bainha da larva longa e filamentosa. Todos os parasitas adultos foram caracterizados como *C. struthionis*. Através da análise morfométrica das larvas infectantes foi verificado que a cauda da bainha das larvas embora diferente das de *Libyostrongylus* spp. não é um parâmetro seguro no diagnóstico diferencial, principalmente em relação a *L. dentatus*, permanecendo a morfologia da ponta da cauda da larva o melhor caractere utilizado na distinção das espécies.

Palavras-chave: Larvas infectantes, *Codiostomum struthionis*, *Struthio camelus*.

ABSTRACT

EDERLI, Nicole Brand. **Morphological characterization of infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* and *Libyostrongylus dentatus* (Nematoda, Trichostrongylidae) and adults of *Codiostomum struthionis* (Nematoda, Strongylidae) parasite of ostriches, *Struthio camelus*.** 2009. 111p. Dissertation (Máster Science in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The aim of this study is to realize a best morphological characterization of adults and infective larvae of *Codiostomum struthionis*. To this, ten adult ostriches' caeca, of both sexes were collected. These were washed in saline solution (NaCl 0,09%), and males and females were quantified separately. Part of this nematodes was fixed in A.F.A. for optical microscopy and the other part was fixed in Karnovsky solution for scanning electronic microscopy. For obtaining of infective larvae, fecal samples were collected at the locality of high concentration of parasites in the own caeca and fecal cultures were performed. These were identified and measures with aid of an optical microscope. Of the ten abated animals, nine were positive for the infection by *C. struthionis*. The nematodes were found in the caecal final third. It was found a total of 566 parasites, being 234 males and 332 females, with no difference statistics among these. All of the recovered larvae of the fecal cultures had characteristics of *C. struthionis*. These presented the round cephalic extremity with the flat extremity, ending of the larval tail acute and sheath tail long and filamentous. All the adults parasites were characterized as *C. struthionis*. Among the morphometrical analysis of the infective larvae was verified that the larvae sheath tail although different from the one of *Libyostrongylus* spp. it is not a safe parameter in the differential diagnosis, mainly in relation to *L. dentatus*, being the morphology of the tip of the tail of the larvae the best character used in the distinction of the species.

Key-words: Infective larvae, *Codiostomum struthionis*, *Struthio camelus*.

2.1. INTRODUÇÃO

Codiostomum struthionis é um nematóide parasita do ceco das avestruzes, se alimentando da mucosa cecal. O gênero *Codiostomum* é composto por esta única espécie e sua patologia ainda é pouco conhecida, sendo considerado por muitos autores como um parasita não patogênico. As infecções por *C. struthionis* são, muitas vezes, negligenciadas, pois seus ovos são indistinguíveis dos de *Libyostrongylus* spp., sendo necessário a realização de culturas fecais para a obtenção e diferenciação das larvas infectantes. Estas apresentam a extremidade da cauda da larva aguda e cauda da bainha longa e filamentosa, enquanto que as larvas infectantes de *Libyostrongylus* spp. apresentam uma protuberância arredondada na extremidade da cauda, semelhante à um cotonete, sendo este o caractere diagnóstico para o gênero *Libyostrongylus*. Importante ressaltar que a cauda da bainha das larvas infectantes de *C. struthionis* é semelhante à de *L. dentatus*, longa e afilada, o que pode ocasionar em erro no diagnóstico (EDERLI et al., 2008). Sua ultraestrutura ainda é pouco conhecida, havendo escassez de trabalhos abrangendo este assunto, relatando apenas a semelhança de seus ovos aos de *Libyostrongylus* spp., nematóides patogênicos parasitas do proventrículo das avestruzes, responsáveis por altos índices de mortalidade entre as aves juvenis.

Justifica-se, portanto, um trabalho com o objetivo de realizar uma melhor caracterização morfológica de adultos e larvas infectantes de *C. struthionis*, uma vez que, pouco se sabe sobre a morfologia, ultraestrutura e biologia deste parasita.

2.2. REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1. Histórico

Codiostomum struthionis foi descrito originalmente como *Sclerostoma struthionis* por Horst em 1885 (POPOVA, 1955). Em 1911, Railliet e Henry estabeleceram o gênero *Codiostomum*, sendo *C. struthionis* a espécie tipo. Desde então há um número extremamente pequeno de trabalhos a cerca deste nematóide. No entanto, todos caracterizam a ocorrência deste associado à semelhança de seus ovos aos de *Libyostrogylus* spp. (BARTON; SEWARD, 1993; BLACK, 2001; PENNYCOTT; PATTERSON, 2001; SOTIRAKI et al., 2001; PONCE GORDO et al., 2002; HUCHZERMEYER, 2002; 2005; MCKENNA, 2005; TIŠLJAR et al., 2007). Seu ciclo de vida ainda não foi determinado, porém acredita-se que este possua um ciclo de vida simples e direto típico dos Strongilídeos (SOULSBY, 1982).

2.2.2. Considerações Gerais

Codiostomum struthionis é um nematóide parasita de avestruzes pertencente à família Strongylidae. Este gênero é composto por esta única espécie (LICHTENFELS, 1980), sendo considerado específico das avestruzes (FOREYT, 2005; CRAIG; DIAMOND, 1996). Embora sua alimentação consista de células da mucosa cecal, como os nematóides da família Strongylidae (LICHTENFELS, 1980), sua patologia ainda é pouco conhecida e considerada por muitos autores como parasita não patogênico (HUCHZERMEYER, 2005). Segundo Craig e Diamond (1996), *C. struthionis* possivelmente atua causando anemia e prejudicando o desenvolvimento. Nos rebanhos saudáveis seu efeito é desconhecido. Benzimidazóis e levamisóis aparentam ser eficazes no tratamento contra este parasita (CRAIG; DIAMOND, 1996).

Segundo Ponce Gordo (2002), a ocorrência de *C. struthionis* é, muitas das vezes, negligenciada na Europa, pela possível confusão de seus ovos com os de *Libyostrongylus* spp., e provavelmente o mesmo fato esteja ocorrendo em outros continentes, inclusive no Brasil. Isto porque o diagnóstico diferencial entre estas espécies é feito através das larvas infetantes, após cultura fecal (EDERLI, 2008).

A patologia de *C. struthionis* é desconhecida, provavelmente, devido à infecções não apresentarem manifestações clínicas aparentes (HUCHZERMEYER, 2005). Os parasitas adultos geralmente ocorrem em achados de necropsia de patologias relacionadas ao parasitismo por *Libyostrongylus* spp. que causa necrose de proventrículo, impactação do conteúdo proventricular ou através de outras causas que venham acarretar em morte do animal (CRAIG; DIAMOND, 1996). Devido a sua suposta inofensividade, Huchzermeyer (2005), descarta a necessidade de tratamento das aves para as infecções por estes nematóides, embora o tratamento regular contra *Libyostrongylus* spp. também é eficiente contra este parasita.

2.2.3. Morfologia

São poucos os trabalhos relacionados à estrutura morfológica de *C. struthionis* (POPOVA, 1955; LICHTENFELS, 1980; SOULSBY; 1982), não havendo estudos sobre a ultraestrutura do parasita.

As larvas infectantes de *C. struthionis* se diferenciam das larvas de *Libyostrongylus* spp. por terem a extremidade da cauda com terminação de forma aguda e cauda da bainha longa (CRAIG; DIAMOND, 1996), enquanto que as espécies do gênero *Libyostrongylus* possuem uma protuberância na extremidade da cauda da larva em forma de um “cotonete” (EDERLI et al., 2008). Craig e Diamond (1996) basearam a diferenciação das larvas infectantes de *C. struthionis* e *L. douglassii*, no comprimento da cauda da bainha das larvas, sendo *L. douglassii* com aproximadamente 85 µm de comprimento e *C. struthionis* com cauda da bainha mais longa e em forma de chicote, característica esta, típica dos Strongilídeos.

Os parasitas adultos são observados no ceco, com coloração branca amarelada, com comprimento variando de 1 a 2 cm, sendo as fêmeas maiores que os machos, com vulva localizada próxima ao ânus, muitas vezes com uma elevação cuticular proeminente, anterior à vulva (POPOVA, 1955; REINECKE, 1983).

O tipo do ovijetor dos nematóides da superfamília Strongyloidea está correlacionado com a morfologia do raio dorsal. A maioria destes nematóides com ovijetor do tipo I, em forma de Y, e raio dorsal do tipo I, com três ramos de cada lado, estão classificados como pertencentes a família Strongylidae, assim, *C. struthionis* está incluído nesta família. Outra característica típica dos Strongilideos é a morfologia da cápsula bucal, caractere este que pode ser usado para separar três Subfamílias. Como *C. struthionis* tem cápsula bucal subglobular, foi classificado como pertencente à subfamília Strongylinae (LICHTENFELS, 1980).

2.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico se dá através da coleta de parasitas adultos de *C. struthionis* do ceco de avestruzes durante a necropsia ou pela observação de ovos típicos de Strongilideos nas fezes dos animais que podem ser quantificados pela concentração de ovos por grama de fezes (OPG) através da técnica modificada Gordon e Withlock (1939) com posterior realização de cultura fecal para a obtenção de larvas infectantes, o que vai permitir a distinção das larvas de *Codiostomum* sp. das de *Libyostrongylus* spp. As larvas infectantes de *C. struthionis* apresentam a terminação da cauda da larva aguda, e bainha da cauda da larva longa e filamentosa semelhante à um chicote (PONCE GORDO et al., 2002), podendo ser muitas vezes confundidas com as de *Libyostrongylus dentatus* (EDERLI et al., 2008).

2.2.5. Epidemiologia

Há poucos relatos da ocorrência de *C. struthionis* infectando os rebanhos de avestruzes no mundo, sendo encontrado apenas na Europa (PONCE GORDO et al., 2002), África do Sul (POPOVA, 1955) e possivelmente na Grécia, onde Sotiraki et al. (2001) encontraram ovos típicos de Strongilideos, mas não realizaram culturas fecais para confirmar o diagnóstico. Esta baixa ocorrência provavelmente está relacionada à semelhança de seus ovos com os de *Libyostrongylus* spp. e pela semelhança de suas larvas infectantes (EDERLI et al., 2008).

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Nematóides Adultos

Cecos de dez avestruzes adultos, de ambos os sexos foram coletados em um abatedouro no município de Quissamã (22° 05' 23" S e 41° 41' 48" O), no norte do Estado do Rio de Janeiro, armazenados em sacos plásticos previamente identificados, acondicionados em caixas isotérmicas e encaminhados ao Laboratório de Sanidade Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Os 20 cecos foram abertos e examinados para a presença de parasitas.

Espécimes de *C. struthionis* foram coletados e lavados em solução salina 0,09%. A população de machos e fêmeas foi quantificada com o auxílio de estereomicroscópio e suas médias foram comparadas utilizando-se o teste *t* de Student (SAMPAIO, 2007). Parte dos nematóides foi fixada em A.F.A. quente (70° GL etanol, 93%; formaldeído, 5%; ácido acético glacial, 2%) e uma parte foi fixada em solução Karnovski (glutaraldeído 2,5%; Paraformaldeído 4%, recém preparado; 5mM Cloreto de Cálcio, pH 7,4, em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2) para ser processada para microscopia eletrônica de varredura.

O diagnóstico da espécie encontrada parasitando as avestruzes foi realizado segundo Lichtenfels (1980). Foram examinados espécimes representativos depositados da Coleção Helmintológica da Austrália (Australian Helminthological Collection – AHC, South Australian Museum - SAM, Adelaide, Australia) sob os números: AHC 420 com um exemplar macho de *C. struthionis*; AHC 872, com exemplares de machos e fêmeas de *C. struthionis* e *L. douglassii*, coletados do intestino de uma avestruz em Temora, New South Wales, Austrália, em 1912; AHC 874, com exemplares de fêmeas, coletados de uma avestruz por L. Hebert, em Temora, New South Wales, Austrália, em 1911. Examinou-se também espécimes depositados na Coleção Nacional Parasitológica dos Estados Unidos (United States National Parasite Collection – USNPC, United States Department of agriculture - USDA, Agricultural Research Service - ARS, Beltsville, Maryland) sob os números: 024522.00,

coletados do estômago por H. H. Carson, e identificados por M. C. Hall, em Grahamstown, África do Sul, em 1920; 025463.00, coletados e identificado por A. Theiler, em Pretoria, África do Sul; e 031865.00, coletados e identificados por C. de Koch, do ceco de avestruzes, em Grhamstown, África do Sul, em 1922; 031866.01, coletados e identificados por C. Koch, do peritônio em Grhamstown, África do Sul, em 1922 para confirmar o diagnóstico.

Foram depositados espécimes representativos nas seguintes coleções parasitológicas: Coleção Nacional Parasitológica dos Estados Unidos (United States National Parasite Collection – USNPC, USDA, ARS, Beltsville, Maryland), Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro e Coleção Helmintológica da Austrália (Australian Helminthological Collection – AHC, South Australian Museum - SAM, Adelaide, Australia).

2.3.2. Larvas Infectantes

Amostras fecais foram coletadas nos locais de maior concentração de parasitas no próprio ceco dos dez animais analisados. Foram realizados cultivos fecais para a obtenção de larvas infectantes. As amostras coletadas foram acondicionadas em copos plásticos descartáveis com 60 ml de capacidade previamente identificados. Os copos plásticos contendo as amostras de fezes foram incubados em vasilhames de plástico contendo fina camada de água destilada e coberta com filme plástico para prevenir a perda de umidade durante 10 dias a temperatura de 25 - 27°C. Após a incubação, cada copo plástico foi preenchido com água destilada e foi colocado, na borda do copo, uma placa de Petri e logo após foi feita a inversão do conjunto copo-placa. Na placa de Petri foram adicionados 10 ml de água destilada e após 4 horas as larvas infectantes que migraram do copo para a placa de Petri foram pipetadas. As larvas recuperadas foram transferidas para tubos do tipo Falcon com capacidade de 15 ml e armazenadas em geladeira por 24 horas para a deposição das larvas no fundo do tubo. Após este período retirou-se o sedimento onde encontravam-se as larvas com o auxílio de uma pipeta. As medidas foram baseadas em 62 larvas. Estas foram montadas entre lâmina e lamínula, com água destilada, identificadas e medidas utilizando-se microscópio óptico Zeiss - Axiostar Plus equipado com câmera digital Canon - PowerShot A640 para captura de imagem e Software Zeiss AxionVision Sample Images para análise de imagens. As larvas foram esquematizadas com o auxílio de microscópio óptico Axioplan Zeiss acoplado a câmera clara.

2.3.3. Microscopia óptica e Medidas dos Nematóides Adultos

Os nematóides foram fixados em A.F.A. quente (70 °C) por 24 horas e transferidos posteriormente para uma solução contendo álcool 70°GL (90%) e glicerina (10%), clarificados em lactofenol (uma parte de água destilada, duas partes de glicerina, uma parte de ácido láctico e uma parte de ácido fênico) e creosoto, montados entre lâmina e lamínula e observados ao microscópio óptico com auxílio de uma ocular micrométrica PZO k-15, Polônia. As medidas foram dadas em μm , médias e respectivos desvios padrões com valores mínimos e máximos representados entre parênteses. A morfometria foi baseada em 20 machos e 20 fêmeas. As medidas dos ovos foram baseadas em 60 ovos em estágio de mórula no interior do útero. Os desenhos foram feitos com o auxílio de microscópio óptico Axioplan Zeiss acoplado ao tubo de desenho.

A nomenclatura dos raios da bolsa copuladora (Figura 1) e os tipos de bolsa copuladora (Figura 2) utilizados na descrição seguem Durette-Desset e Chabaud (1981).

2.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Os nematóides foram fixados por 2 horas em uma solução Karnovski contendo 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído recém preparado, 5 mM cloreto de Cálcio pH 7,4 em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, lavados em tampão cacodilato 0,1 M e pós-fixados em solução contendo 2% tetróxido de ósmio, 5 mM cloreto de Cálcio e 0,8 ferrocianeto de Potássio em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 1 hora e lavados novamente em tampão cacodilato 0,1 M. As amostras foram desidratadas em série crescente com acetona à 30, 50, 70 e 90% por uma hora cada, seguida de três repetições também de uma hora em acetona à 100%, secadas no aparelho de ponto crítico com dióxido de Carbono (CO_2), montados em suporte para MEV com fita de carbono e aterradas com cola de prata, metalizadas em ouro e observadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss 962, operado com 15 Kv.

