

URSULA CASTRO DE OLIVEIRA

***Eimeria* spp. de coelho e galinha
domésticos: desenvolvimento de
ensaios moleculares e
caracterização filogenética**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Gruber

São Paulo
2011

RESUMO

Oliveira UC. *Eimeria* spp. de coelho e galinha domésticos: desenvolvimento de ensaios moleculares e caracterização filogenética. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Protozoários parasitas do gênero *Eimeria* infectam uma ampla variedade de hospedeiros e causam doenças entéricas conhecidas genericamente como coccidioses. O presente estudo teve dois objetivos gerais: (1) desenvolver ensaios moleculares para a detecção e discriminação das onze espécies de *Eimeria* de coelho doméstico; (2) estudar as relações evolutivas entre espécies de *Eimeria* de hospedeiros mamíferos e aves. Visando o primeiro objetivo, realizamos o sequenciamento de DNA da região ITS1 do cistron ribossômico de todas as espécies de *Eimeria* de coelho. A partir das sequências, foram desenhados iniciadores espécie-específicos e os ensaios foram testados quanto à sua especificidade, não sendo observadas reatividades cruzadas. O limite de detecção variou entre 500 fg a 1 pg, o que corresponde a 0,8 a 1,7 oocistos esporulados. Para o estudo filogenético, sequenciamos quatro marcadores moleculares distintos de espécies de *Eimeria* de galinha e de coelho. Os dados foram analisados em conjunto com sequências já existentes de *Eimeria* de outros hospedeiros utilizando vários métodos de reconstrução filogenética. A utilização de um conjunto concatenado de genes permitiu obter árvores filogenéticas de *Eimeria* com maior congruência entre os diferentes métodos de reconstrução filogenética e maior grau de suporte nos nós. *E. maxima* apresentou uma aceleração de sua taxa de evolução em relação a outras espécies de *Eimeria*, fato que se correlaciona com sua maior diversidade antigênica e imunológica. As análises filogenéticas indicaram que as espécies de *Eimeria* são em geral monofiléticas em relação aos seus hospedeiros, mas, ocasionalmente, são observadas parafilias. A topologia das árvores também demonstrou que a especificidade do hospedeiro parece ser mais relevante do ponto de vista das

relações evolutivas dos parasitas do gênero *Eimeria* do que o caractere de presença/ausência do resíduo do oocisto, como se considerava na literatura. A análise demográfica indicou que múltiplos eventos de invasão de hospedeiros mamíferos e aves devem ter ocorrido ao longo do processo evolutivo. Em termos ecológicos, foi observada ainda uma correlação entre as relações evolutivas das diferentes espécies de *Eimeria* e os hábitos alimentares e habitats de seus hospedeiros. Finalmente, a hipótese de co-evolução entre parasitas do gênero *Eimeria* e seus hospedeiros não foi suportada devido às seguintes evidências: (1) há relatos experimentalmente comprovados de mudança de hospedeiros em espécies de *Eimeria* de roedores; (2) as datações da invasão de roedores, galinha e coelho apontam para uma divergência das espécies de *Eimeria* muito mais recente do que a dos respectivos hospedeiros; e (3) a árvore dos parasitas não pode ser reconciliada com a árvore dos respectivos hospedeiros.

Palavras-chave: *Eimeria*. Coelho doméstico. Reação em cadeia da polimerase. ITS1. Diagnóstico molecular. Filogenia molecular. Evolução.

ABSTRACT

Oliveira UC. *Eimeria* spp. of domestic rabbit and fowl: development of molecular assays and phylogenetic characterization [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Protozoan parasites of the genus *Eimeria* infect a wide range of hosts, and cause enteric diseases generically known as coccidiosis. This work presented two main objectives: (1) development of molecular assays for the detection and discrimination of the eleven *Eimeria* species of domestic rabbit; (2) study of the evolutionary relations among *Eimeria* species of mammals and birds. Aiming at the first goal, we sequenced the ITS1 of the ribosomal cistron of the eleven *Eimeria* species of domestic rabbit and designed species-specific primers. The assays were tested in regard to their specificity and no cross-reactivity has been observed. The detection threshold varied from 500 fg to 1 pg, which corresponds to 0.8 to 1.7 sporulated oocysts. For the phylogenetic analysis, we sequenced four distinct molecular markers of *Eimeria* species of domestic fowl and rabbit. An overall analysis comprising our data and public sequences of *Eimeria* of other hosts has been performed, and we used several distinct methods for the phylogenetic reconstruction. A concatenated multiple gene dataset permitted to generate phylogenetic trees with the best congruence across different methods and the highest node support values. *E. maxima* showed an accelerated evolution rate when comparing to other *Eimeria* species, which correlates with its known higher antigenic and immunological diversity. The phylogenetic analyses indicated that *Eimeria* species are often monophyletic in regard to their hosts, but paraphyly is sometimes observed. Tree topology also demonstrated that host specificity is more relevant in reflecting the phylogenetic relationships than is the presence/absence of the oocyst residuum. The demographic analysis indicated that multiple events of invasion of mammal and bird hosts might have occurred along the evolutionary process. In terms of ecology, we observed a correlation

between the evolutionary relationships of different *Eimeria* species and the feeding habits and habitats of their respective hosts. Finally, the hypothesis of co-evolution of *Eimeria* parasites and their hosts could not be supported due to the following evidences: (1) there are experimental reports of host-switching events among rodent *Eimeria* species; (2) the estimated divergence time of *Eimeria* species is much more recent than the divergence time of their respective vertebrate hosts; and (3) the parasite and host trees cannot be reconciled.

Keywords: *Eimeria*. Domestic rabbit. Polymerase chain reaction. Molecular diagnosis. ITS1. Molecular phylogeny. Evolution.

1.1 Aspectos gerais dos parasitas do gênero *Eimeria*

1.1.1 O filo Apicomplexa e o gênero *Eimeria*

Os parasitas do gênero *Eimeria* pertencem ao filo Apicomplexa, o qual compreende um grande número de protozoários intracelulares obrigatórios. Este filo é considerado bastante antigo e diverso, sendo composto por mais de 5.000 espécies, entre os quais se encontram patógenos humanos de grande impacto na saúde pública (Roos, 2005). O gênero *Plasmodium* compreende espécies causadoras da malária humana, doença devastadora que é responsável por cerca de 850 mil mortes por ano segundo estatísticas da Organização Mundial da Saúde (Kappe et al., 2010). O *Toxoplasma gondii* é responsável por várias manifestações clínicas em humanos adultos, especialmente indivíduos imunossuprimidos, além de provocar malformações em fetos, abortamentos e diferentes níveis de comprometimento intelectual (Tenter et al., 2000; Elmore et al., 2010). Finalmente, *Cryptosporidium* e *Cyclospora* podem causar enterites severas (Chako et al., 2010; Ortega et al., 2010). Outros gêneros pertencentes ao filo Apicomplexa apresentam grande importância na medicina veterinária devido aos graves prejuízos que causam na produção animal. O gênero *Eimeria*, por exemplo, causa prejuízos para indústria avícola estimados em 800 milhões a 3 bilhões de dólares por ano (Allen e Fetterer, 2002; Shirley et al., 2004). Outros exemplos de importantes patógenos animais incluem *Cystoisospora*, que acomete animais domésticos e humanos (Lindsay et al., 1994; Lindsay et al., 1997), *Theileria*, responsável pela febre da costa leste em gado (Morrison, 2009), e a *Babesia*, que infecta ruminantes, cães e humanos, levando a quadros de anemia e aumento de volume esplênico (Chauvin et al., 2009; Vannier et al., 2008). Os organismos do filo Apicomplexa são caracterizados por apresentar o complexo apical, um conjunto de organelas (roptrias, micronemas e conoides) que estão envolvidos com os processos de adesão e invasão na célula hospedeira (Roos, 2005; Striepen et al., 2002; Sibley, 2004). Além disso, a maioria destes protozoários apresenta duas organelas contendo genoma próprio, a mitocôndria e o apicoplasto ou plastídio (Wilson et al., 1997). A mitocôndria possui um genoma

concatamérico linear e composto por unidades repetidas em série de 6 kb. Este genoma caracteriza-se pela presença de apenas três genes, citocromo b, citocromo oxidase 1 e citocromo oxidase 3, além de sequências fragmentadas de RNA ribossômico (Hikosaka et al., 2010a,b). O apicoplasto ou plastídio possui um genoma circular de 35 kb composto por 60 genes: tRNAs, subunidades maior e menor de rRNA, e genes codificadores de proteínas (Cai et al., 2003; Kalanon et al., 2010).

O gênero *Eimeria* foi proposto por Schneider em 1875, levando em consideração o aspecto morfológico do oocisto esporulado, composto por quatro esporocistos contendo dois esporozoítos cada um. Acredita-se que *Eimeria stiedai* tenha sido um dos primeiros organismos observados no século XVII (1674) por Leeuwenhoek, quando este pesquisador utilizou seu recém-desenvolvido microscópio para examinar a bile de coelho (cf. Hammond et al., 1973). Os organismos do gênero *Eimeria* pertencem à classe Coccidia, e estão amplamente distribuídos em uma grande variedade de hospedeiros invertebrados e vertebrados, de anelídeos a mamíferos (Current et al., 1990; Hammond et al., 1973; Shirley et al., 2000). Esses protozoários causam de doenças de grande importância econômica em animais de produção, conhecidas genericamente como coccidioses. Em geral as enfermidades causadas por parasitas do gênero *Eimeria* afetam o trato intestinal, causando enterites de grau variável, podendo variar de lesões quase imperceptíveis até danos significativos e profundos na mucosa, podendo levar a hemorragias e necrose. Em geral a morbidade da doença é muito alta em animais confinados, mas a mortalidade é relativamente baixa, geralmente associada a infecções bacterianas secundárias. Algumas espécies de *Eimeria* podem colonizar outros órgãos além do intestino, como no caso de *E. stiedai* de coelho, que coloniza o epitélio dos dutos biliares, causando lesões hepáticas (Pakandl, 2009).

Os protozoários do gênero *Eimeria* possuem um ciclo de vida bastante complexo, com fases de reprodução assexuada e sexuada. Esses parasitas se caracterizam por apresentar um ciclo de vida monoxênico e, em geral, uma alta especificidade de hospedeiros. Assim um hospedeiro pode se infectado por mais de uma espécie de *Eimeria*, mas a maioria das espécies conhecidas do gênero somente infecta uma única espécie de hospedeiro (Hammond et al., 1973; Shirley et al., 2005).

1.1.2 Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Eimeria*

O ciclo de vida de parasitas do gênero *Eimeria* inicia-se pela ingestão de um oocisto esporulado por um hospedeiro susceptível. Em aves como a galinha doméstica (*Gallus gallus*), a parede do oocisto é rompida mecanicamente pela ação da musculatura da moela e da abrasão de detritos ingeridos. Em mamíferos, a simples digestão por proteases como a tripsina e sais biliares é capaz de desencadear a ruptura da parede do oocisto, liberando os esporocistos. No intestino delgado dos hospedeiros aves ou mamíferos, os esporozoítos, na presença de tripsina e sais biliares, sofrem um processo denominado excitação, pelo qual os parasitas exteriorizam-se ativamente. Uma vez liberados, os esporozoítos invadem células epiteliais do intestino e células da lâmina própria. Esta invasão pode ocorrer no próprio sítio da colonização (que é específico para cada espécie de *Eimeria*). Alternativamente, pode ocorrer uma migração posterior dos esporozoítos através da mucosa para o local específico de seu desenvolvimento.

Em sítios específicos do intestino, os esporozoítos invadem as células da mucosa e se diferenciam em esquizontes ou merontes. Os esquizontes realizam uma reprodução assexuada através de multiplicação por fissão múltipla (esquizogonia ou merogonia). Após o amadurecimento dos esquizontes, ocorre sua ruptura e a consequente liberação de formas merozoítas na luz intestinal, os quais podem infectar novas células do hospedeiro. Algumas espécies invadem células linfoides intraepiteliais e são transportados até o sítio final de colonização através da *lamina propria*.