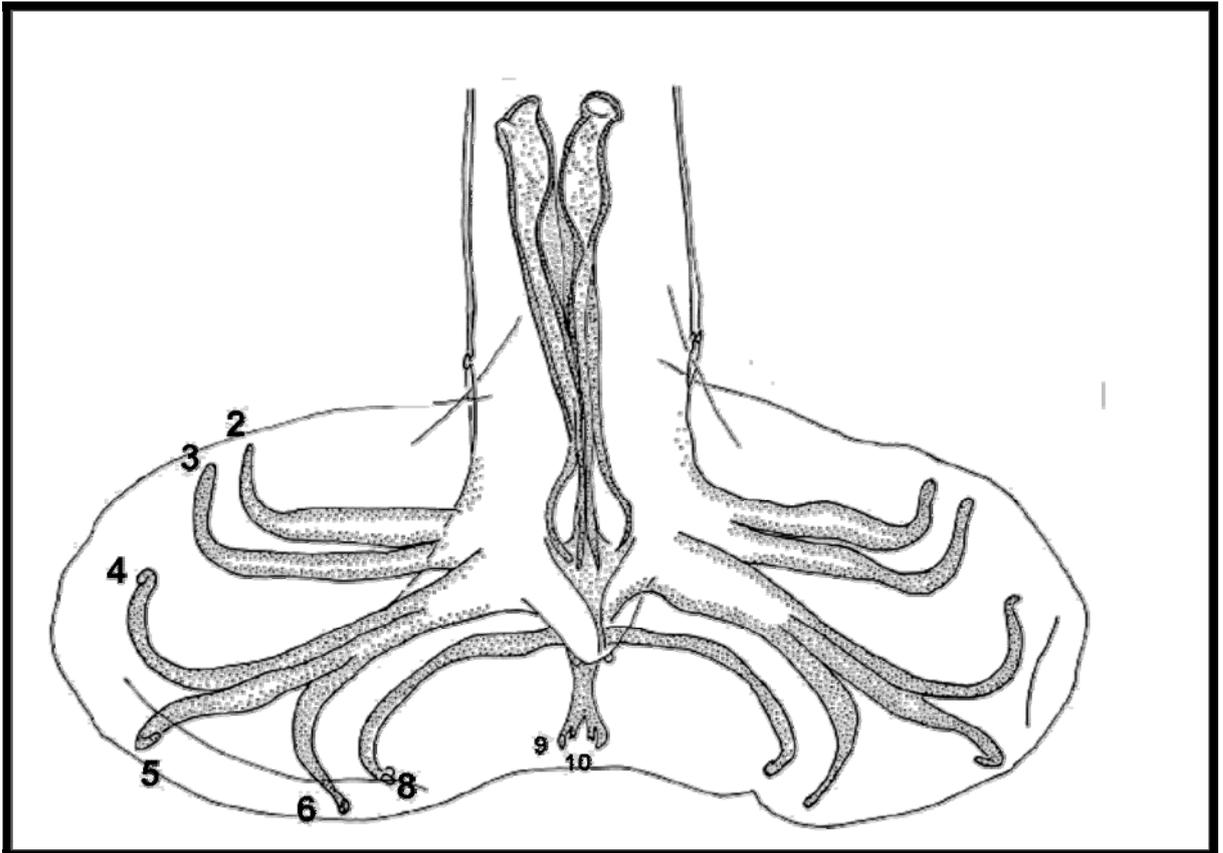


Figura 1. Esquema da nomenclatura dos raios da bolsa copuladora, segundo Durette-Desset e Chabaud (1981), adaptado.

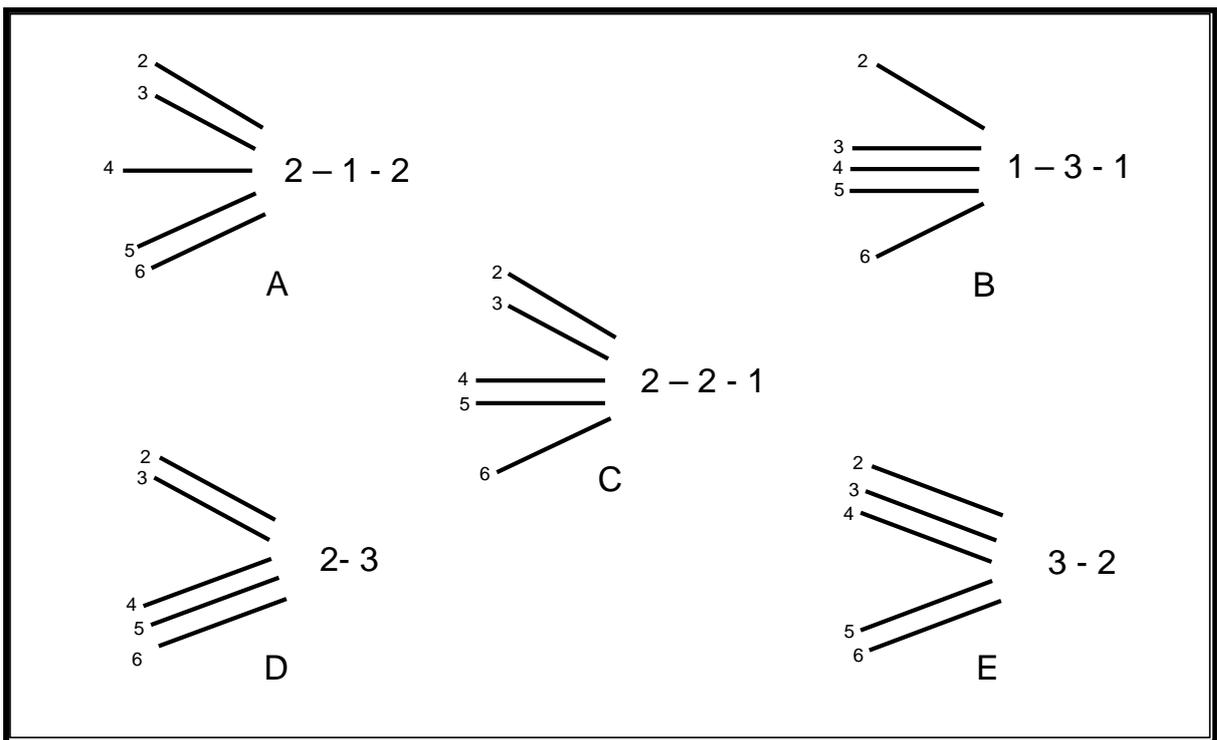


Figura 2. Esquema dos diferentes tipos de bolsa copuladora, segundo a organização dos raios da bolsa (Durette-Desset; Chabaud, 1981). **A.** Tipo 2-1-2, raios 2 e 3, e raios 5 e 6 agrupados e raio 4 isolados; **B.** Tipo 1-3-1, raios 2 isolados e raios 3 a 5 agrupados e raios 6 isolados; **C.** Tipo 2-2-1, raios 2 e 3 e raios 4 e 5 agrupados e raios 6 isolados; **D.** Tipo 2-3, raios 2 e 3 e raios 4 a 6 agrupados; **E.** Tipo 3-2, raios 2 a 4 e raios 5 e 6 agrupados.

2.3.5. Análise Estatística

As medidas do comprimento total, comprimento da cauda da bainha e da razão entre o comprimento total e o comprimento da cauda da bainha das larvas infectantes de *C. struthionis* foram submetidos à análise descritiva, definindo-se os valores médios, os desvios padrões, erros padrões e os valores mínimos e máximos. As médias de *C. struthionis* foram comparadas com as de *L. douglassii* e *L. dentatus* (Capítulo I), utilizando-se o teste de Tukey (SAMPAIO, 2007). Todos os cálculos foram feitos utilizando-se o programa Graph Pad InStat Copyright 1992-2000. Graph Pad Software, versão 3-05 for Windows.

2.4. RESULTADOS

Dos 10 animais abatidos, nove estavam parasitados por *C. struthionis*. Estes nematóides foram encontrados no terço final do ceco. Foi encontrado um total de 566 parasitas, sendo dentre estes 234 machos e 332 fêmeas, não havendo diferença estatística entre estes (Tabela 1.). Foram verificados edemas na mucosa do ceco no sítio de localização dos parasitas proporcional à carga parasitária (Figura 3).

2.4.1. Caracterização de Larvas Infectantes

Observou-se nas amostras fecais coletadas do ceco das avestruzes ovos típicos de Strongilídeos (Figura 4). Todas as larvas recuperadas das culturas fecais tinham características de *C. struthionis*. Estas apresentavam a porção cefálica arredondada com a extremidade achatada (Figura 5 a), terminação da cauda da larva aguda e cauda da bainha da larva longa e filamentosa (Figura 5 b,c), com comprimento total da larva medindo $598,25 \pm 25,15$ (511,92 - 642,41) e comprimento da cauda da bainha da larva $110,74 \pm 13,46$ (85,87 - 147,18). A razão entre o comprimento total e o comprimento da cauda da bainha foi de $5,47 \pm 0,64$ (4,20 - 7,48).

Tabela 1. *Codiostomum struthionis* adultos coletados em cecos de avestruzes, *Struthio camelus* em abatedouro do Município de Quissamã-RJ, Brasil, em .

Animais	NÚMERO DE ESPÉCIMES COLETADOS ^a		Total
	Machos	Fêmeas	
1	2	14	16
2	20	40	60
3	30	48	78
4	17	26	43
5	52	54	106
6	1	16	17
7	25	41	66
8	28	46	74
9	0	0	0
10	59	47	106
Total	234	332	566
Média ^b	23,4±20,31	33,2±18,05	56,6±37,04

^aAmostras de ambos os cecos

^bConsiderado não significativo (P=0,2690) pelo teste *t* de Student com intervalo de confiança de 0,5%.



Figura 3. Porção final da luz do ceco de uma avestruz, *Struthio camelus*. Exemplos de machos e fêmeas de *Codiostomum struthionis* à fresco na mucosa cecal. Barra: 6 mm.



Figura 4. Micrografia óptica de ovo de *Codiostomum struthionis*, típico de Strongylidae.
Barra: 30 μm

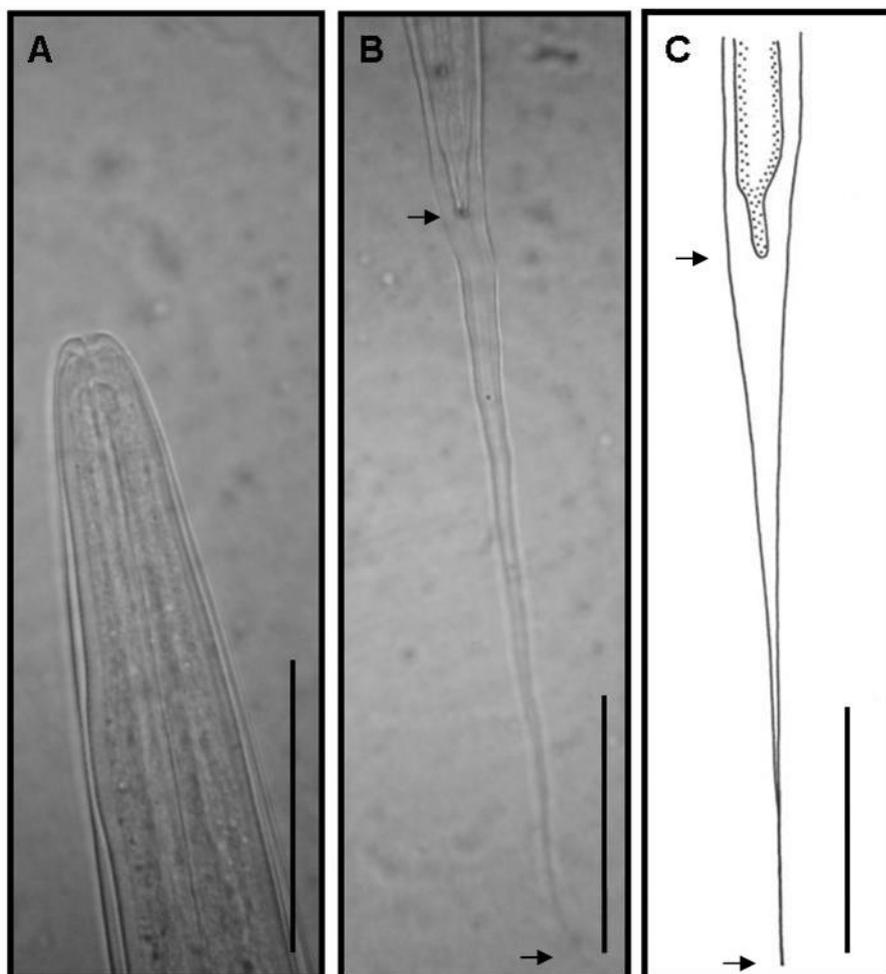


Figura 5. Larvas infectantes de *Codiostomum struthionis*, de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Micrografia óptica da extremidade anterior; **B.** Micrografia óptica da extremidade posterior; **C.** Desenho feito utilizando-se microscópio óptico acoplado à câmera clara da extremidade posterior. Setas evidenciam distância entre a ponta da cauda da larva e a ponta da cauda da bainha. Barras: 30 μm .

2.4.2. Caracterização dos Adultos de *Codiostomum struthionis*

2.4.2.1. Depósito dos espécimes representativos

Espécimes representativos foram depositados na Coleção Nacional Parasitológica dos Estados Unidos (United States National Parasite Collection – USNPC, USDA, ARS, Beltsville, Maryland) sob o número (USNPC nº 100687); na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil sob o número (CHIOC nº 35541) e na Coleção Helmintológica da Austrália (Australian Helminthological Collection – AHC, South Australian Museum - SAM, Adelaide, Australia) sob o número (AHC nº 34998).

2.4.2.2. Descrição geral

Corpo filiforme, branco ou amarelo claro em vida (Figura 5). Fêmeas maiores que os machos (proporção de 1,08 : 1). Cutícula com fortes estriações transversais, sínlofe ausente e esôfago alcançando maior diâmetro na extremidade posterior (Figuras 6 A e 7). Cápsula bucal subglobular (Figuras 6 e 8). Presença de um anel cuticular na extremidade cefálica. Abertura oral arredondada, com duas fileiras de coroa frangeada, uma interna e outra externa, sendo a interna com comprimento maior que a externa (Figura 9). Não há presença de dentes nem lancetas. Em vista apical, presença de quatro papilas cefálicas arredondadas e um par de anfídeos (Figura 9).

2.4.2.3. Machos

Os machos são menores que as fêmeas, com comprimento total do corpo $15.341 \pm 828,3$ (13.923 – 16.782) e largura mensurada na região mediana do corpo $628 \pm 35,2$ (551 – 688). Cápsula bucal com $249 \pm 20,6$ (216 – 286) de profundidade e $261 \pm 13,3$ (236 – 289) de largura. Comprimento do esôfago $1.163 \pm 47,1$ (1.061 – 1.248), largura mensurada na base do esôfago $328 \pm 20,6$ (306 - 374), razão entre o comprimento total do corpo pelo

comprimento do esôfago 1:0,07, distância do anel nervoso até a extremidade anterior $633 \pm 37,3$ (527 - 695).

A extremidade caudal está fortemente curvada ventralmente com presença de bolsa copuladora bem desenvolvida, com grande projeção do lobo dorsal (Figura 10). Bolsa copuladora do tipo 2-3 (Figura 6 F). Os raios 2 ao 6 nascem de um tronco comum, se separando posteriormente, onde os raios 2 e 3 mantêm-se em um tronco comum e os raios 4 ao 6 em outro tronco comum. Raio dorsal perpendicular ao corpo. Raios 2 e 3 paralelos, mas não fundidos. Raios 3 maiores que os raios 2. Raios 5 maiores que os raios 4 e 6, sendo que as extremidades dos raios 4 sobrepondo-se ao raio 5 no terço final, enquanto que os raios 6 se afastam dos raios 5. Raios 8 longos, finos, se iniciando na base do raio dorsal e seguindo paralelo ao raio 6. O raio dorsal se ramifica na sua metade, e em cada ramificação, logo no início, partem outro ramo que se bifurca nas extremidades (Figuras 6 F e 11).

Espículos com comprimento total semelhantes, finos, medindo, $1.041 \pm 55,6$ (916 – 1.183), com estriações transversais e extremidade final curvada (Figuras 6 e 9). Razão entre o comprimento total do corpo pelo comprimento dos espículos 1:0.06. Gubernaculo pequeno em forma de “gôndola”, com $86 \pm 10,3$ (66 - 105) de comprimento (Figuras 6 G, H e 12). Cone genital bem desenvolvido (Figura 13).