Após um ou mais ciclos de esquizogonia, o parasita sofre uma diferenciação para macrogametócitos e microgametócitos. Os microgametócitos se rompem e liberam os microgametas, formas biflageladas capazes de se locomover até os macrogametas, fecundando-os e produzindo zigotos. Cada zigoto resulta na formação de um oocisto não esporulado, e este é o único estágio do ciclo de vida no qual o parasita é diplóide. Após a ruptura das células intestinais, os oocistos não esporulados são eliminados no ambiente juntamente com as fezes. Esta forma do parasita, contudo, não é infectante. Em condições adequadas de temperatura, umidade e oxigenação, o oocisto não esporulado sofre uma meiose seguida de duas mitoses, gerando um oocisto esporulado. Esse processo de reprodução assexuada

é denominado esporogonia ou esporulação. O oocisto esporulado e infectante, e possui no seu interior quatro esporocistos contendo dois esporozoítos cada um. O ciclo de vida é completado quando um novo hospedeiro não imune ingere o oocisto esporulado (Hammond et al., 1973, McDougald et al., 1997; Min et al., 2004; Shirley et al., 2005).

1.2 A coccidiose em coelho (*Oryctolagus cuniculus*) e galinha (*Gallus gallus*)

1.2.1 Características das espécies de *Eimeria* de coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*)

Um total de onze espécies de *Eimeria* podem infectar o coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*): *E. coecicola* (íleo e ceco), *E. exigua* (íleo), *E. flavescens* (jejuno e íleo), *E. intestinalis* (íleo, ceco e colón), *E. irresidua* (íleo), *E. magna* (jejuno e íleo), *E. media* (duodeno e jejuno), *E. perforans* (jejuno), *E. piriformis* (ceco, colón e reto), *E. stiedai* (dutos biliares) e *E. vej dovskyi* (íleo) (Courdet et al., 1979; Jelínková et al., 2008; Licois et al., 1992; Licois et al., 1995; Norton et al., 1979; Owen, 1970; Pakandl, 1988; Pakandl, 1989; Pakandl e Jelínková, 2006). Uma característica única das espécies de *Eimeria* que infectam o coelho doméstico é a de possuir merozoítos polinucleados (exceto *E. irresidua*), mas não se sabe ao certo a função deste estágio (Pakandl, 2009). O período de pré-patência pode variar entre 4,5 a 14 dias, para *E. media* e *E. stiedai*, respectivamente. A infecção mais severa é causada por *E. intestinalis* e *E. flavescens* que resultam em inibição do crescimento, piora da conversão alimentar, diarreia severa, e podem gerar altos índices de mortalidade. *E. coecicola*, por outro lado, é considerada uma espécie pouco patogênica, e o animal infectado não apresenta sinais clínicos da doença (Hammond et al., 1973; Pakandl, 2009).

A imunidade desenvolvida é espécie-específica, ou seja, o animal infectado com uma espécie torna-se imune somente para infecções com parasitas da mesma espécie. Os animais mais novos não são protegidos pelos anticorpos maternos presentes no leite, mas somente se tornam susceptíveis 21 dias após o nascimento,

enquanto que os animais mais velhos são mais sensíveis à infecção (Pakandl et al., 2007; Pakandl et al., 2008a,b). Rose (1973) sugeriu que a imunidade dos animais mais jovens era devida à presença de ácido para-aminobenzóico (PABA) no leite materno. Dürr et al. (1969) determinaram que a infecção de animais mais jovens (menos de 21 dias) é menos eficiente por algum mecanismo relacionado ao bloqueio da excitação, fato confirmado por Pakandl et al. (2007) e Pakandl et al. (2008b). Animais com idade superior a 21 dias, mesmo que ainda sob aleitamento, mas que já tenham iniciado a ingestão de outro tipo de alimento, teriam o ambiente do seu trato gastrointestinal alterado, permitindo a excitação dos esporozoítos e posterior invasão das células do epitélio intestinal.

1.2.2 Características das espécies de *Eimeria* de galinha doméstica (*Gallus gallus*)

Existem sete diferentes espécies de *Eimeria* que causam a coccidiose em galinha doméstica: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*. As espécies mais relevantes em termos dos prejuízos econômicos que causam na produção avícola são *E. tenella*, a *E. maxima* e a *E. acervulina* (Shirley et al., 2004). Semelhantemente ao observado em *Eimeria* de coelho, os locais de infecção são específicos para cada espécie. Assim, *E. acervulina* e *E. praecox* infectam a porção anterior do intestino delgado, *E. maxima* e *E. necatrix* infectam a porção média do intestino delgado, sendo que em *E. necatrix* a terceira esquizogonia e a gametogonia ocorre nos cecos. A *E. tenella* infecta os cecos. Em *E. brunetti* a infecção inicia-se no terço médio do intestino delgado, mas a gametogonia ocorre na porção posterior do intestino delgado entre a região ileocecal e o reto. *E. mitis* infectam a porção inferior do intestino delgado (Tyzzer, 1929; Levine, 1942; Levine, 1961). A patogenicidade também varia quanto à espécie, sendo que *E. tenella* e *E. necatrix* são as mais patogênicas, enquanto *E. mitis* é a menos patogênica (Long et al., 1984; Eckert et al., 1995). Os prejuízos diretos causados pela coccidiose aviária incluem o menor ganho de peso, aumento de mortalidade, aumento de infecções secundárias e custos com o tratamento com

quimioterápicos. Os custos indiretos estão relacionados com o uso de drogas e/ou vacinas na prevenção da infecção (Shirley et al., 2005).

A imunidade é espécie específica onde antígenos únicos a cada espécie e a cada estágio do ciclo de vida forneceram diferentes informações ao sistema imune do hospedeiro. Um hospedeiro infectado com uma determinada espécie está protegido (imune) a uma nova infecção por aquela mesma espécie e cepas derivadas desta espécie, com exceção de *E. maxima*. Essa espécie de *Eimeria* de galinha, é a mais imunogênica, tendo sido demonstrado que uma infecção com apenas 25 oocistos é capaz de conferir imunidade protetora (Long e Millard, 1979b). Contudo, *E. maxima*, comparada com as outras espécies de *Eimeria* de galinha, apresenta um menor grau de proteção cruzada entre cepas. Essa característica é devida à maior diversidade antigênica observada nessa espécie (Fitz-Coy, 1992; Long e Millard, 1979b; Martin et al., 1997; McDonald et al., 1986; Norton e Hein, 1976; Shirley e Bellatti, 1988). As respostas imunológicas das diferentes cepas foram estudadas frente ao posterior desafio de galinhas imunizadas com cepas heterólogas (Long e Millard, 1979b; Martin et al., 1997), tendo sido observado que as cepas somente conferem imunidade total contra infecções homólogas. Em infecções heterólogas, o grau de proteção observado é de grau variável. Além disso, também foi demonstrado que a linhagem de galinha utilizada nos experimentos tem influência na resposta imune para as infecções com *E. maxima* (Smith et al., 2002).

1.2.3 Formas de controle da coccidiose

Os principais métodos de controle da coccidiose são o uso preventivo de drogas anticoccidianas na ração animal, e a vacinação com cepas vivas dos parasitas. O uso de doses sub-ótimas de anticoccidianos misturados à ração elimina a maior parte da população dos parasitas, mas mantém ainda uma pequena fração de parasitas viáveis. Estes parasitas são capazes de infectar o hospedeiro e induzir uma resposta imune protetora, mas devido à baixa carga infectante, ou por um processo de atenuação, não causam sinais clínicos ou perdas na produtividade. No caso da vacinação, os produtos comercialmente disponíveis são formulados com

suspensões de oocistos viáveis de uma combinação de espécies. Existem dois tipos de formulações vacinais: as vacinas compostas por cepas virulentas utilizadas em baixa dose, e aquelas compostas por cepas selecionadas para o caractere de precocidade, as quais têm uma atenuação da virulência (Chapman et al., 2002; Dalloul e Lillehoj, 2005; Shirley et al., 2007).

As cepas precoces são selecionadas para o desenvolvimento de um ciclo de vida precoce, isto é, para um período de pré-patência mais curto. O processo de seleção consiste na coleta dos primeiros oocistos eliminados na patência e uma subsequente passagem em novos animais para propagação. Repetindo-se essa abordagem seguidamente, consegue-se reduzir gradualmente o período de pré-patência a cada passagem, até a estabilização em desse período. O encurtamento do período pré-patente ocorre devido a uma redução de um ou mais ciclos de esquizogonia durante a fase assexuada da infecção intestinal, reduzindo-se assim o grau de multiplicação dos parasitas e, por consequência, gerando lesões muito mais leves no hospedeiro (Jeffers, 1975; McDougald e Jeffers, 1976). O objetivo final é, novamente, se obter uma infecção ativa pouco patogênica, mas efetiva do ponto de vista de geração de imunidade. Vários produtos comerciais estão atualmente disponíveis no mercado internacional e no Brasil, tanto com o uso de cepas virulentas em baixas doses, quanto com o uso de cepas precoces.

Das espécies de *Eimeria* de coelho doméstico, existem somente seis espécies para as quais foram desenvolvidas cepas precoce: *E. coecicola* (Courdet et al., 1995), *E. flavescens* (Pakandl, 2005), *E. intestinalis* (Licois et al., 1990), *E. magna* (Licois et al., 1995), *E. media* (Licois et al., 1994) e *E. piriformis* (Pakandl e Jelínková, 2006). Existem algumas diferenças na obtenção das cepas precoces de coccídeos de galinha e coelho. Diferentemente do observado em *Eimeria* de galinha, algumas diferenças morfológicas podem ser evidenciadas entre as cepas parentais e precoces de *Eimeria* de coelho (Pakandl et al., 2001). Uma das características do oocisto esporulado de cepas precoces é a presença do corpo refrátil nos esporocistos. Nos oocistos esporulados das cepas precoces de *E. magna* e *E. media* o corpo refrátil é maior do que nas cepas parentais. No caso de *E. intestinalis*, dois dos quatro esporocistos apresentam o corpo refrátil maior que o da cepa parental, enquanto os outros dois esporozoítos não os possuem. Essas diferenças morfológicas permitem a diferenciação de cepas precoces das parentais através de características morfológicas (Pakandl et al., 2001; Pakandl, 2009). Mesmo

apresentando estas diferenças morfológicas, as cepas precoces e parentais de *Eimeria* de coelho não apresentaram diferenças de padrões de bandas em estudos de RAPD (Ceré et al., 1997).

O controle da infecção por *Eimeria* em coelhos de produção é essencialmente feito através do uso de quimioterápicos como a sulfadimetoxina e toltrazuril, sendo também comum o uso de antibióticos ionóforos como salinomicina, monensina e lasalocida. A sulfadimetoxina atua inibindo a recaptura de ácido fólico e ácido para-aminobenzóico, consequentemente bloqueando a síntese de pirimidinas (Pakandl, 2009). O toltrazuril é um anticoccidiano de amplo espectro usado em coelhos, é efetivo nos estágios de esquizontes e gamontes (Peeters et al., 1986). Os ionóforos (salinomicina, monensina e lasalocida) são moléculas que perturbam o transporte de íons através da membrana celular, aumentando a permeabilidade celular, sendo a salinomicina mais eficiente na redução da produção de oocistos em coelhos (Pakandl, 1986). Testes laboratoriais utilizando cepas precoces foram feitos para visando o desenvolvimento de uma vacina viva para o controle da coccidiose em coelhos, mas não existe até o presente momento nenhum produto comercial disponível (Pakandl, 2009). De fato, testes preliminares com vacinas de cepa precoces em *Eimeria* de coelho doméstico foram descritas para *E. magna*, onde animais imunizados com oocistos da cepa precoce mostraram-se imunes à infecção com a cepa parental, com redução da perda de peso e diminuição da excreção de oocistos. Para *E. magna* foram feitos experimentos de dispersão de oocistos da cepa precoce nas gaiolas de criação. Uma dose de quarenta mil oocistos para coelhos com idade de 25 dias mostrou-se eficiente. Os animais vacinados não tiveram perda de peso significativa e a excreção de oocistos diminuiu (Drouert-Viard et al., 1997a,b).