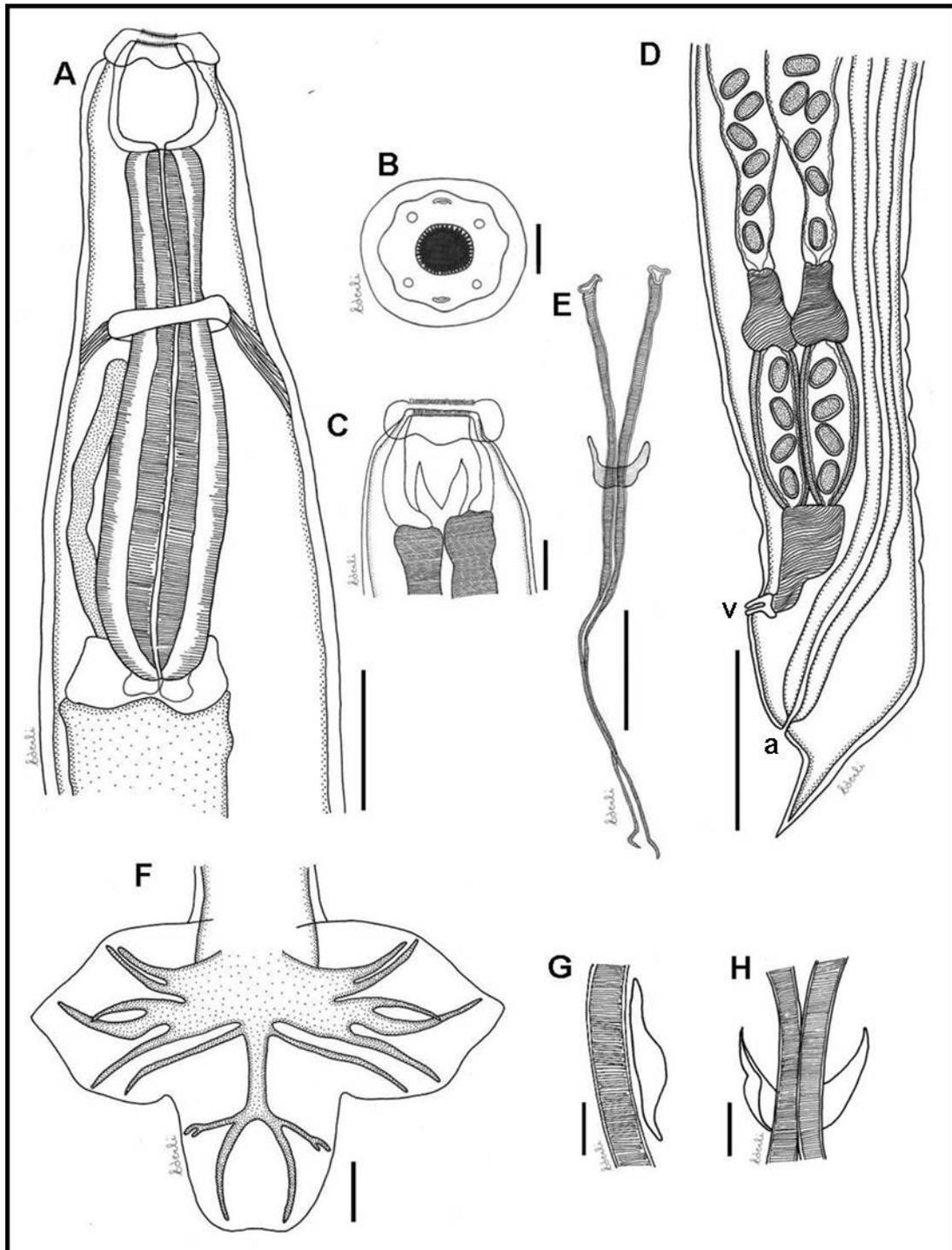


Figura 6. Desenhos feitos utilizando-se microscópio óptico acoplado à câmera clara de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Extremidade cefálica, evidenciando a estrutura do esôfago, cápsula bucal, e posição do anel nervoso. Barra: 300 μ m; **B.** Vista apical desenhada com base em micrografia eletrônica de varredura, evidenciando a estrutura da abertura oral, distribuição das papilas cefálicas e anfídeos e coroa frangeada. Barra: 50 μ m; **C.** Cápsula bucal evidenciando coroa frangeada e anel cuticular na extremidade. Barra: 100 μ m; **D.** Extremidade posterior de uma fêmea, evidenciando útero, ovijetor, vulva (v) e abertura do ânus (a), e ponta da cauda em formato de espinho. Barra: 300 μ m; **E.** Espículos e gubernaculo de um macho. Barra: 200 μ m; **F.** Bolsa copuladora de um macho mostrando a organização dos raios da bolsa. Barra: 100 μ m; **G.** Gubernaculo em vista lateral de um macho. Barra: 30 μ m; **H.** Gubernaculo em vista ventral de um macho. Barra: 30 μ m.



Figura 7. Micrografia óptica de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. Extremidade anterior mostrando estrutura do esôfago, cápsula bucal, anel nervoso e válvula esôfago-intestinal. Barra: 300µm.

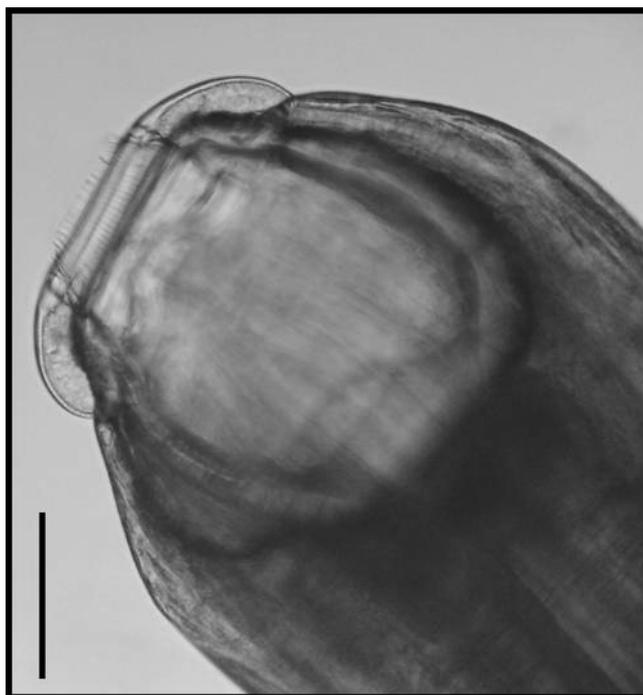


Figura 8. Micrografia óptica de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. Cápsula bucal evidenciando coroa frangeada e anel cuticular na extremidade cefálica. Barra: 100 μm .

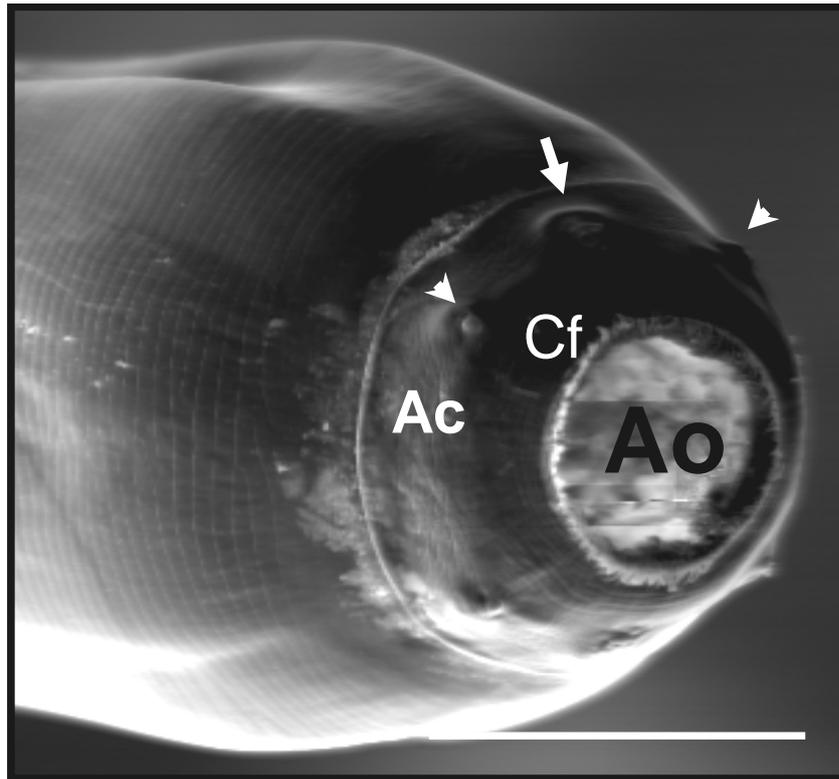


Figura 9. Micrografia eletrônica de varredura de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. Extremidade cefálica, evidenciando abertura oral (Ao), anfídeos (seta), papilas cefálicas (pontas de seta), coroa frangeada (Cf) e anel cefálico (Ac). Barra: 100 μ m.

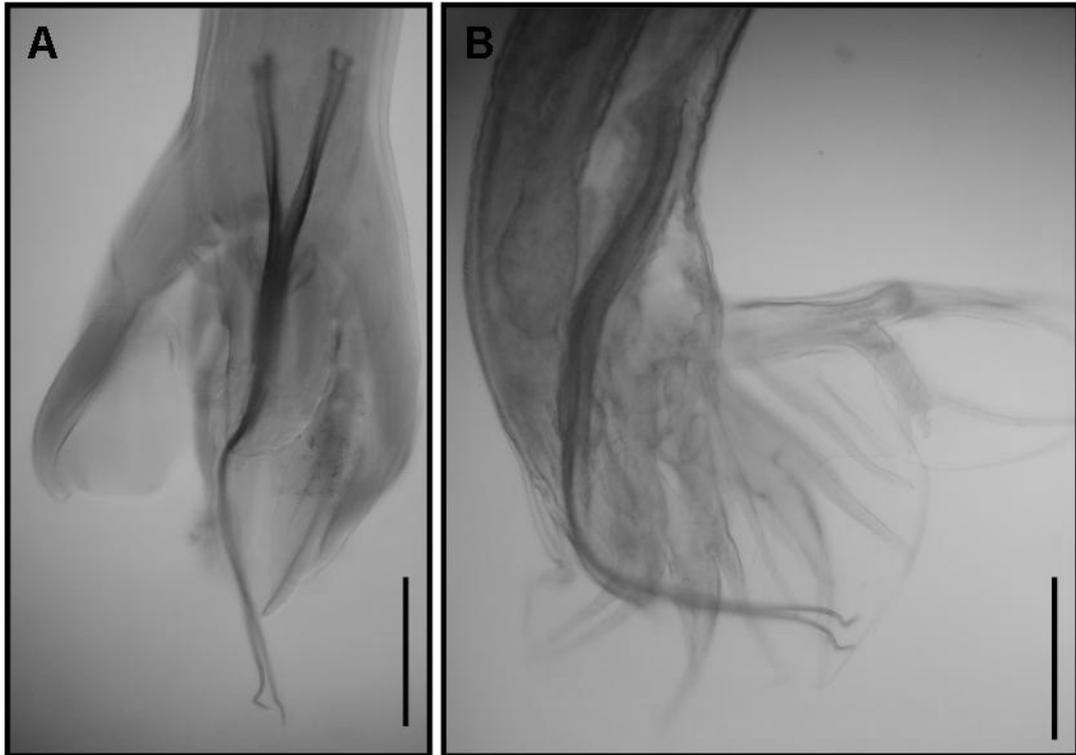


Figura 10. Micrografia óptica de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Bolsa copuladora de um macho, vista ventral; **B.** Bolsa copuladora de um macho, vista lateral. Barras: 200 μ m.



Figura 11. Micrografia óptica de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. Raio dorsal da bolsa copuladora de um macho. Barra: 200 μm .

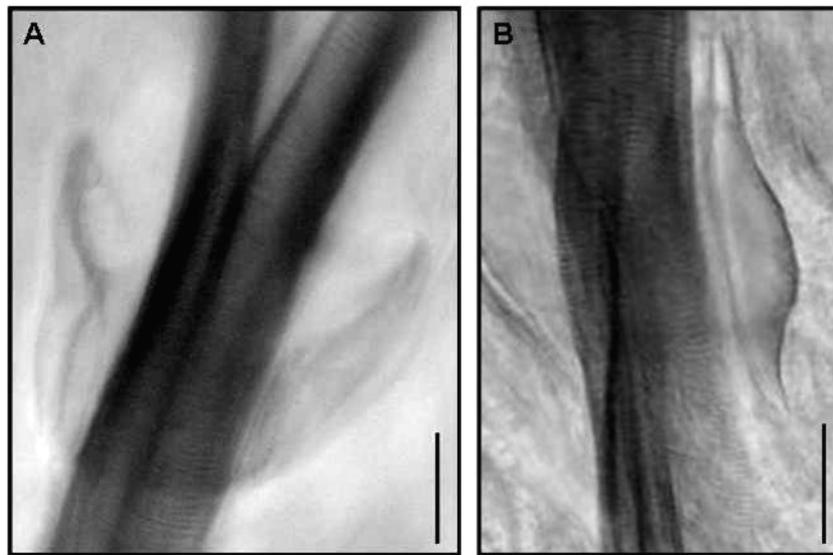


Figura 12. Micrografia óptica de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Gubernaculo de um macho, vista ventral; **B.** Gubernaculo de um macho, vista lateral. Barras: 30µm.

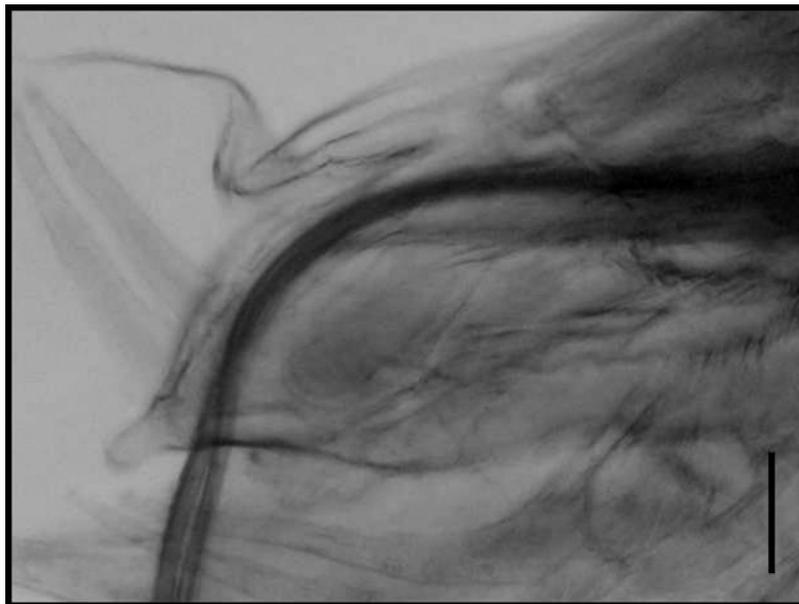


Figura 13. Micrografia óptica de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. Cone genital de um macho. Barra: 50 μm .

2.4.2.4. Fêmeas

Fêmeas maiores que os machos, com comprimento total de $17.396 \pm 541,6$ (16.451 – 18.491) largura mensurada na região mediana do corpo $774 \pm 26,2$ (726 – 821). Cápsula bucal com $250 \pm 27,7$ (211 – 314) de profundidade e $292 \pm 29,3$ (248 – 379) de largura. Comprimento do esôfago $1.244 \pm 47,1$ (1.134 – 1.329), largura alcançada na base do esôfago $354 \pm 42,0$ (309 - 495), razão entre o comprimento total do corpo pelo comprimento do esôfago 1:0.07, distância do anel nervoso até a extremidade anterior $680 \pm 33,3$ (631 - 731).

Apresentam ovários didélficos e útero prodélfico (Figuras 6 D e 14). Comprimento total do ovijetor $653 \pm 80,0$ (415 - 758). Vulva com lábios proeminentes, abrindo-se em uma fenda transversal próxima ao ânus à $420 \pm 49,4$ (311 - 510) da extremidade posterior (Figura 14). Algumas amostras das fêmeas apresentaram um inchaço cuticular ao nível da vulva (Figuras 14 e 15). Distância do ânus à extremidade posterior $223 \pm 27,9$ (172 - 274). Dimensão dos ovos nos estágios de mórula $79 \pm 6,0$ (69 - 95) por $51 \pm 27,9$ (43 - 59). Ponta da cauda pontiaguda com $179 \pm 22,8$ (146 - 231) de comprimento (Figuras 6, 14 e 15).



Figura 14. Micrografia óptica de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Extremidade posterior de uma fêmea com inchaço cuticular ao nível da vulva (seta), evidenciando vulva (v) e abertura do ânus (a); **B.** Extremidade posterior de uma fêmea sem inchaço cuticular ao nível da vulva, evidenciando vulva (v) e abertura do ânus (a). Barras: 200 μ m.