Outra forma de controle seria o uso de vacinais de subunidades. Contudo, pouco foi desenvolvido nesta área para *Eimeria* de coelho. Hanada et al. (2003a,b) descreveram um antígeno solúvel encontrado na bile de coelhos infectados com *Eimeria stiedai*, com tamanho de 49 kDa, localizado no micronema, e específico de merozoítos. Infecções experimentais realizadas com animais imunizados com esse antígeno demonstraram uma redução da eliminação de oocistos e da quantidade de parasitas encontrados nos dutos biliares (Hanada et al., 2003a,b).

1.3 Diagnóstico de parasitas do gênero *Eimeria*

1.3.1 Diagnóstico das espécies de *Eimeria* de galinha doméstica

A identificação das espécies de *Eimeria* tem sido classicamente feita utilizando-se como parâmetros a espécie do hospedeiro, o local da infecção, aspecto das lesões, período de pré-patência, período mínimo de esporulação, morfologia do oocisto esporulado, proteção cruzada, entre outros. Contudo, as características biológicas listadas acima podem apresentar sobreposição entre as espécies. Assim, vários grupos de pesquisa passaram a desenvolver ensaios moleculares para a discriminação de espécies e cepas do parasita. Para a identificação de *Eimeria* de galinha doméstica, foram desenvolvidos vários testes. A análise eletroforética de isoenzimas foi uma das primeiras formas de identificação inter e intra-específica (Shirley, 1975; Shirley, 1978). A separação de proteínas por eletroforese em SDS-PAGE foi outra técnica utilizada para a discriminação das espécies de *Eimeria* de galinha (Sutton et al., 1989; Eckert et al., 1995). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, vários outros testes foram desenvolvidos. A análise de polimorfismo de fragmentos de DNA gerados pela ação de enzimas de restrição, o RFLP (polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição), permitiu identificar três espécies, *E. tenella*, *E. acervulina* e *E. necatrix*, e algumas cepas de *E. tenella* (Ellis e Bumstead, 1990; Shirley, 1994).

Técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase, a PCR, permitiram o avanço dos testes diagnósticos. Apenas uma pequena quantidade de DNA é necessária para que um determinado produto seja amplificado exponencialmente e de forma específica, fazendo com que a sensibilidade seja muito maior do que a obtida em outras técnicas (Mullis e Faloona, 1987). Stucki et al. (1993), utilizando como alvo um fragmento de 560 pb da região intergênica do gene da subunidade ribossômica 5S, desenvolveram um ensaio eficiente para a detecção de *E. tenella*. Outra técnica que foi utilizada no diagnóstico molecular de espécies de *Eimeria* que infectam a galinha doméstica foi o RAPD (polimorfismo de DNA amplificado randomicamente). Essa técnica, diferentemente de outras, não exige o conhecimento prévio de qualquer informação do genoma do organismo. O

RAPD é uma técnica baseada em PCR que utiliza iniciadores arbitrários (geralmente decâmeros) em condições de baixa estringência. O resultado obtido é um perfil de bandas específico daquela espécie, conhecido como impressão digital de DNA (*DNA fingerprinting*). Esses perfis permitem diferenciar espécies e até mesmo cepas. Ensaios de RAPD demonstraram, conforme esperado, que o polimorfismo entre espécies é bastante superior ao observado entre cepas (Procunier et al., 1993). Contudo, a técnica permite a diferenciação de cepas de uma mesma espécie (Fernandez et al., 2003a; Shirley e Bumstead, 1994).

O primeiro ensaio molecular baseado em PCR com iniciadores específicos, capaz de identificar cada uma das sete espécies de *Eimeria* que infectam a galinha doméstica, foi descrito por Schnitzler et al. (1998, 1999). Esse ensaio molecular utilizou como alvo o ITS1 (espaçador interno transcrito 1) do *cistron* de RNA ribossômico. Foi demonstrado que o ITS1 possui variações interespecíficas que permitiram discriminar as sete espécies de forma específica e com alta sensibilidade. Recentemente, a mesma abordagem foi feita para 6 espécies de *Eimeria* que infectam os bovinos (Kawahara et al., 2010).

O nosso grupo desenvolveu ensaios diagnósticos para as sete espécies de *Eimeria* de galinha baseados em RAPD (Fernandez et al., 2003a). Em um trabalho posterior, as bandas espécie-específicas tiveram seu DNA extraído e sequenciado e, a partir desses dados, foi possível desenvolver um conjunto de marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), os quais são altamente específicos e reprodutíveis (Fernandez et al., 2004). Além disso, a partir de sete marcadores SCAR, específicos para cada uma das espécies de *Eimeria* de galinha, foi desenvolvido um ensaio de PCR multiplex (Fernandez et al., 2003b). Nesse ensaio, todas as espécies podem ser detectadas e identificadas em uma reação conjunta realizada em um único tubo, facilitando enormemente o diagnóstico de amostras de campo. Além dos métodos moleculares de diagnóstico, nosso grupo também desenvolveu um sistema de identificação de oocistos de *Eimeria* de galinha baseado em reconhecimento de padrões de imagem (Castañón et al., 2007). Foram consideradas várias características morfológicas do oocisto esporulado como a curvatura, tamanho e estruturas internas, para diferenciar as sete espécies de *Eimeria* que infectam a galinha doméstica. Assim foi criada uma interface *web* na qual o usuário pode submeter fotos de amostras para análise e diagnóstico de

espécies de *Eimeria* de galinha e de coelho em tempo real (<http://www.coccidia.icb.usp.br/uploadoocyst/uploadimg.php>).