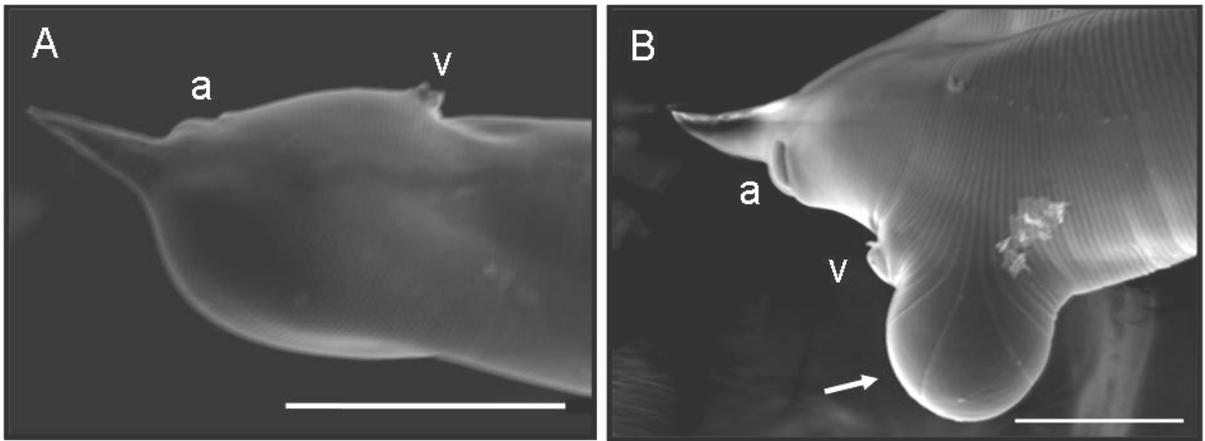


Figura 15. Micrografia eletrônica de varredura de *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*. **A.** Extremidade posterior de uma fêmea sem inchaço cuticular ao nível da vulva, evidenciando ponta da cauda em forma pontiaguda, abertura do ânus (a) e vulva (v). Barra 100 μm ; **B.** Extremidade posterior de uma fêmea com inchaço cuticular ao nível da vulva (seta), mostrando abertura do ânus (a) e vulva (v). Barra: 200 μm .

2.5. DISCUSSÃO

A carga parasitária de *C. struthionis* nos animais abatidos foi relativamente baixa com média de $56,6 \pm 37,04$. Embora não houve diferença estatística entre o número de machos e fêmeas ($p = 0,2690$), em dois avestruzes o número de machos foi pequeno em relação às fêmeas. Não foram encontrados trabalhos com dados de carga parasitária em cecos de avestruzes na literatura consultada, talvez pelo fato deste nematóide ser considerado não patogênico (HYCHZERMEYER, 2005). No entanto, nos sítios de localização dos parasitas foi observado edema na mucosa, indicando que outros trabalhos devem ser realizados a fim de verificar se com cargas parasitárias elevadas acarretam patologias.

A maioria dos trabalhos citam *C. struthionis* apenas pela semelhança de seus ovos com os do Trichostrongylidae *Libyostrongylus* spp., que também é parasita de avestruzes e responsável pela mortalidade de até 50% das aves jovens e ocasionalmente adultos (HUCHZERMEYER, 2005). A não diferenciação dos ovos dessas espécies dificulta o diagnóstico, podendo haver resultados falsos negativos para as infecções por *C. struthionis* ou vice versa.

2.5.1. Larvas Infectantes

As larvas infectantes foram caracterizadas como de *C. struthionis* de acordo com a morfologia da extremidade da cauda da larva (PONCE GORDO et al., 2002), com terminação aguda, diferente dos nematóides do gênero *Libyostrongylus* que apresentam uma protuberância na ponta da cauda (BARTON; SEWARD, 1993). Porém com cauda da bainha da larva longa e filamentosa semelhante à *L. dentatus* (EDERLI et al., 2008).

Foram verificadas diferenças extremamente significativas entre o comprimento total (Tabela 2), comprimento da cauda da bainha (Tabela 3) e razão entre o comprimento total e o comprimento da cauda da bainha (Tabela 4) das larvas infectantes de *C. struthionis* quando

comparadas com *L. douglassii* e *L. dentatus* ($p < 0,001$). Estas diferenças foram também observadas entre *L. douglassii* e *L. dentatus* por Ederli et al. (2008), no entanto, para o comprimento total entre estas duas espécies a comparação das medias foi menos significativa ($p < 0,05$).

Os resultados desta pesquisa, embora significativos, não permitem inferir que estes parâmetros sejam confiáveis no diagnóstico diferencial de *C. struthionis*. No entanto, Ederli et al. (2008) descreveram que o comprimento da cauda da bainha é um parâmetro confiável na diferenciação entre *L. douglassii* e *L. dentatus*.

É possível distinguir *L. douglassii* de *L. dentatus* e *C. struthionis* pela morfologia e comprimento da cauda da bainha que em *L. douglassii* é curta e com terminação aguda ao contrário das outras duas espécies que são longas e filamentosas. Para o diagnóstico diferencial entre *L. dentatus* e *C. struthionis* é mais confiável a utilização da morfologia da terminação da cauda da larva que, em *L. dentatus* apresenta uma protuberância arredondada na extremidade (BARTON; SEWARD, 1993), caractere este não observado em *C. struthionis*. Assim, este continua sendo o melhor parâmetro para a diferenciação entre estas duas espécies de nematóides gastrintestinais das avestruzes.

Tabela 2. Estatística descritiva das medidas de comprimento total de larvas infectantes de *Libyostrongylus douglassii*, *L. dentatus* e *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*, pelo Teste de Tukey.

Parâmetros	Espécies		
	<i>L. douglassii</i>	<i>L. dentatus</i>	<i>C. struthionis</i>
Número Amostral	58	60	62
Menor medida (µm)	784,47	947,01	642,41
Maior medida (µm)	957,90	856,04	598,25
Média	874,33 ^(A)	735,84 ^(B)	511,92 ^(C)
Desvio Padrão	33,80	43,63	25,15
Erro Padrão	4,44	5,63	3,19

^{A x B} Valor de P<0,05

^{A x C} Valor de P<0,001

^{B x C} Valor de P<0,001

Tabela 3. Estatística descritiva das medidas de comprimento da cauda da bainha de larvas infectantes de *Libyostongylus douglassii*, *L. dentatus* e *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*, pelo Teste de Tukey.

Parâmetros	Espécies		
	<i>L. douglassii</i>	<i>L. dentatus</i>	<i>C. struthionis</i>
Número Amostral	58	60	62
Menor medida (μm)	20,62	40,01	85,87
Maior medida (μm)	36,31	84,01	147,18
Média	29,52 ^(A)	61,20 ^(B)	110,74 ^(C)
Desvio Padrão	4,11	9,52	13,46
Erro Padrão	0,54	1,23	1,71

^{A x B} Valor de $P < 0,001$

^{A x C} Valor de $P < 0,001$

^{B x C} Valor de $P < 0,001$

Tabela 4. Estatística descritiva da razão do comprimento total sobre o comprimento da cauda da bainha de larvas infectantes de *Libyostrongylus douglassii*, *L. dentatus* e *Codiostomum struthionis* de avestruzes, *Struthio camelus*, pelo Teste de Tukey.

Parâmetros	Espécies		
	<i>L. douglassii</i>	<i>L. dentatus</i>	<i>C. struthionis</i>
Número Amostral	58	60	62
Menor medida (μm)	23,26	10,81	4,20
Maior medida (μm)	42,38	20,32	7,48
Média	30,22 ^(A)	14,29 ^(B)	5,47 ^(C)
Desvio Padrão	4,61	2,17	0,64
Erro Padrão	0,60	0,28	0,08

^{A x B} Valor de $P < 0,001$

^{A x C} Valor de $P < 0,001$

^{B x C} Valor de $P < 0,001$

2.5.2. Adultos

Os caracteres observados nos parasitas adultos foram característicos da família Strongylidae, e estão de acordo com os trabalhos de Popova, 1955; Lichtenfels, 1980 e Soulsby, 1982, realizados através de microscopia óptica, o que caracteriza o parasita como *C. struthionis*.

Foi observado através de microscopia eletrônica de varredura dois pares de papilas cefálicas arredondadas e um par de anfídeos (Figura 9), características estas, não descritas anteriormente nesta espécie. Segundo Popova (1955) o raio 4 da bolsa copuladora se aproxima do raio 5, e nesta pesquisa foi observado que a terminação do raio 4 sobrepõe-se ao raio 5 (Figura 6 F).

Morfométricamente não foram observadas diferenças expressivas nas medidas descritas por Popova (1955) e Skrjabin et al. (1952) *apud* Popova (1955). A diferença observada na largura do corpo (Tabelas 5 e 6) é devido ao sítio de realização das medidas, onde nesta pesquisa, a mensuração foi feita na região mediana do corpo, enquanto Popova (1955) mensurou a extremidade posterior do parasita (Tabelas 5 e 6). O mesmo pode ser observado com as medidas da largura da cápsula bucal onde as medidas foram realizadas em locais distintos do parasita (Tabela 2). Foi observado diferenças nas medidas de comprimento do gubernáculo, característica esta que não influencia na identificação do nematóide em questão. Embora morfometricamente diferente, o gubernáculo teve morfologia semelhante a uma “folha” em vista lateral (Figura 6 G), como descrito por Lichtenfels (1980) e em forma de “gôndola” em vista ventral (Figura 6 H), como descrito por Popova (1955).

Como em alguns nematóides, observou-se em algumas fêmeas, um inchaço cuticular ao nível da vulva (POPOVA, 1955). Esta pesquisa confirmou este caractere através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 15), onde se observou uma dilatação da cutícula, vista pelo afastamento das estriações transversais.

Quanto a morfometria das fêmeas de *C. struthionis*, como já discutido para os machos, as diferenças nas medidas da largura do corpo e da largura da cápsula bucal foram devidas à locais de mensuração distintos realizados por Skrjabin et al. (1952) *apud* Popova (1955) e Popova (1955) e a desta pesquisa. Exceto ao comprimento total do ovijetor, que nas medidas de Popova (1955) foram expressivamente superiores (Tabela 3).

Outra diferença morfométrica encontrada deve ser explicada por um erro de digitação no trabalho de Popova (1955) onde expressou o comprimento do ovo, 630 μm , por uma largura de 30 μm (Tabela 2). Como a medida da largura do ovo do presente trabalho foi de 51 (43 – 59) foi próximo à largura verificada por Popova (1955), o comprimento também deve ser proporcional ao de nossa pesquisa, 79 (69 – 95). Assim, a medida do comprimento do ovo encontrado por Popova (1955) deve ser de 63 μm e não 630 μm .

Tabela 5. Medidas em micrometros de machos de *Codiostomum struthionis* (Horst, 1885) Railliet e Henry, 1911 parasita de avestruzes, *Struthio camelus*, médias com maior e menor medida entre parênteses.

Caracteres	<i>Codiostomum struthionis</i>		
	Skrjabin et al. (1952)	Popova (1955)	Presente pesquisa
Comprimento Total	9.740 – 17.250	13.000	15.341 (13.923 – 16.782)
Largura	280 – 350 ^a	450 ^b	628 (551 - 688) ^a
Profundidade da Cápsula Bucal	210 - 250	280	249 (216 - 286)
Largura da Cápsula Bucal	180 – 250 ^c	100 ^d	261 (236 - 289) ^c
Largura do Esôfago	940 – 1.130	-	1.163 (1.061 – 1.248)
Esôfago/Comprimento do Corpo	-	0,08	1:0,07
Largura do Esôfago	210 – 410 ^e	450 ^e	328 (306 - 374) ^e
Anel Nervoso	530 – 581 ^f	-	633 (527 - 695) ^f
Comprimento do Espículo	996 – 1.112	1.000	1.041 (916 – 1.183)
Comprimento do Gubernáculo	108 - 130	84	86 (66 - 105)

^a Mensurado na região mediana do corpo

^b Mensurado na região anterior

^c Mensurado na região mediana da cápsula bucal

^d Mensurado ao nível da abertura oral

^e Medido na base do esôfago

^f Medido a partir da extremidade anterior

Tabela 6. Medidas em micrometros de fêmeas de *Codiostomum struthionis* (Horst, 1885) Railliet e Henry, 1911 parasita de avestruzes, *Struthio camelus*, médias com maior e menor medida entre parênteses.

Caracteres	<i>Codiostomum struthionis</i>		
	Skrjabin et al. (1952)	Popova (1955)	Presente pesquisa
Comprimento Total	15.520 – 20.990	17.000	17.396 (16.451 – 18.491)
Largura	330 – 690 ^a	560 ^a	774 (726 - 821) ^a
Profundidade da Cápsula Bucal	210 - 260	280	250 (211 - 314)
Largura Cápsula Bucal	190 – 240 ^b	100 ^c	292 (248 - 379) ^b
Comprimento do Esôfago	990 - 1310	-	1.244 (1.134 – 1.329)
Esôfago/Comprimento do Corpo	-	1:0,07	1:0,07
Largura do Esôfago	330 – 390 ^d	450 ^d	354 (309 - 495) ^d
Anel Nervoso	590 - 640 ^e	660 ^e	680 (631 - 731) ^e
Comprimento do Ovíjeto	-	1.500	653 (415 - 758)
Comprimento do Ovo	-	630	79 (69 - 95)
Largura do Ovo	-	30	51 (43 - 59)
Vulva	340 – 450 ^f	-	420 (311 - 510) ^f
Ânus	160 - 250 ^f	232 ^f	223 (172 - 274) ^f
Ponta da Cauda	-	188	179 (146 - 231)

^a Mensurado na região mediana do corpo

^b Mensurado na região mediana da cápsula bucal

^c Mensurado ao nível da abertura oral

^d Mensurado na base do esôfago

^e Mensurado a partir da extremidade anterior

^f Mensurado a partir da extremidade posterior

2.6. CONCLUSÕES

- Os parasitas encontrados nos cecos das avestruzes pertencem à espécie *Codiostomum struthionis*.
- A prevalência deste parasita verificado em 90% dos animais examinados permite inferir que a ocorrência deste parasita é subestimada.
- *Codiostomum struthionis* provavelmente está distribuído nos rebanhos de avestruzes do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, de forma enzoótica.

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTON, N.J., SEWARD, D.A. Detection of *Libyostongylus douglassii* in ostriches in Australia. **Austrasian Veterinary Journal**. v. 70, p. 31-32. 1993.

BLACK, D. Ostrich flock health. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. v. 10, p. 117-130. 2001.

CRAIG, T.M., DIAMOND, P.L. Parasites of ratites. In: TULLY, T.N., SHANE, S.N., (Eds), **Ratite management, Medicine and Surgery**. Kreiger Publishing Company, Florida, pp. 115-126. 1996

DURETTE-DESSET, M.C., CHABAUD, A.G. Nouvel essai de classification des Nématodes Trichostrongyloidea. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. v. 56, p. 539-558. 1981.

EDERLI, N.B., OLIVEIRA, F.C.R., LOPES, C.W.G., DAMATTA, R.A., SANTOS, C.P., RODRIGUES, M.L.A. Morphological diagnosis of infective larvae of *Libyostongylus douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 and *L. dentatus* Hoberg, Lloyd and Omar, 1995 (Nematoda, Trichostrongylidae) of ostriches. **Veterinary Parasitology**. “in press”. 2008.

FOREYT, W.J. Parasitas de ratitas. **Parasitologia Veterinária –Manual de Referência**. 5ed. Roca: São Paulo,SP. p. 181-184. 2005.

GORDON, N.M., WITHLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Council Scientific Industry Research Australia**. v. 12, p. 50-52. 1939

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

HUCHZERMEYER, F.W. **Doenças de avestruzes e outras ratitas**. 2ed. Jaboticabal, SP. Funep. 2005. 392 p.

LICHTENFELS, J.R. (1980). Keys to the genera of the Superfamily Strongyloidea. *In*: Anderson, R.C., Chabaud, A.G., Willmott, S. (eds.). **CIH Key to the nematode parasites of vertebrates**. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks. 1980. p. 1-41.

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

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

PONCE GORDO, F., HERRERA, S., CASTRO, A.T., GARCÍA DURAN, B., MARTÍNEZ DÍAS, R.A. Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 137-160, 2002.

POPOVA, T.I. **Essential of nematology. Volume V: Strongyloids of animals and man (Strongylidae)**. U.S. Department of Agriculture and National Sciences Foundation. Washington, DC, 1955. p. 155-158.

RAILLIET, A., HENRY, A. Les helminthes du nandou. **Bulletin de la Société Nationale D'Acclimatation**. V. 58, p. 573-582. 1911.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3ed., Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia: Belo Horizonte, 2007. 264p.

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

SOULSBY, E.J.W. **Helminthes, arthropods and protozoa in domesticated animals**. 7ed., Bailliere Tindall, London: Lea and Febiger, Philadelphia, 824 pp. 1982.