Para a análise quantitativa, Blake et al. (2008) descreveram o primeiro ensaio de PCR em tempo real para a detecção e quantificação de amostras de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. tenella*, espécies que infectam a galinha doméstica. Os autores utilizaram como sequências-alvo uma região do gene que codifica a proteína de micronema 1 (Blake et al., 2006), e sequências espécie-específicas de SCARs que haviam sido previamente descritas pelo nosso grupo (Fernandez et al., 2004). Vrba et al. (2010) desenvolveram um teste de PCR em tempo real para as outras quatro espécies de *Eimeria* completando o trabalho inicial de Blake et al. (2008). Este trabalho também utilizou sequências espécie-específicas de SCARs (Fernandez et al., 2004). Kawahara et al. (2008) descreveram uma PCR em tempo real para a identificação e quantificação de cinco espécies de *Eimeria* de galinha: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. tenella*. Como alvo foram usadas sequências do ITS1, exceto para *E. maxima*, onde os autores modificaram os iniciadores previamente desenvolvidos por Lew et al. (2003). Kirkpatrick et al. (2009) apresentaram um novo método baseado no ITS2 de rRNA para a detecção e identificação das sete espécies de *Eimeria* de galinha, utilizando PCR em tempo real com posterior separação dos produtos em eletroforese capilar e análise da curva de *melting* de alta resolução. Morgan et al. (2009) desenvolveram sete ensaios de PCR em tempo real para a detecção e quantificação das espécies de *Eimeria* que infectam a galinha doméstica na Austrália, a partir de amostras de fezes, usando como alvo a região do ITS2.

1.3.2 Diagnóstico das espécies de *Eimeria* de coelho doméstico

O diagnóstico das espécies de *Eimeria* de coelho tem sido feito classicamente através da morfologia dos oocistos e parâmetros biológicos da infecção, semelhantemente ao procedimento descrito acima para as espécies que infectam a galinha. Em termos diagnóstico molecular, contudo, não existe até o presente momento nenhum método disponível para a detecção e identificação das onze

espécies de *Eimeria* de coelho doméstico. Ceré et al. (1995) descreveram um teste de RAPD para nove espécies, incluindo quatro cepas de *E. media* e duas de *E. intestinalis*, não tendo sido incluídas no estudo as espécies *E. stiedai* e *E. irresidua*. A técnica do RAPD permitiu distinguir as nove espécies, porém, dado o alto grau de semelhança entre os perfis de amplificação devido ao baixo polimorfismo, diferentes cepas somente puderam ser divididas em dois grupos. O mesmo já havia sido observado em espécies de *Eimeria* de galinha doméstica para cepas de *E. tenella* e *E. acervulina* (Procunier et al., 1993). Ceré et al. (1996) também desenvolveram marcadores espécie-específicos para a identificação e diagnóstico de *E. media* através de RAPD. A marcação com digoxigenina e posterior hibridização aumentou consideravelmente a sensibilidade para amostras com poucos oocistos em amostras coletadas diretamente das fezes. Uma comparação por RAPD de cepas precoces com as parentais para *E. magna* e *E. intestinalis* não identificou nenhuma diferença entre essas cepas (Ceré et al., 1997). O RAPD, embora seja uma técnica relativamente fácil e que não requer conhecimento prévio da sequência dos DNAs alvo, apresenta uma série de desvantagens para fins de diagnóstico, especialmente para uso universal. Como a técnica utiliza iniciadores arbitrários em baixa estringência a reprodutibilidade é muito baixa. Assim, enzimas de amplificação e termocicladores de marcas diferentes podem resultar em perfis de amplificação muito discrepantes, ainda que os iniciadores e condições de ciclagem sejam os mesmos. Isso significa que a técnica funciona razoavelmente bem dentro de um mesmo laboratório, mas é de difícil aplicação entre laboratórios distintos. Outro aspecto bastante negativo da técnica é que, ao invés de uma PCR convencional que gera um único produto de amplificação, o RAPD resulta em um perfil de múltiplas bandas. Isso é particularmente desvantajoso em amostras mistas, uma vez que a sobreposição de bandas impede a correta identificação das espécies presentes.

Os genes ribossômicos nucleares ou genes de rRNA de eucariotos são compostos de repetições arranjadas em repetições seriadas (*tandem*). Cada uma destas repetições contém as subunidades de rRNA 18S, 5.8S e 28S, além dos espaçadores externos transcritos ETS1 e ETS2 e espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2. As subunidades pequena (SSU ou 18S) e grande (LSU ou 28S) do rRNA têm sido empregadas para análises filogenéticas de espécies devido ao seu alto grau de conservação em organismos ao longo de toda a escala evolutiva. As regiões espaçadoras, por outro lado, não serem utilizadas funcionalmente, não

sofrem grande pressão de seleção e apresentam, portanto, maior grau de divergência. Essas regiões são mais indicadas para estudos de populações, usando-se as variações intra-específicas como caracteres discriminantes. Outra aplicação dos ITSs é no desenvolvimento de ensaios diagnósticos por PCR. Utilizando-se, por exemplo, iniciadores dirigidos contra as regiões flanqueadoras do ITS1, presentes em regiões altamente conservadas das subunidades SSU (18S) e 5.8S, consegue-se amplificar com sucesso o ITS1 de muitas espécies, e até mesmo de gêneros distintos. Uma vez sequenciados os produtos de amplificação, pode-se desenhar pares de iniciadores específicos para uma ou mais espécies em estudo. Essa abordagem foi utilizada com sucesso para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos em vários organismos, incluindo as sete espécies de *Eimeria* de galinha doméstica (Schnitzler et al., 1998; Schnitzler et al., 1999).

Os dados de sequenciamento do genoma de *Eimeria tenella* indicam que o cistron ribossômico apresenta cerca de 140 cópias (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/), o que o torna um excelente alvo para amplificação com uma boa sensibilidade de detecção. Dada a importância da coccidiose na criação de coelhos, e a ausência de ensaios moleculares para diagnóstico que permitam a detecção e discriminação das onze espécies de *Eimeria* de coelho doméstico, decidimos desenvolver no presente trabalho um conjunto de ensaios moleculares baseados em PCR para as onze espécies de *Eimeria* de coelho, utilizando o ITS1 como alvo de amplificação.

1.4 Filogenia molecular do gênero *Eimeria*

Para o gênero *Eimeria* existem poucos estudos de filogenia molecular que demonstram as relações evolutivas entre as espécies. Reduker et al. (1987) realizaram um estudo pioneiro baseado em análises cladística e fenética, no qual os autores utilizaram um conjunto de características morfológicas dos oocistos, história de vida dos parasitas e padrões isoenzimáticos. Os resultados permitiram agrupar as diferentes espécies de *Eimeria* de quatro gêneros de roedores cricetídeos em

dois clados. Esses clados podiam estar associados à presença ou ausência de um corpo residual no oocisto. Kheysin (1971) descreveu este resíduo como sendo um grânulo de lipídeos que é eliminado do citoplasma do zigoto durante o processo de esporogonia. Contudo, algumas espécies de *Eimeria* possuem este resíduo enquanto outras não, e sua função ainda é desconhecida. As espécies de *Eimeria* de galinha não possuem esse resíduo de oocisto. Outros grupos, utilizando dados moleculares, também observaram a correlação de espécies de *Eimeria* de roedores filogeneticamente relacionadas com o caractere do resíduo do oocisto.

Zhao e Duszynski (2001a) utilizaram sequências da SSU de rRNA nuclear e da ORF470 de apicoplasto para estudar as relações filogenéticas entre dez espécies de *Eimeria* que infectam roedores silvestres, e sua correlação com a morfologia do oocisto esporulado e a especificidade de hospedeiro. As árvores obtidas nesse estudo, com ambos os marcadores, mostraram o agrupamento dessas espécies em dois clados, cujos oocistos esporulados apresentavam ou não a presença do resíduo. Como o agrupamento das espécies de *Eimeria* mostrou correlação com esta característica morfológica, e não pelos respectivos hospedeiros, os pesquisadores concluíram que as diferenças morfológicas, mais do que a especificidade de hospedeiro, estariam associadas a essas duas linhagens. Em outro estudo (Zhao e Duszynski, 2001b), os autores utilizaram a LSU de rRNA de apicoplasto e a SSU de rRNA nuclear para analisar as relações filogenéticas entre 16 espécies de *Eimeria* que infectam roedores. Assim como no primeiro trabalho (Zhao e Duszynski, 2001a), as relações entre as espécies foram comparadas quanto à especificidade de hospedeiro e caracteres morfológicos do oocisto esporulado. Nesse estudo, as árvores obtidas refletiram, novamente, dois clados, um contendo as espécies que possuem oocisto com resíduo e outro sem resíduo. Desta forma, Zhao e Duszynski (2001b) argumentam que o resíduo de oocisto seria um caractere morfológico altamente associado com as relações filogenéticas entre as espécies de *Eimeria* de roedores.

Zhao et al. (2001) utilizaram sequências parciais da SSU de rRNA nuclear e LSU de rRNA de apicoplasto para estudar a relação filogenética entre duas espécies de *Eimeria* de morcegos (*E. antrozoi* e *E. rioarribaensis*) e cinco espécies de *Eimeria* de roedores. As árvores filogenéticas obtidas com a análise dos dois marcadores moleculares, individuais ou concatenados, mostraram que as espécies de *Eimeria* de roedores não formam um grupo monofilético em relação aos seus hospedeiros.

As espécies de *Eimeria* de morcegos agruparam-se com espécies de *Eimeria* de roedores morfologicamente similares. Segundo os autores, estes resultados sugerem que as espécies de *Eimeria* de morcegos teriam divergido das espécies de *Eimeria* de roedores como resultado de transferência lateral deste parasita entre estes hospedeiros.

Barta et al. (1997) usaram a SSU de rRNA para estudar as relações filogenéticas de espécies de *Eimeria* de galinha doméstica. Esse estudo demonstrou que *E. tenella* e *E. necatrix* formam um clado separado das outras espécies, com alto grau de suporte. Esse agrupamento pode ser correlacionado com algumas características biológicas dessas espécies, como a sua alta patogenicidade, a forma e tamanho semelhante de seus oocistos, a geração de enterites hemorrágicas e colonização dos cecos. As outras cinco espécies que infectam o trato intestinal superior foram agrupadas em três clados, um somente com *E. acervulina*; o segundo com *E. brunetti*, *E. maxima* e *E. praecox*; e o último com *E. mitis* e *E. mivati*, uma espécie cuja validade é controversa. Contudo, o suporte da árvore obtida foi alto somente na definição do nó entre os ramos de *E. tenella* e *E. necatrix*. Os demais nós entre as outras cinco espécies apresentaram menores valores de suporte.

Morrison et al. (2004) utilizaram a SSU de rRNA nuclear para a reconstrução filogenética de um grande número de organismos da classe Coccidia. Neste estudo, observaram que na família Eimeriidae a SSU de rRNA apresenta uma baixa variabilidade, comparado com outras famílias (Sarcocystidae) da classe Coccidia. Essa pequena variabilidade resulta em um sinal filogenético fraco, o que pode explicar os baixos níveis de suporte observados em vários nós das árvores. O baixo sinal filogenético da SSU de rRNA foi observado mesmo quando o alinhamento múltiplo de sequências considerou dados da estrutura secundária do rRNA. Entre as sugestões desses autores para melhorar a congruência das árvores filogenéticas estava o uso de outros marcadores como genes codificadores de proteínas. (Morrison et al., 2004).

Recentemente, a reconstrução filogenética das onze espécies de *Eimeria* de coelho também foi feita usando-se a SSU de rRNA (Kvičerová et al., 2008). Semelhantemente ao que foi observado para *Eimeria* de roedores (Zhao et al., 2001; Zhao e Duszynski, 2001a,b), as espécies de *Eimeria* de coelho formaram dois clados, representando os grupos com e sem o resíduo de oocisto. Nenhuma

correlação maior, contudo, pôde ser feita com outras características biológicas, como sítio da lesão ou período pré-patente.

Power et al. (2009) descreveram estudos filogenéticos entre isolados de *E. trichosuri*, uma espécie de *Eimeria* de marsupial, (gambá - *Thricosurus vulpecula*) e outras espécies de *Eimeria* de mamíferos e aves. Nestes estudos os autores especularam que as espécies de *Eimeria* de galinha originaram-se a partir de espécies de *Eimeria* de mamíferos placentários. Além disso, também sugeriram que as espécies de *Eimeria* teriam co-evoluído com seus hospedeiros.