TIŠLJAR, M., BECK, R., COOPER, R.G., MARINCULIĆ, A., TUDJA, M., LUKAČ-NOVAK, I., GRABAREVIĆ, Ž., PERKOVIĆ-HERAK, V., ŠIMPRAGA, B. First finding of libyostromylosis in farm-reared ostriches (*Struthio camelus*) in Croatia: Unusual histopathological finding in brain of two ostriches, naturally infected with *Libyostromylus douglasi*. **Veterinary Parasitology**. v. 147, p. 117-124, 2007.

3. CONCLUSÕES GERAIS

- Através da morfologia das larvas infectantes é possível o diagnóstico diferencial de *Libyostrongylus douglassii*, *L. dentatus* e *Codiostomum struthionis*.
- Há uma prevalência elevada de nematóides, tanto do gênero *Libyostrongylus* como de *Codiostomum struthionis* nas avestruzes no Estado do Rio de Janeiro.
- *Codiostomum struthionis* pode estar sendo subnotificado nos rebanhos de avestruzes no Brasil e no mundo.
- Trabalhos que melhor caracterizam a patologia de *C. struthionis* nas avestruzes devem ser realizados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ACAB **Associação dos Criadores de Avestruzes do Brasil**. Disponível em: <http://www.acab.org.br> . Acesso em: Dezembro de 2007.

AICHINGER, A., MARTINS, N.R., SOUZA, J.D., RESENDE, J.S., MUNIZ, R., FERREIRA, W.M. O avestruz no Brasil e no mundo. **Revista Veterinária e Zootécnica em Minas**. V. 27, p. 36-39. 2007.

BARTON, N.J., SEWARD, D.A. Detection of *Libyostrongylus douglassii* in ostriches in Australia. **Australian Veterinary Journal**. v. 70, p. 31-32. 1993.

BASTIANELLO, S., MCKENNA, P.B., HUNTER, J., JULIAN, A. Clinical and pathological aspects of *Libyostrongylus* infection in ostriches. **Surveillance**. V. 32, p. 3-6. 2005

BLACK, D. Ostrich flock health. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. v. 10, p. 117-130. 2001.

BONADIMAN, S.F., SALES, A.K.P., SANTOS, C.P., DAMATTA, R.A. Occurrence of *Libyostrongylus* sp. (Nematoda) in ostriches (*Struthio camelus*) in the North Fluminense region: preliminary results. IN: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-americano de Rickettsioses, Ouro Preto. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 2004. v. 23, p.253-253. 2004.

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

BUTTON, N.J., BARTON, N.J., VEALE, P.I., OVEREND, D.J. A survey of *Libyostrongylus douglassii* on ostriches farms in Eastern Victoria. **Australian Veterinary Journal**. v. 70, p. 76.1996.

CARRER, C.C., KORNFIELD, M.E. **A criação de avestruzes no Brasil**. Editora do Brasil: Pirassununga. 1999. 304 p.

COBBOLD, T.S. New entozoon from the ostriches. **Journal of the Linnean Society**. v. 16, p. 184-188. 1882.

COOPER, R.G. Bacterial, fungal and parasitic infections in the ostrich (*Struthio camelus* var. *domesticus*). **Animal Science Journal**. v. 76, p. 97-106. 2005.

CRAIG, T.M., DIAMOND, P.L. Parasites of ratites. In: TULLY. T.N., SHANE, S.N., (Eds), **Ratite management, Medicine and Surgery**. Kreiger Publishing Company, Florida, pp. 115-126. 1996

EDERLI, N.B. Diagnóstico e caracterização morfológica de *Libyostrongylus douglassii* e *L. dentatus* (Nematoda: Trichostrongylidae) em avestruzes das regiões Norte e Baixada Litorânea do Estado do Rio de Janeiro. (Monografia) Ciências Biológicas. **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF)**, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ. 61p. 2006.

EDERLI, N.B., BONADIMAN, S.F., MORAES NETO, A.H.A., 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 morphological characterization of adults. **Veterinary Parasitology**. v. 151, p. 227-232, 2008.

EDERLI, N.B., OLIVEIRA, F.C.R., LOPES, C.W.G., DAMATTA, R.A., SANTOS, C.P., RODRIGUES, M.L.A. Morphological diagnosis of infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 and *L. dentatus* Hoberg, Lloyd and Omar, 1995 (Nematoda, Trichostrongylidae) of ostriches. **Veterinary Parasitology**. v. 155, p. 323, 327, 2008.

FOCKEMA, A., MALAN, F.S., COOPER, G.G., VISSER, E. Anthelmintic efficacy of f mebendazole against *Libyostrongylus douglassii* and *Houttuynia struthionis* in ostriches. **Journal of South Africa Veterinary Association**. v. 56, p. 47-48. 1985.

FOREYT, W.J. Parasitas de ratitas. **Parasitologia Veterinária –Manual de Referência**. 5ed. Roca: São Paulo, SP. p. 181-184. 2005.

FOWLER, M.E. Comparative clinical anatomy of ratites. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 22(2), p. 204. 1991.

FUDGE, A.M. Hematology and chemistry of ratites. *In*: TULLY, T.N., SHANE, S.N., (Eds), Ratite management, **Medicine and Surgery**. Kreiger Publishing Company, Florida, pp. 105-114. 1996.

GILBERT, L.I. New nematode *Libyostrongylus magnus*, n. sp., parasitic in an African ostrich. In Papers on helminthology, 30 year jubilee (K.J. Skrjabin, ed.). **Lenin Academy of Agricultural Science**, Moscow, 180-182. 1937.

GOMES, R.A., NASCIMENTO, A.A., BONUTI, M.R., NASCIMENTO, C.G., TEBALDI, J.H., ZETTERMANN, C.D. Ocorrência de *Libyostrongylus* sp. (Nematoda: Trichostrongylidae) em avestruzes (*Struthio camelus*) no estado de São Paulo, Brasil. **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, RJ CD-ROM R313. 2002

GORDON, N.M., WITHLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Council Scientific Industry Research Australia**. v. 12, p. 50-52. 1939

HANSEN, J., PERRY, B., **The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants**. ILRAD, Nairobi, Kenya. 171 p. 2004.

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

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

HUCHZERMEYER, F.W. **Doenças de avestruzes e outras ratitas**. 2ed.. Funep. Jaboticabal, SP, 2005. 392 p.

JANSSON, D.S., CHRISTENSSON, D.A., CHRISTENSSON, B.E. Winter survival in Sweden of L₃-stage larvae of the ostrich wireworm *Libyostrongylus douglassii*. **Veterinary Parasitology**. v. 106, p. 69-74. 2002.

LANE, C. Some Strongylata. **Parasitology**. v. 15, p. 346-364. 1923.

LICHTENFELS, J.R. (1980). Keys to the genera of the Superfamily Strongyloidea. *In*: Anderson, R.C., Chabaud, A.G., Willmott, S. (eds.). **CIH Key to the nematode parasites of vertebrates**. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks. 1980. p. 1-41.

MACKERETH, G. *Libyostrongylus douglassii* in New Zealand ostriches. **Surveillance**. v. 31, p. 14-16. 2004.

MALAN, F.S., GRUSS, B., ROPER, N.A., ASHBURNER, A.J. & DUPLESIS, C.A. Resistance of *Libyostrongylus douglassii* in ostriches to levamisole. **Journal of the South African Veterinary Association**. v. 59, p. 202-203. 1988.

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

MORE, S.J. The performance of farmed ostriches hens in eastern Australia. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 29, p. 107-120. 1996.

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 avestruzes (*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, p. 169-176. 2007.

MUKARATIRWA, Z.M., CINDZI, MAONONGA, D.B. Prevalence of *Libyostrongylus douglassii* in commercially reared ostriches in the highveld region of Zimbabwe. **Journal of Helminthology**. v. 78, p. 333-336. 2004.

ORTLEPP, R.J. South African helminthes, Part VI. Some helminthes, chiefly from rodents. **Onderstepoort Journal of Veterinary Sciences and Animal Industry**. v. 12, p. 75-101. 1939.

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

PINTORI, A., SCALA, A., GIANNETTO, S., MASCIA, M., DE ROSA, R. Parasitoses of ostriches (*Struthio camelus*) in Sardinia (Italy). **Acta Parasitologica**. v.45, p. 164. 2000.

PONCE GORDO, F.P., 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.

POPOVA, T.I. **Essential of nematodology. Volume V: Strongyloids of animals and man (Strongylidae)**. U.S. Department of Agriculture and National Sciences Foundation. Washington, DC, 1955. p. 155-158.

RAILLIET, A., HENRY, A. Les helminthes du nandou. **Bulletin de la Société Nationale D'Acclimatation**. V. 58, p. 573-582. 1911.

REINECKE, R.K.. **Veterinary helminthology**, Butterworth Durban, 295 pp. 1983.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3ed., Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia: Belo Horizonte, 2007. 264p.

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

SOULSBY, E.J.W. **Helminthes, arthropods and protozoa in domesticated animals**. 7ed., Bailliere Tindall, London: Lea and Febiger, Philadelphia. 824 pp. 1982.

TIŠLJAR, M., BECK, R., COOPER, R.G., MARINCULIĆ, A., TUDJA, M., LUKAČ-NOVAK, I., GRABAREVIĆ, Ž., PERKOVIĆ-HERAK, V., ŠIMPRAGA, B. First finding of libyostromylosis in farm-reared ostriches (*Struthio camelus*) in Croatia: Unusual histopathological finding in brain of two ostriches, naturally infected with *Libyostromylus douglasi*. **Veterinary Parasitology**. v. 147, p. 117-124, 2007.

Viçosa On-line: **Curso de Criação de Avestruz**. UFV, 2002.

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

ANEXOS

Artigos Referentes à Dissertação de Mestrado

Short communication

Morphological diagnosis of infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 and *L. dentatus* Hoberg, Lloyd and Omar, 1995 (Nematoda: Trichostrongylidae) of ostriches

Nicole Brand Ederli^{a,b,d}, Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira^b,
Carlos Wilson Gomes Lopes^c, Renato Augusto DaMatta^d,
Clóvis de Paula Santos^{d,*}, Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues^a

^a Laboratório de Helminologia, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV),
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil

^b Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Clínica Médica dos Grandes Animais Domésticos, Hospital Veterinário,
Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), 28013-602,
Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

^c Laboratório de Coccídios e Coccidioses, DPA, IV, UFRRJ, RJ, Brazil

^d Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF, RJ, Brazil

Received 19 December 2007; received in revised form 11 April 2008; accepted 21 April 2008

Abstract

The differentiation of the species of the *Libyostrongylus* genus is only possible with the obtainment of the adult parasites in the ostriches proventriculus and gizzard. The present work confirms that it is possible to differentiate the infective larvae of *L. douglassii* and *L. dentatus* allowing the differential diagnosis of these species by fecal culture. To show this, adult females from both species were collected from ten proventriculus from adult ostriches and separated by species. Both groups were macerated individually added to sterilized feces for standard fecal cultures. The infective larvae were recovered, identified, quantified and measured. All proventriculus analyzed were parasitized by *Libyostrongylus* spp. and a clear heterogeneous location for each species was observed. The infective larvae from the fecal cultures of macerated *L. douglassii* presented a mean total length of $874.3 \pm 33.80 \mu\text{m}$, and a short sheath tail ($29.5 \pm 4.11 \mu\text{m}$) with acute termination. The infective larvae from the macerated *L. dentatus* presented mean total length of $856.0 \pm 43.63 \mu\text{m}$, long sheath tail ($61.2 \pm 9.52 \mu\text{m}$) with filamentous termination. The mean measures of the tails of both species had a significant difference. The differentiation of the infective larvae of *L. douglassii* and *L. dentatus* by fecal cultures will facilitate the diagnosis of both species for further understanding the *Libyostrongylus* biology.
© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Libyostrongylus douglassii*; *Libyostrongylus dentatus*; *Struthio camelus*; Nematoda; Trichostrongylidae

1. Introduction

Nematodes of the *Libyostrongylus* genus are small hematophagous worms found below the proventriculus membrane of ostriches (McKeena, 2005). These parasites are responsible for 50% mortality of juvenile ostriches, occasionally killing adults (Reinecke, 1983;

* Corresponding author. Tel.: +55 021 22 2726 1524;
fax: +55 021 22 2726 1520.

E-mail address: cps@uenf.br (C.P. Santos).

Sotiraki et al., 2001). This genus is from the Trichostrongylidae family and is composed by the species *L. douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923, *L. magnus* Gilbert, 1937 and *L. dentatus* Hoberg, Lloyd and Omar, 1995. *L. douglassii* has been noticed in ostriches in Africa (Cobbold, 1882), Australia (Barton and Seward, 1993), Europe (Ponce Gordo et al., 2002), North (Hoberg et al., 1995) and South America (Bonadiman et al., 2006; Ederli et al., 2008), while *L. dentatus* only in the American continent (Hoberg et al., 1995; Bonadiman et al., 2006; Ederli et al., 2008) and *L. magnus* just in Africa (Hoberg et al., 1995).

Libyostrongylus spp. diagnosis includes clinical manifestations such as: anorexia, weight loss, anemia and proventricular impactation (Huchzermeyer, 1998). Confirmation is achieved by the finding of typical Trichostrongylidae eggs in feces, with subsequent fecal culture to differentiate infective larvae of species such as *Codiostomum struthionis*, a Strongylidae parasite of the cecum not considered pathogenic. The differentiation of the *Libyostrongylus* species is possible only by the characterization of adults that need to be collected during necropsy of the proventriculus or gizzard. However, our group has recently reported significant size differences of the sheath tail of two types of infective larvae obtained by fecal cultures (Bonadiman et al., 2006). It was suggested that the morphology of the infective larvae could be used for diagnosis and, thus, a mixed infection of *L. douglassii* and *L. dentatus* was probably present. The mixed infection was confirmed by necropsies of proventriculus and adult worm analyses (Ederli et al., 2008). Here, we confirmed the diagnosis hypothesis proposed before (Bonadiman et al., 2006). Female adults of *L. douglassii* and *L. dentatus* were speciated, macerated, eggs cultured, and infective larvae were analyzed morphologically. These results show that it is possible to differentiate both species without necropsy, thus, allowing the species diagnosis by fecal cultures, which will provide a better understanding of the biology of both species and its prevalence all over the world.

2. Materials and methods

2.1. Adult nematode collection

Ten adult ostriches from Rio de Janeiro state, Brazil were sacrificed for the collection of adult worms. The proventriculus were separated from the digestive system, emptied, conditioned in plastic bags and transported to the laboratory in isothermal boxes. Species of the genus *Libyostrongylus* were collected

with the aid of a brush under a stereo microscope and transferred to petry dishes with a 0.9% saline solution at room temperature until the separation by sex and species.

2.2. Obtainment of infective larvae and microscopic characterization

Females of *L. douglassii* and *L. dentatus* were separated according to the length of the body, ovojector, the presence or lack of cuticular inflation at the anus level and esophageal teeth (Hoberg et al., 1995; Ederli et al., 2008). Five groups containing 100 females each were obtained and kept in 15 ml Falcon tubes containing 4 ml of saline solution. Females of each group were macerated with a pestle in the solution. Two grams of autoclaved dry feces and wood chops were added to the macerated females until the right consistence and dryness were obtained. This mixture was transferred to plastic cups (50 ml) followed by the established coproculture technique (Bonadiman et al., 2006). Infective larvae were transferred to Falcon tubes (15 ml) and stored in a refrigerator. After 24 h, the larvae were identified, quantified and measured. This procedure was done with an "OPTON" light microscope, model "TNB-04D" equipped with the "Microscopy Image Processing System-DN2 for windows" software, using 100 and 400 magnification. Larvae were also drawn with the aid of an Axioplan Zeiss light microscope equipped with a camera lucida. For scanning electron microscopy larvae were processed as before (Bonadiman et al., 2006).

2.3. Statistical analyses

The mean, standard deviation and standard error of measurements of (a) total length, (b) sheath tail length and (c) the ratio between both measures were calculated. Maximum and minimum values were also presented. The Student's *t*-test was used to compare the values. Pearson correlation was also used to compare the total length of the larvae and the length of the sheath tail. All calculations were done by using the Graph Pad InStat program, version 3–05 for Windows.

3. Results

All analyzed proventriculus had both species of *Libyostrongylus*. When the koilin layer was removed it was easy to observe *L. douglassii* at the inner surface of this membrane and at the tissue of the proventriculus. On the other hand, *L. dentatus* was inserted in the koilin

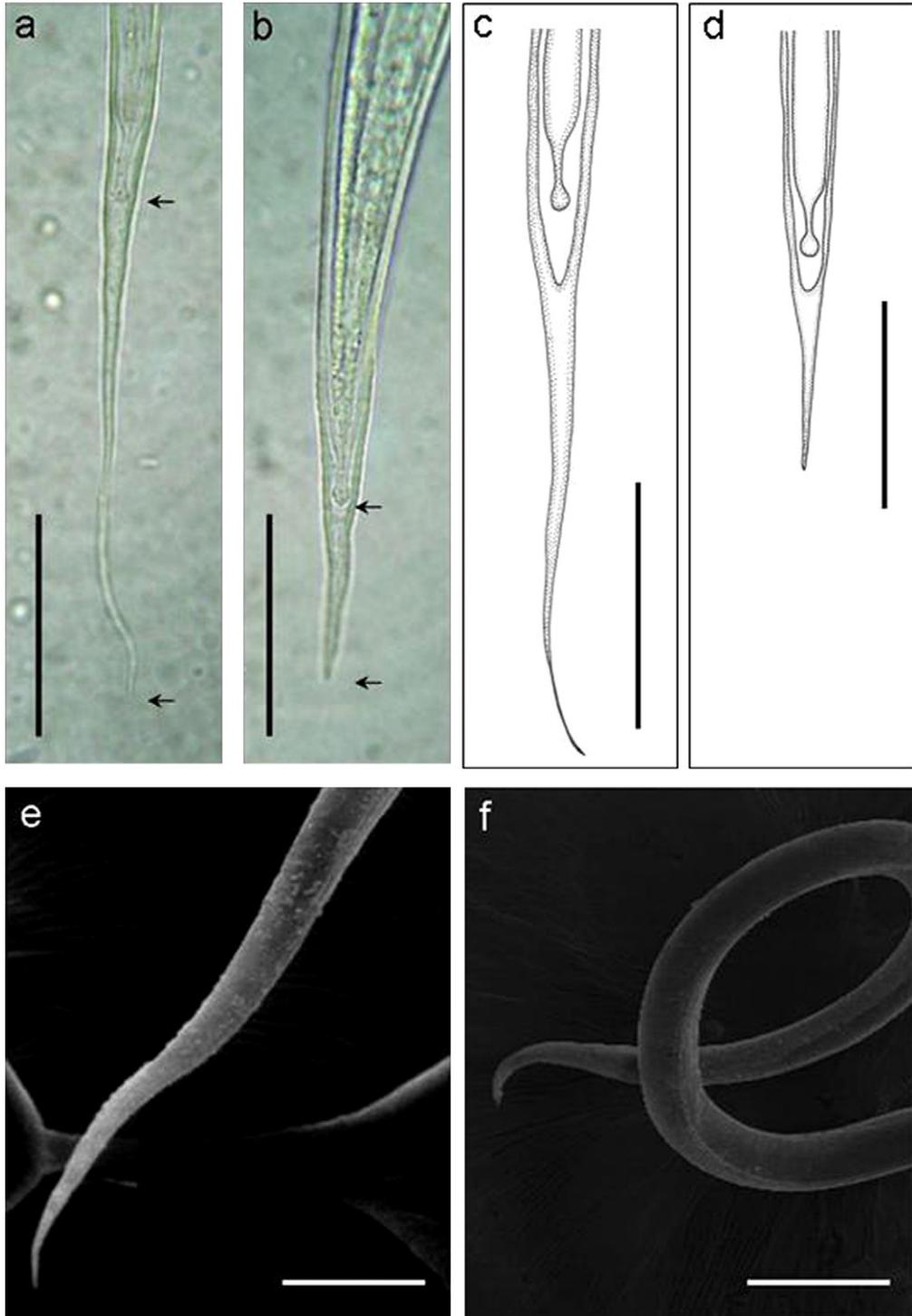


Fig. 1. Infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* and *L. dentatus*. (a and b) Light microscopy; (c and d) hand drawings; (e and f) scanning electron microscopy. a, c, and e: *L. dentatus*. b, d, and f: *L. douglassii*. Arrows indicate the beginning of the sheath tail. Bars: 30 μm.

Table 1
Total infective larvae and sheath tail length measurements (μm) and the ratio between both values for *Libyostongylus douglassii* and *L. dentatus*

Parameters	Species	
	<i>L. douglassii</i> (58) ^a	<i>L. dentatus</i> (60) ^a
Total length	874.33 \pm 33.80 ^b (957.90–784.47) ^c	784.47 \pm 43.63 (947.01–735.84)
Sheath tail	29.52 \pm 4.11 ^b (36.31–20.62)	61.20 \pm 2.17 (84.01–40.01)
Ratio	30.20 \pm 4.58 ^b (42.38–23.25)	14.29 \pm 2.17 (20.32–10.81)

^a Number of evaluated larvae.

^b Significantly different from values for *L. dentatus* as calculated by the Student's *t*-test. *P* = 0.0124 for total length, <0.0001 for sheath tail and =0.0001 for the ratio.

^c Larger and smaller size observed.

layer with a reeled formation. The absolute number of both adults were not quantified, however, because adult females were separated in equal groups we can surely affirm that *L. douglassii* dominated the examined proventriculus.

All infective larvae had a characteristic spiny knob at their tail tip (Fig. 1a–d). Infective larvae from macerated *L. dentatus* had a filamentous termination of the tail (Fig. 1a, c and e) while larvae from the *L. douglassii* preparations possessed an acute tail ending (Fig. 1b, d and f).

The infective larvae from macerated *L. douglassii* presented a higher mean total length when compared to the *L. dentatus* larvae (Table 1). A highly significant difference between both preparations was detected when the length of the sheath tail was compared (Table 1). The values of the ratio of the total length by the length of the sheath tail were also significant different between both larvae (Table 1).

4. Discussion

Infection by *Libyostongylus* is a major parasitism of ostriches (Reinecke, 1983) spread all over the world (Cobbold, 1882; Barton and Seward, 1993; Ponce Gordo et al., 2002; Hoberg et al., 1995; Bonadiman et al., 2006; Ederli et al., 2008). Although there are three species of *Libyostongylus*, only *L. douglassii* and *L. dentatus* have been reported outside Africa. In addition, *L. dentatus* has been detected only by two research groups (Hoberg et al., 1995; Ederli et al., 2008), showing that this species has not been found or is being neglected by others investigators. We demonstrated that it is possible to differentiate infective larvae of both

species by the size of the sheath tail and the shape of its ending. Furthermore, we found that *L. douglassii* was more common in the proventriculus examined and was also differently located when compared to *L. dentatus*. These findings confirmed that the morphological differentiation of the infective larvae can be used to diagnose both species of this genus as proposed before (Bonadiman et al., 2006) and will further assist the understanding of the distribution, biology and pathology of *Libyostongylus*.

For the first time it was observed that *L. douglassii* was in higher numbers when compared to *L. dentatus* as well as differences in the location of both species at the koilin layer. Because these nematodes are small, it is easy to neglect them, leading to false negative diagnoses. This might explain the small number of articles that describe this species after necropsies (Hoberg et al., 1995; Ederli et al., 2008). Thus, the information needs to be taken into account for a clear diagnosis of the parasitism. The different localization of both species needs also to be taken into consideration to understand the pathology caused by these parasites.

All articles blame *L. douglassii* for the proventricular impaction that leads to ostriches death (More, 1996; Sotiraki et al., 2001; Mackereth, 2004; Mukaratirwa et al., 2004; Tišljarić et al., 2007). Although we found a greater number of this species in the proventriculus examined, we cannot rule out that *L. dentatus* is responsible for the pathology. Furthermore, both parasites might need to be together to cause pathology. Further studies are necessary to better understand the pathology caused by these parasites.

Although differences between total lengths of the larvae were observed, the diagnosis by larval size could lead to mistakes due to the elevated standard deviation. However, the statistical differences observed for the tail size (Table 1) with a small standard deviation clearly shows that the differentiation of both species can be achieved by this character. In addition, the terminal morphology of the infective larvae tail (acute versus filamentous ending) between *L. douglassii* and *L. dentatus* obtained by fecal cultures is of further help in the diagnosis of both species confirming the hypothesis proposed by Bonadiman et al. (2006). Furthermore, the means of the ratio of the total length by the sheath tail length of the infective larvae compared between species was significantly different. Thus, this parameter can be of further used to confirm mixed infections of *L. douglassii* and *L. dentatus* in ostriches.

This study shows that it is possible to differentiate morphologically infective larvae of *L. douglassii* and *L. dentatus* obtained by laboratory fecal culture. Thus, the

diagnosis of the infections by this simple lab procedure will allow not only the extent of the mixed infection but also the study of the distribution of these parasites in these birds. The presence of *L. douglassii* and *L. dentatus* in 100% of the analyzed animals in this study suggests that mixed infections might be common and should be further investigated. Studies on the distribution of these species, as well as their pathogenicity are necessary to understand the damage caused to ostriches and productive losses.

Acknowledgments

The authors would like to thank Andr ea Carvalho C esar for proof reading the manuscript and Fabiana Valad o Massad for technical assistance in the collection of the parasites. This study was supported by Coordena o de Aperfei amento de Pessoal de N vel Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Cient fico e Tecnol gico (CNPq), and Funda o Carlos Chagas Filho do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- Barton, N.J., Seward, D.A., 1993. Detection of *Libyostrongylus douglassii* in ostriches in Australia. *Aust. Vet. J.* 70, 31–32.
- Cobbold, T.S., 1882. New entozoon from the ostrich. *J. Linnean Soc.* 16, 184–1888.
- Bonadiman, S.F., Ederli, N.B., Soares, A.K.P., Moraes Neto, A.H.A., Santos, C.P., DaMatta, R.A., 2006. Occurrence of *Libyostrongylus* sp. (Nematoda) in ostriches (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) from the north region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Parasitol.* 137, 175–179.
- Ederli, N.B., Bonadiman, S.F., Moraes Neto, A.H.A., DaMatta, R.A., Santos, C.P., 2008. Mixed infection by *Libyostrongylus douglassii* and *L. dentatus* (Nematoda: Trichostrongylidae) in *Struthio camelus* (Ratites: Struthioniformes) from Brazil with further morphological characterization of adults. *Vet. Parasitol.* 151, 227–232.
- Hoberg, E.P., Lloyd, S., Omar, H., 1995. *Libyostrongylus dentatus* n. sp. (Nematoda: Trichostrongylidae) from ostriches in North America, with comments on the genera *Libyostrongylus* and *Paralibyostrongylus*. *J. Parasitol.* 81, 85–93.
- Huchzermeyer, F.W., 1998. Diseases of Ostriches and Other Ratites, vol. 16. Agricultural Research Council. Onderstepoort Veterinary Institute, Republic of South Africa, pp. 392.
- Mackereth, G., 2004. *Libyostrongylus douglassii* in New Zealand ostriches. *Surveillance* 31, 14–16.
- McKeena, P.B., 2005. *Libyostrongylus* infections in ostriches—a brief review with particular reference to their detection in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 53, 267–270.
- More, S.J., 1996. The performance of farmed ostrich hens in eastern Australia. *Prev. Med. Vet.* 29, 107–120.
- Mukaratirwa, S., Cindzi, Z.M., Maononga, D.B., 2004. Prevalence of *Libyostrongylus douglassii* in commercially reared ostriches in the highveld region of Zimbabwe. *J. Helminthol.* 78, 333–336.
- Ponce Gordo, F., Herrera, S., Castro, A.T., Garcia Duran, B., Martinez Diaz, R.A., 2002. Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Vet. Parasitol.* 107, 137–160.
- Reinecke, R.K., 1983. *Veterinary Helminthology*. Butterworth, Durban, p. 295.
- Sotiraki, S.T., Georgiades, G., Antoniadou-Sotiriadou, K., Himonas, C.A., 2001. Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*). *Vet. Rec.* 148, 84–86.
- Ti sljar, M., Beck, R., Cooper, R.G., Marinculi c, A., Tudja, M., Luka c-Novak, I., Grabarevi c,  .Z., Perkovi c-Herak, V.,  impraga, B., 2007. First finding of libyostrongylosis in farm-reared ostriches (*Struthio camelus*) in Croatia: unusual histopathological finding in brain of two ostriches, naturally infected with *Libyostrongylus douglasi*. *Vet. Parasitol.* 147, 117–124.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Veterinary Parasitology 157 (2008) 275–283

**veterinary
parasitology**

www.elsevier.com/locate/vetpar

Further study of *Codiostomum struthionis* (Horst, 1885) Railliet and Henry, 1911 (Nematoda, Strongylidae) parasite of ostriches (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) (Aves, Struthioniformes)

Nicole Brand Ederli ^{a,b}, Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira ^{b,*},
Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues ^a

^a *Laboratório de Helmintologia, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil*

^b *Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Clínica Médica dos Grandes Animais Domésticos, Hospital Veterinário, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Av. Alberto Lamego 2000, 28013-602 Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil*

Received 6 May 2008; received in revised form 10 July 2008; accepted 14 July 2008

Abstract

Codiostomum struthionis is a nematode parasite of the ostrich caecum. Little is known about its pathology, being considered by many authors as a non-pathogenic parasite. Infections by *C. struthionis* are sometimes overlooked because its eggs are indistinguishable from another ostrich nematode, *Libystrongylus* spp. Fecal cultures and infective larvae identification are necessary for proper identification. The aim of this study is to provide improved morphological characterization of adults and infective larvae of *C. struthionis*. Ten caeca of adult ostriches were collected and washed in 0.09% saline solution. Male and female nematodes were collected and quantified separately. Nematodes were fixed in A.F.A. for optical microscopy or fixed in Karnovsky solution for scanning electron microscopy. To obtain infective larvae, fecal samples were collected at sites of high concentration of parasites in the caeca and fecal cultured. The resultant larvae were identified and measured with light microscope at 400×. Nine of the 10 slaughtered ostriches were parasitized by *C. struthionis*. All nematodes were found in the distal third of the caeca. A total of 566 parasites were recovered (234 males and 332 females). All the cultured larvae had characteristics of *C. struthionis* (rounded cephalic region with a flat extremity, an acute larvae tail termination and a long and filamentous sheath tail). All the adult parasites were characterized as *C. struthionis*. Through the analysis of the infective larvae it was determined that the morphology of the larvae tail was the best trait to use in the distinction of this species (live bird diagnosis).

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Strongylidae; *Codiostomum struthionis*; Ostriches; *Struthio camelus*; Ratite; Nematoda; Infective larvae

1. Introduction

The most frequent gastrointestinal parasites reported in ostriches are the helminthes, *Libystrongylus* spp., *Houttuynia struthionis* and *Codiostomum struthionis* (Craig and Diamond, 1996). *C. struthionis* is a parasite of the caeca, where it feeds on the caecal mucus, and is

* Corresponding author. Tel.: +55 21 22 27262061;
fax: +55 21 22 27261673.

E-mail address: foliveira@uenf.br (F.C.R. de Oliveira).

considered specific to the ostrich (Craig and Diamond, 1996). It was originally described as *Sclerostoma struthionis* by Horst in 1885. In 1911, Railliet and Hanry established the genus *Codiostomum*, with *C. struthionis* the only species of this genus. Since then there has been little research regarding this nematode. It has been found in Europe (Ponce Gordo et al., 2002), South Africa (Popova, 1955) and possibly in Greece, where Sotiraki et al. (2001) found typical eggs of Strongylidae, but did not make fecal cultures to confirm the diagnosis. Infections by *C. struthionis* are frequently overlooked because its eggs are indistinguishable from those of the smaller pathogenic ostrich wireworm *Libyostrongylus* spp. and fecal cultures should be done to differentiate the species using the infective larvae. These present a pointed-tipped tail and long and filamentous sheath tail, similar to a whip, typical of the Strongylidae (Craig and Diamond, 1996), while the infective larvae of the genus *Libyostrongylus* present a knob at the tail tip which is the diagnostic character for this genus with a short to medium length sheath tail. The sheath tail of *C. struthionis* infective larvae is similar to that of *L. dentatus*, long and filamentous that can cause an error in the diagnosis (Ederli et al., 2008). Its pathology is still little understood, but it is considered by many authors to be a non-pathogenic parasite (Huchzermeyer, 1998), but it can cause anemia and hinder normal development (Craig and Diamond, 1996). Due to its supposed inoffensiveness, Huchzermeyer (1998) discarded the necessity to treat the birds for infections by these nematodes, although benzimidazol and lavamizol seem to be efficacious against these parasites (Craig and Diamond, 1996).

The nematode life cycle has not yet been determined but it is believed that is simple and direct, typical of the Strongylidae (Soulsby, 1982). The ultrastructure is still little known, and there are a few studies on this subject, that only report the similarity of its eggs to those of *Libyostrongylus* spp., an ostrich proventriculus parasite, responsible for high mortality rates among young birds.

The aim of the present study was to carry out morphological characterization of adults and infective larvae of *C. struthionis*, as little is known about the morphology, ultrastructure and biology of this parasite.

2. Materials and methods

2.1. Nematodes

Ten caeca of adult ostriches were obtained from a slaughter-house in Quissamã, Rio de Janeiro state, Brazil (22°05'23"S; 41°41'48"W) and examined from

the presence of parasites. Nematode specimens were collected and washed in phosphate buffered saline solution and fixed in hot A.F.A. (70° GL ethanol, 93%; formaldehyde, 5%; glacial acetic acid, 2%) or 2.5% glutaraldehyde. Male and female nematode identification and distinctions were made under a stereomicroscope (10–50 magnification).

Specimens deposited in the Australian Helminthological Collection (AHC), South Australian Museum (SAM), Adelaide, Australia, AHC 420, AHC 872 and AHC 874, and the in United States National Parasite Collection (USNPC), USDA, ARS, Beltsville, Maryland, USNPC 024522.00, USNPC 025463.00, USNPC 031865.00 were examined for comparative identifications.

Representative specimens were deposited in the United States National Parasite Collection (USNPC), USDA, ARS, Beltsville, MD, 20705, USA (USNPC no. 100687); in the Helminthological Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CHIOC), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (CHIOC no. 35541) and in the Australian Helminthological Collection (AHC), South Australian Museum (SAM), Adelaide, Australia (AHC no. 34998).

2.2. Infective larvae

Fecal samples were collected from sites of high infection in the caeca. Fecal cultures were conducted with these samples according to the coproculture technique described by Bonadiman et al. (2006). Infective larvae were transferred to Falcon tubes (15 ml) and stored in a refrigerator. Within 24 h, a drop of distilled water containing larvae was placed on a slide and either heated for some second on a lamp flame, and identified, quantified and measured with aid of a Zeiss-Axiostar Plus light microscope equipped with a digital camera (Canon-PowerShot A640) for image capture and Software Zeiss AxionVision Sample Images for image analysis. Larvae were also drawn with the aid of an Axioplan Zeiss light microscope equipped with a camera lucida.

2.3. Light microscopy and measurements of adult nematodes

The nematodes were fixed in hot A.F.A. (70 °C) overnight, transferred to a solution containing 70% ethanol and 5% glycerin, cleared with lactophenol (one part distilled water, two parts glycerin, one part lactic acid, one part phenic acid) and creosote, mounted on slides and observed in a light microscope.

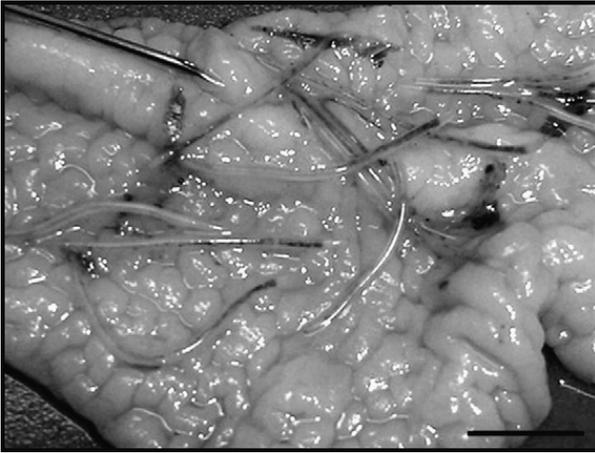


Fig. 1. Final portion of ostrich caecum showing adults of male and female *Codiostomum struthionis* in the caecum mucus. Bar: 6 mm.

Measurements in microns (Mean \pm S.D. (range)) were based on mature adults specimens (20 males and 20 females) and 60 eggs *in utero* from multiple birds. Drawing were done with the aid of an Axioplan Zeiss light microscope equipped with a camera lucida. The nomenclature used in this report followed that of Durette-Desset and Chabaud (1981).

2.4. Scanning electron microscopy

The nematodes were fixed for 2 h in 2.5% glutaraldehyde, 4% freshly prepared paraformaldehyde, 5 mM calcium chloride in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer. The samples were dehydrated in an acetone series, critical point dried with CO₂, sputter-coated with gold, and examined in a Zeiss 962 scanning electron microscope (SEM) operating at 15 kV.

3. Results

Nine of the 10 caeca examined were positive for infection by *C. struthionis*. The nematodes were found in the final third of the caecum. A total of 566 parasites were found (234 males and 332 females) with an average of 56.6 per animal. Edema were observed in the caecal mucosa in the parasite location sites proportional to the parasitic load (Fig. 1). Typical eggs of the Strongylidae were found in the collected feces (Fig. 2A).

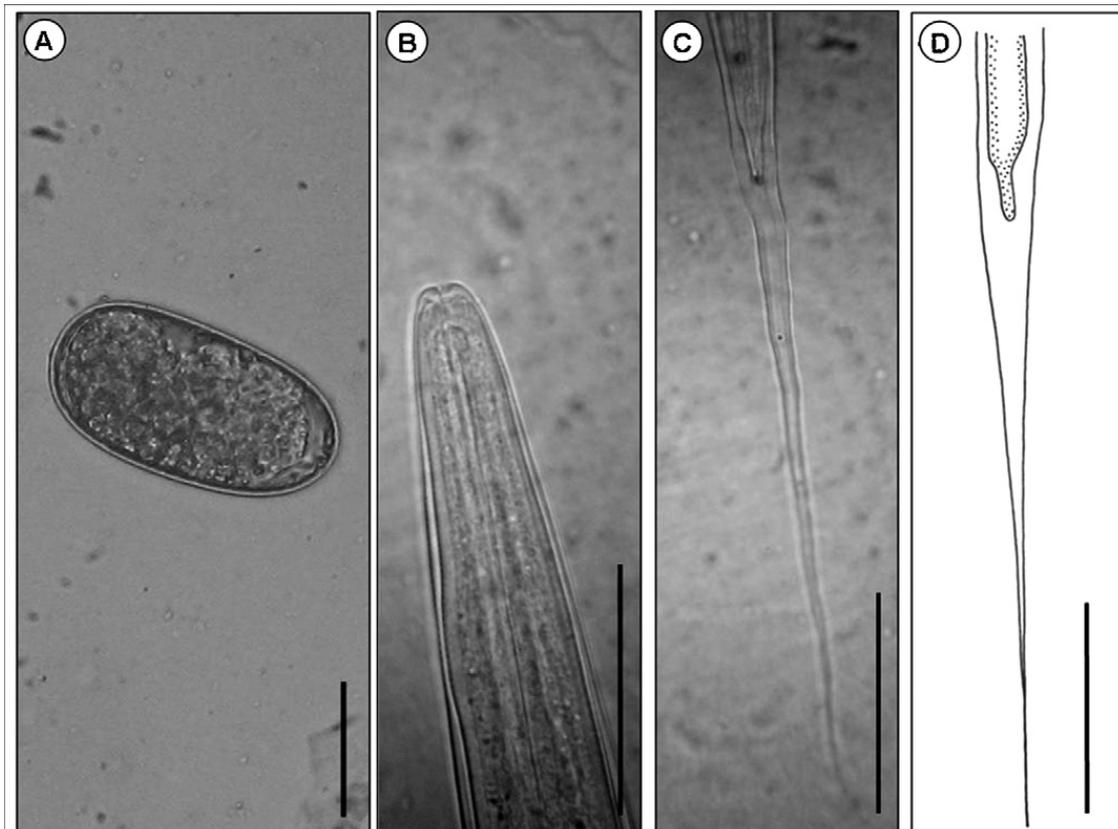


Fig. 2. Eggs and infective larvae of *C. struthionis*. Light microscopy. (A) Strongyliiform eggs, bar: 10 μ m; (B) anterior end; (C) posterior end; (D) hand drawing of posterior end. Same scale for (B–D), bars: 100 μ m.

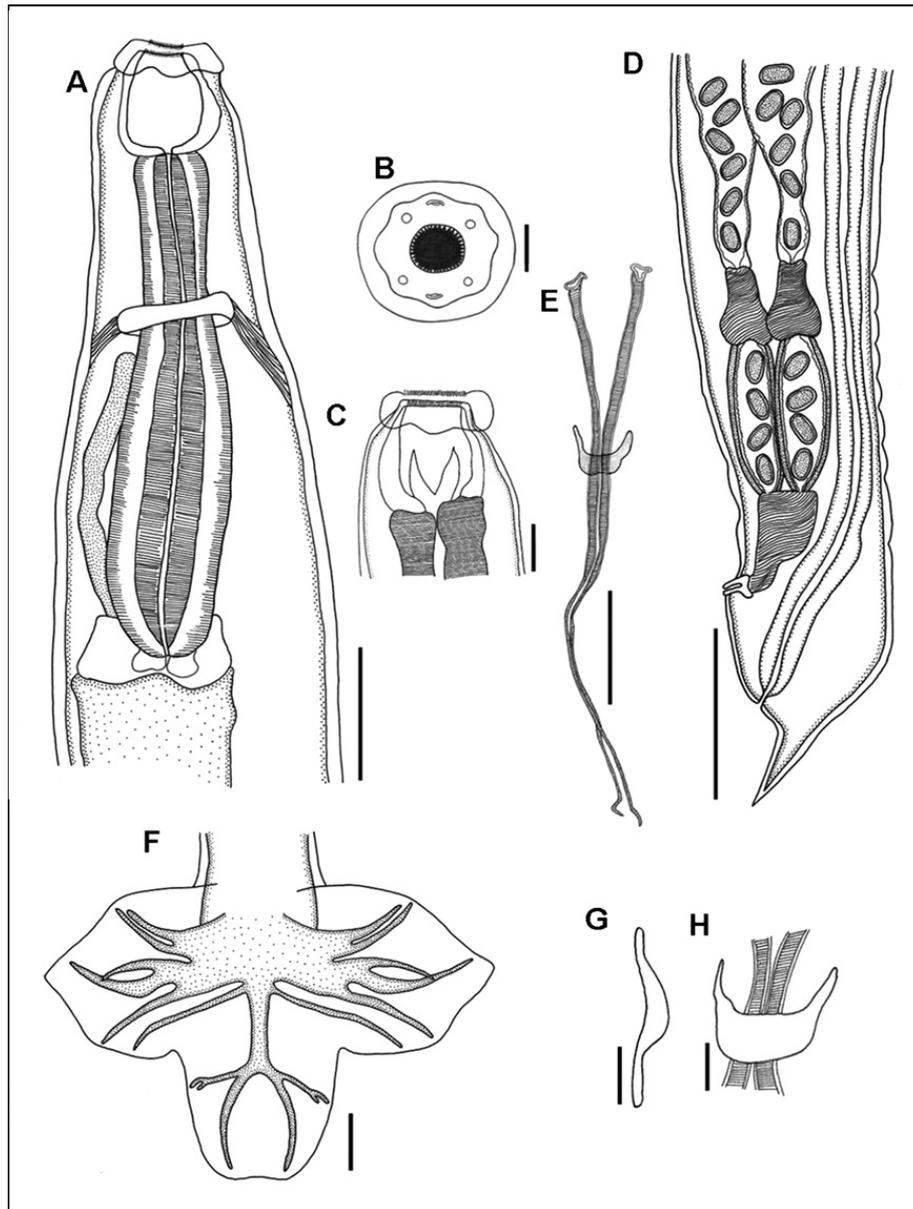


Fig. 3. *C. struthionis*. Hand drawings. (A) Cephalic extremity of a female, showing structure of the esophagus, position of the nerve ring and esophageal–intestinal junction. Bar: 300 μm ; (B) apical view, drawing from SEM, showing structure of the oral aperture, corona radiata, and distribution of cephalic papillae and amphids. Bar: 50 μm ; (C) buccal capsule, showing corona radiata. Bar: 100 μm ; (D) posterior extremity of a female showing caudal spine, anus, ovejector and vulva. Bar: 300 μm ; (E) spicules and gubernaculum of a male, ventral view. Bar: 200 μm ; (F) copulatory bursa, ventral view; showing the organization of bursal rays. Bar: 100 μm ; (G) gubernaculum, ventral view. Bar: 30 μm ; (H) gubernaculum, lateral view. Bar: 30 μm .

3.1. Infective larvae

Total length 598.25 ± 25.15 (511.92–642.41) sheath tail length about 110.74 ± 13.46 (85.87–143.18), with a filamentous termination. Larvae present a acute tail ending (Fig. 2C and D). The cephalic end was rounded with a flattened extremity (Fig. 2B).

3.2. General description

Body filiform, white or light yellow *in vivo*. Females were larger than males (proportion of 1.08:1). Nematode cuticle had strong transverse striations; synlophes absent. The esophagus attained maximum diameter at the posterior region (Fig. 3A and 4A). The buccal capsule was subglobular (Figs. 3B and 4B). A

round buccal aperture with external and internal corona radiate and a well-developed groove was present. Teeth were absent (Figs. 3–5). Well-developed excretory glands were visible. In apical view, four cephalic papillae and one pair of amphids were present (Fig. 5A).

3.3. Male

Total length $15,341 \pm 828.3$ (13,923–16,782), width at the middle region 628 ± 35.2 (551–688). Buccal capsule 249 ± 20.6 (216–286) deep, and 261 ± 13.3 (236–289) width. Esophagus length 1163 ± 47.1 (1061–1248), width attained at base 328 ± 20.6 (306–374), ratio of total body length:esophageal length

1:0.07, distance of the nerve ring from anterior end 633 ± 37.3 (527–695). Caudal end curving ventrally with a well-developed copulatory bursa with a large projection of the dorsal lobe. Copulatory bursa of type 2–3. Rays 2–5 rising in a common trunk and separated later, where rays 2 and 3 remained in a common trunk and rays 4 to 6 in another common trunk. Dorsal ray perpendicular to the body. Rays 2 and 3 parallels but not fused. Rays 3 larger than rays 2. Rays 5 larger than rays 4 and 6, and the extremities of rays 4 overlapping rays 5 in the final third, while rays 6 is distant from rays 5. Rays 8 is long and fine and began at the base of the dorsal ray and followed parallel to rays 6. The dorsal ray branched in its half way, and immediately at the start on

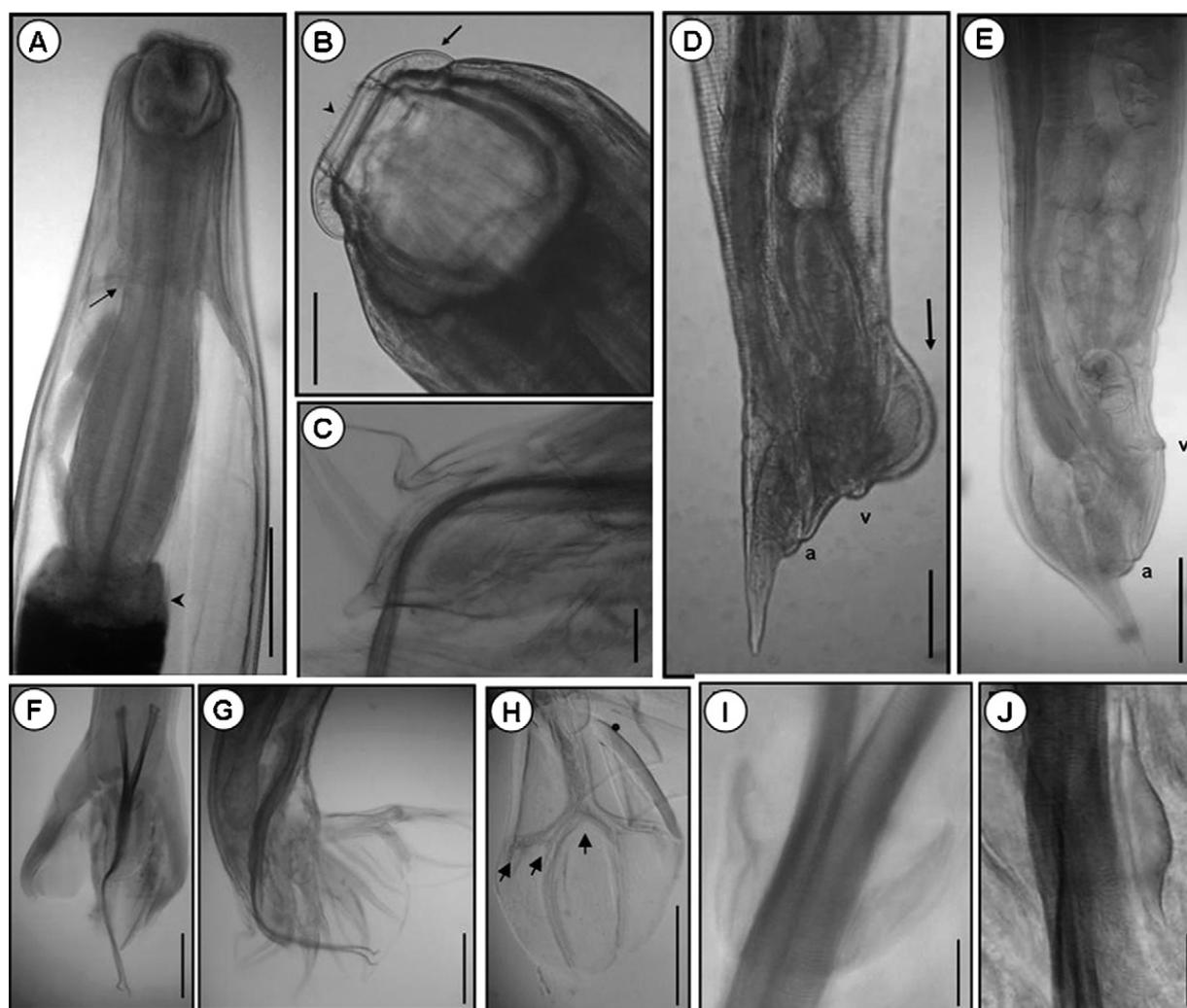


Fig. 4. *C. struthionis*. Light microscopy. (A) Cephalic extremity of a female, showing the structure of the esophagus, position of the nerve ring (arrow) and esophageal–intestinal junction (head arrow). Bar: 300 μ m; (B) buccal capsule, showing corona radiate (head arrow). Bar: 100 μ m; (C) genital cone of a male. Bar: 50 μ m; (D) posterior extremity of a female with cuticular inflation at the level of the vulva (arrow), anus and vulva aperture. Bar: 200 μ m; (E) posterior extremity of a female with absence of cuticular inflation at level of the vulva, anus and vulva aperture. Bar: 200 μ m; (F) copulatory bursa, ventral view, showing spicules and gubernaculum. Bar: 200 μ m; (G) copulatory bursa, lateral view, showing spicules and rays of the bursa. Bar: 200 μ m; (H) structure of dorsal ray, showing typical pattern of bifurcations (pointers). Bar: 200 μ m; (I) gubernaculum, ventral view. Bar: 30 μ m; (J) gubernaculum, lateral view. Bar: 30 μ m.

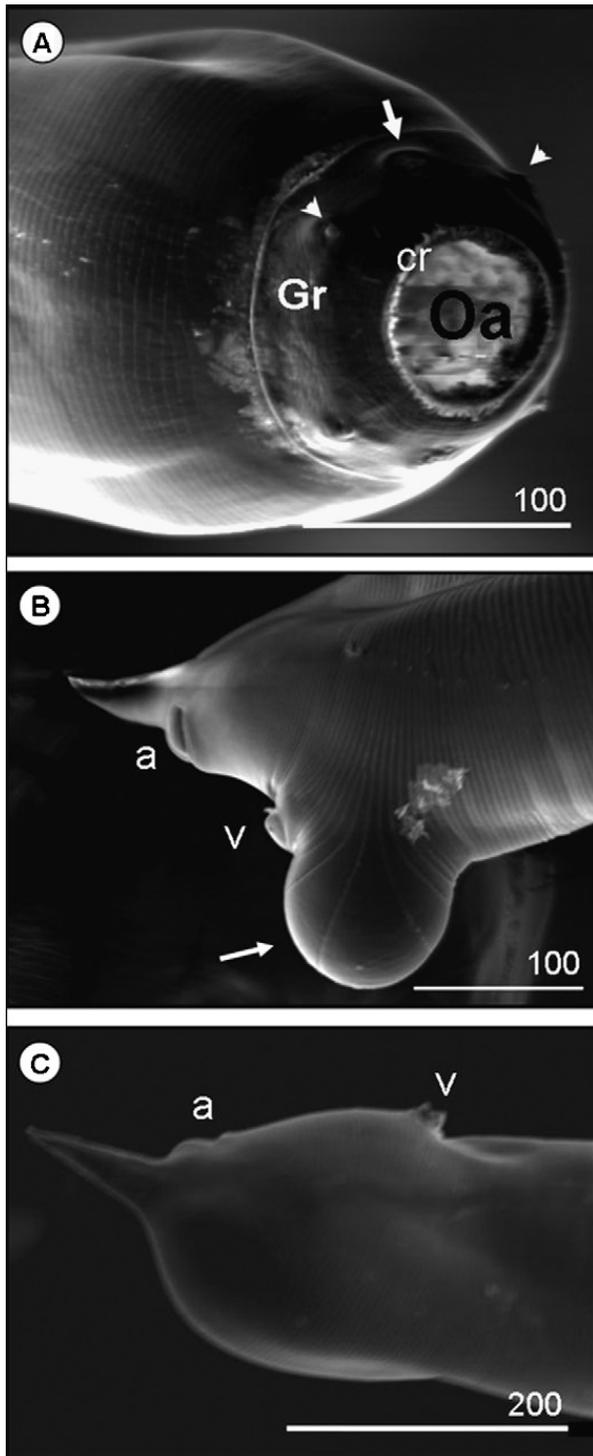


Fig. 5. *C. struthionis*. Scanning electron microscopy (SEM). (A) Apical view of a female cephalic end showing cephalic papillae (pointers), amphids (arrow), cephalic groove (Gr), corona radiata (cr) and oral aperture (Oa). Bar: 100 μ m; (B) caudal extremity of a female, showing caudal spine, anus (a) and vulva (v), and cuticular inflation at the level of the vulva (arrow). Bar: 100 μ m; (C) caudal extremity of a female with absence of cuticular inflation at the level of the vulva, showing caudal spine, anus (a) and vulva (v). Bar: 200 μ m.

each ramification, another branch started that split at the extremities (Fig. 3F). Spicules about 1041 ± 55.6 (916–1183) slender, equal, transversely striated with a curved end, ratio of total body length:spicule length 1:0.06 (Figs. 3E and 4). Small gubernaculum present, 86 ± 10.3 (66–105), gondola-shaped in ventral view (Figs. 3H and 4I), and leaf-shaped in lateral view (Figs. 3G and 4J). Large genital cone with well-developed prebursal papillae present (Fig. 4C).

3.4. Female

Total length $17,396 \pm 541.6$ (16,451–18,491), width in the middle region 774 ± 26.2 (726–821). Buccal capsule 250 ± 27.7 (211–314) deep, and 292 ± 29.3 (248–379) width. Esophagus length 1244 ± 47.1 (1134–1329), width attained at base 354 ± 42.0 (309–495), ratio of total body length:esophageal length 1:0.07, distance of the nerve ring from anterior end 680 ± 33.3 (631–731). Utero prodelphic, ovaries didelphic. Total length of ovejector 653 ± 80.0 (415–758). Vulva with prominent lips, opening in a transversal slit near the anus, at 420 ± 49.4 (311–510) from posterior end. Several samples presented a cuticle swelling around the vulva (Figs. 4D and 5B). Anus from posterior extremity 223 ± 27.9 (172–274). Eggs in early morula stage 79 ± 6.0 (69–95) by 51 ± 27.9 (43–59). Tail ending in a caudal spine length 179 ± 22.8 (146–231) (Figs. 3–5).

4. Discussion

Most reports mention *C. struthionis* only because of the similarity of its eggs to those of *Libyostrongylus* spp. (Huchzermeyer, 1998; Craig and Diamond, 1996). The indistinguishable eggs of this species makes the diagnosis of their presence difficult and there can be false-negative results for *C. struthionis* infections.

The average of the parasite load of *C. struthionis* in slaughtered animals was 56.6, however is understood if this parasite load is high, nevertheless edema was observed in the mucosa in the sites of parasite location, indicating that further studies should be carried out to verify whether with higher parasite loads more severe pathologies can occur.

The infective larvae were characterized as *C. struthionis* according to the morphology of the tip of the tail of the larvae, pointed tip (Ponce Gordo et al., 2002) different from the nematodes of the genus *Libyostrongylus* that have a rounded knob at the tip of the tail (Barton and Seward, 1993). The infective larvae

Table 1

Comparisons of measurements in microns of female of *Codiostomum struthionis* (Horst, 1885) Railliet and Henry, 1911 from ostriches (means with ranges in parentheses)

Character	Current study	Skrjabin et al. (1952) <i>apud</i> Popova (1955)	Popova (1955)
Total length	17,396 (16,451–18,491)	15,520–20,990	17,000
Width	774 (726–821) ^a	330–690 ^a	560 ^a
Buccal capsule deep	250 (211–314)	210–260	280
Buccal capsule width	292 (248–379) ^b	190–240 ^b	100 ^c
Esophagus length	1244 (1134–1329)	990–1310	–
Esophagus and body length	1:0.07	–	1: 0.07
Esophagus width	354 (309–495) ^d	330–390 ^d	450 ^d
Nerve ring	680 (631–731) ^e	590–640 ^e	660 ^e
Ovejector length	653 (415–758)	–	1.5
Egg length	79 (69–95)	–	630
Egg width	51 (43–59)	–	30
Vulva	420 (311–510) ^f	340–450 ^f	–
Anus	223 (172–274) ^f	160–250 ^f	232 ^f
Caudal spine	179 (146–231)	–	188

^a Measured at the middle of the body.

^b Measured in the middle of the buccal capsule.

^c Measured at the level of the oral aperture.

^d Measured at the esophagus base.

^e Measured from anterior extremity.

^f Measured from posterior extremity.

of *L. dentatus* present a sheath tail similar to *C. struthionis*, long and filamentous (Ederli et al., 2008).

It is possible to distinguish the infective larvae of *C. struthionis*, *Libyostrongylus douglassii* and *L. dentatus* by the morphology and length of the sheath tail. *L. douglassii* sheath tail is short and have an acute tip, unlike the sheath tail of the other two species which are long and filamentous. For the differential diagnosis between *L. dentatus* and *C. struthionis* it appears

reliable to use the morphology of the ending of the larva tail (*L. dentatus* has a knob on the extremity (Barton and Seward, 1993) and *C. struthionis* does not). Larvae identification appears to be the best parameter for the differentiation between these two species of nematodes. Bath et al. (2004) reported the occurrence of the infection by the genus *Codiostomum* in 166 birds in 2 properties in Rio de Janeiro state, Brazil, by the observation of Strongylidae type eggs in feces and the

Table 2

Comparisons of measurements in microns of male of *C. struthionis* (Horst, 1885) Railliet and Henry, 1911 from ostriches (means with ranges in parentheses)

Character	Current study	Skrjabin et al. (1952) <i>apud</i> Popova (1955)	Popova (1955)
Total length	15,341 (13,923–16,782)	9740–17,250	13,000
Width	628 (551–688) ^a	280–350 ^a	450 ^b
Buccal capsule deep	249 (216–286)	210–250	280
Buccal capsule width	261 (236–289) ^c	180–250 ^c	100 ^d
Esophagus length	1163 (1061–1248)	940–1130	–
Esophagus and body length	1:0.07	–	0.08
Esophagus width	328 (306–374) ^e	210–410 ^e	450 ^e
Nerve ring	633 (527–695) ^f	530–581 ^f	–
Spicule length	1041 (916–1183)	996–1112	1000
Gubernaculum length	86 (66–105)	108–130	84

^a Measured at the middle of the body.

^b Measured on cephalic extremity.

^c Measured in the middle of the buccal capsule.

^d Measured at the level of the oral aperture.

^e Measured at the esophagus base.

^f Measured from anterior extremity.

presence of infective larvae of *C. struthionis* in coproculture. However Ederli et al. (2008) recovered adults of *Libyostrongylus* spp. and *C. struthionis* (present study) in 100% and 90% of the slaughtered animals, respectively, also in Rio de Janeiro state, Brazil. Possibly this report of infection only by *Codiostomum* spp. (Bath et al., 2004) by fecal exams was due an error in the diagnosis, resulting in a false-negative for the infection by the genus *Libyostrongylus* spp. due the similarity of these infective larvae, principally among *C. struthionis* and *L. dentatus* (Ederli et al., 2008).

The characters observed in the adult parasites were characteristics of the Strongylidae family and are in agreement with the studies carried out by optical microscopy, which characterized the parasites as *C. struthionis*.

Two pairs of rounded cephalic papillae and a pair of amphids (Fig. 5A) were observed by scanning electron microscopy, being this, a new character observed for this species. According to Popova (1955) the ray 4 of the copulatory bursa is closer to ray 5, whereas in this research it was observed that the termination of ray 4 overlapped ray 5, being this also, a new character (Fig. 3F).

Morphometrically, no differences were observed in this study with the measurements reported by Skrjabin et al. (1952) *apud* Popova (1955) and Popova (1955). The differences observed in the body width were due to the region where measurement was made. In the present research, the measurements were made in the mid-region of the body, whereas Popova (1955) measured at the posterior extremity of the parasite (Tables 1 and 2). The same observation can be made with the measurements of the width of the buccal capsule, *i.e.* measurements were made at different regions on the parasites (Tables 1 and 2). Differences were observed in measurements of the length of the gubernaculum, but this character did not influence the identification of this nematode. Although morphometrically different, the gubernaculum had similar morphology to a leaf in lateral view (Fig. 3G), and gondola-shaped in ventral view (Fig. 3H), as reported by Popova (1955) and Lichtenfels (1980), respectively.

As in various nematodes, a cuticle inflation at the level of the vulva was observed in some females (Popova, 1955). This study confirmed this character by scanning electron microscopy, where a dilation of the cuticle was observed, seen by the separation of the transversal striations (Fig. 5B).

Regarding the morphology of the female of *C. struthionis*, as already discussed for the males, the

differences in the measurements of body width and buccal capsule width were due to the different regions used for measurements in this research and by Skrjabin et al. (1952) *apud* Popova (1955) and Popova (1955), except for the total length of the ovejector, where the measurements by Popova (1955) were significantly greater (Table 1).

A further morphometrical difference detected was explained by a typing error in the study by Popova (1955) where the egg length was 630 μm , and with a width of 30 μm (Table 1). As the mean egg width measurement in the present study was 51 (43–59) close to the width reported Popova (1955), the length should also be proportional to that of our research, 79 (69–95). Thus the egg length measurement reported by Popova (1955) was 630 μm , which must have been in error. This measurement should be, probably, 63 and not 630 μm .

Acknowledgments

The authors would like to thank Richard Ian Samuels for proof reading the manuscript, Fabiana V. Massad for technical assistance in the collection of the parasites and Beatriz F. Ribeiro for processing the material for scanning electron microscopy. This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Carlos Chagas Filho do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- Bath, F.V.C., Fagundes, T.F., Menezes, R.C.A.A., 2004. *Codiostomum* (Nematoda: Strongylida) em avestruzes (*Struthio camelus*) de dois criatórios localizados em dois municípios do estado do Rio de Janeiro. *Rev. Univ. Rural, Ser. Ci. Vida.* 24, 279–280.
- Barton, N.J., Seward, D.A., 1993. Detection of *Libyostrongylus douglassii* in ostriches in Australia. *Aust. Vet. J.* 70, 31–32.
- Bonadiman, S.F., Ederli, N.B., Soares, A.K.P., Moraes Neto, A.H.A., Santos, C.P., DaMatta, R.A., 2006. Occurrence of *Libyostrongylus* sp. (Nematoda) in ostriches (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) from the north region of the state of Rio de Janeiro. *Brazil. Vet. Parasitol.* 137, 175–179.
- Craig, T.M., Diamond, P.L., 1996. Parasites of ratites. In: Tully, T.N., Shane, S.N. (Eds.), *Ratites Management, Medicine and Surgery*. Kreiger Publishing Company, Florida, pp. 115–126.
- Durette-Desset, M.C., Chabaud, A.G., 1981. Nouvel essai de classification des nématodes Trichostrongyloidea. *Ann. Paras. Hum. Comp.* 56, 297–312.
- Ederli, N.B., Oliveira, F.C.R., Lopes, C.W.G., DaMatta, R.A., Santos, C.P., Rodrigues, M.L.A., 2008. Morphological diagnosis of infective larvae of *Libyostrongylus douglassii* (Cobbold, 1882) Lane, 1923 and *L. dentatus* Hoberg, Lloyd and Omar,

- 1995 (Nematoda Trichostrongylidae) of ostriches. *Vet. Parasitol.* 155, 232–237.
- Huchzermeyer, F.W. (Ed.), 1998. Diseases of ostriches and other ratites. Agricultural Research Council. Onderstepoort Veterinary Institute, Republic of South Africa, p. 392.
- Lichtenfels, J.R., 1980. Keys to the genera of the superfamily Strongyloidea. In: Anderson, R.C., Chabaud, A.G., Willmott, S. (Eds.), *CIH Key to the Nematode Parasites of Vertebrates*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, pp. 1–41.
- Ponce Gordo, F.P., Herrera, S., Castro, A.T., Durán, B.G., Díaz, R.A.M., 2002. Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Vet. Parasitol.* 107, 137–160.
- Popova, T.I., 1955. Essential of nematodology. Strongyloids of animals and man (Strongylidae), vol. V. U.S. Department of Agriculture and National Sciences Foundation, Washington, DC, pp. 236.
- Sotiraki, S.T., Georgiades, G., Antoniadou-Sotiriadou, K., Himonas, C.A., 2001. Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*). *Vet. Rec.* 148, 84–86.
- Soulsby, E.J.W., 1982. Helminthes, arthropods and protozoa in domesticated animals. Bailliere Tindall/Lea and Febiger, London/Philadelphia, p. 824.