Na inferência filogenética de uma dada espécie não é recomendado utilizar um único gene, mas, sim, um conjunto de genes que reflita melhor a história evolutiva da espécie. A utilização de apenas um marcador filogenético implica na obtenção de uma árvore que reflete mais a história evolutiva desse marcador nas diferentes espécies analisadas, do que a história evolutiva das próprias espécies. O uso de um maior número de marcadores dilui eventuais variações individuais entre as taxas de evolução de cada marcador e pode reduzir a incongruência de topologias entre eles. Desde que um número razoável de marcadores fosse utilizado, tomando-se o cuidado de não incluir sequências transferidas lateralmente, as árvores poderiam ser consideradas como árvores filogenéticas das espécies analisadas (*species trees*). Rokas et al. (2003) utilizaram genomas de diferentes espécies do gênero *Saccharomyces* e selecionaram 106 genes ortólogos para um estudo filogenético. Os autores concluíram que conjuntos de dados contendo um ou poucos genes podiam gerar árvores topologicamente incongruentes, ainda que cada uma delas apresentasse alto suporte. Entretanto, quando os dados utilizados consistiram de genes concatenados, qualquer combinação de vinte genes resultava em árvores perfeitamente congruentes e com alto suporte. Essas árvores, portanto, podiam ser consideradas como árvores de espécies.

Assim, decidimos no presente trabalho estender o estudo das relações filogenéticas de espécies do gênero *Eimeria* utilizando todas as espécies conhecidas do parasita de um hospedeiro ave (galinha) e de um mamífero (coelho). Visando ainda obter árvores com maior suporte, que reflitam melhor a evolução das espécies do parasita, decidimos empregar um conjunto de quatro marcadores moleculares distintos, originados de três compartimentos celulares: núcleo, mitocôndria e apicoplasto.

6 CONCLUSÕES

- Desenvolvemos um ensaio de diagnóstico molecular que permite discriminar com eficiência as onze espécies de *Eimeria* que infectam o coelho doméstico.
- A utilização de um conjunto concatenado de genes permitiu obter árvores filogenéticas de *Eimeria* com maior congruência entre os diferentes métodos de reconstrução filogenética e maior grau de suporte nos nós.
- A especificidade do hospedeiro parece ser mais relevante do ponto de vista das relações evolutivas dos parasitas do gênero *Eimeria* do que o caractere de presença/ausência do resíduo do oocisto.
- As análises filogenéticas indicam que as espécies de *Eimeria* são em geral monofiléticas em relação aos seus hospedeiros, mas, ocasionalmente, são observadas parafilias.
- A análise demográfica sugere a ocorrência de múltiplos eventos de invasão de hospedeiros mamíferos e aves ao longo do processo evolutivo.
- A hipótese de co-evolução entre parasitas do gênero *Eimeria* e seus hospedeiros não é suportada devido às seguintes conclusões: (1) há relatos experimentalmente comprovados de mudança de hospedeiros em espécies de *Eimeria* de roedores; (2) as datações da invasão de roedores, galinha e coelho apontam para uma divergência das espécies de *Eimeria* muito mais recente do que a dos respectivos hospedeiros; e (3) a árvore dos parasitas não pode ser reconciliada com a árvore dos respectivos hospedeiros.
- Parece haver uma correlação entre as relações evolutivas das diferentes espécies de *Eimeria* e os hábitos alimentares e habitats de seus hospedeiros.
- *E. maxima* apresenta uma aceleração de sua taxa de evolução em relação a outras espécies de *Eimeria*, fato que se correlaciona com sua maior diversidade antigênica e imunológica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Allen PC, Fetterer RH. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jan;15(1):58-65.

Alyousif MS, Al-Shawa YR, Al-Asiri SS. *Eimeria livialis* sp.n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon, *Columba livia domestica* in Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol.* 2009 Aug;39(2):383-8.

Aoutil N, Bertani S, Bordes F, Snounou G, Chabaud A, Landau I. *Eimeria* (Coccidia: Eimeriidae) of hares in France: description of new taxa. *Parasite.* 2005 Jun;12(2):131-44.

Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, et al. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol.* 1997 Apr;83(2):262-71.

Barta JR. Investigating phylogenetic relationships within the Apicomplexa using sequence data: the search for homology. *Methods.* 1997 Oct;13(2):81-8.

Bashtar AR, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KA, Mehlhorn H, AlNasri. Light microscopic study on *Eimeria* species infecting Japanese quails reared in Saudi Arabian farms. *Parasitol Res.* 2010 Jul;107(2):409-16.

Benton MJ, Donoghue PC. Paleontological evidence to date the tree of life. *Mol Biol Evol.* 2007 Jan;24(1):26-53.

Blake DP, Hesketh P, Archer A, Carroll F, Shirley MW, Smith AL. The influence of immunizing dose size and schedule on immunity to subsequent challenge with antigenically distinct strains of *Eimeria maxima*. *Avian Pathol.* 2005 Dec;34(6):489-94.

Blake DP, Shirley MW, Smith AL. Genetic identification of antigens protective against coccidia. *Parasite Immunol.* 2006 Jul;28(7):305-14.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal. Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Blake DP, Qin Z, Cai J, Smith AL. Development and validation of real-time polymerase chain reaction assays specific to four species of *Eimeria*. Avian Pathol. 2008 Feb;37(1):89-94.

Bonelo A, Valmori D, Triponez F, Tiercy JM, Mentha G, Oberholzer J, et al. Generation and characterization of malaria-specific human CD8(+) lymphocyte clones: effect of natural polymorphism on T cell recognition and endogenous cognate antigen presentation by liver cells. Eur J Immunol. 2000 Nov;30(11):3079-88.

Cai X, Fuller AL, McDougald LR, Zhu G. Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. Gene. 2003 Dec 4;321:39-46.

Castañón CAB, Fraga JS, Fernandez S, Gruber A, Costa LD. Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus *Eimeria*. Pattern Recognition. 2007 Jul;40(7):1899-910.

Céré N, Licois D, Humbert JF. Study of the inter- and intraspecific variation of *Eimeria* spp. from the rabbit using random amplified polymorphic DNA. Parasitol Res. 1995;81(4):324-8.

Céré N, Humbert JF, Licois D, Corvione M, Afanassieff M, Chanteloup N. A new approach for the identification and the diagnosis of *Eimeria media* parasite of the rabbit. Exp Parasitol. 1996 Mar;82(2):132-8.

Céré N, Licois D, Humbert JF. Comparison of the genomic fingerprints generated by the random amplification of polymorphic DNA between precocious lines and parental strains of *Eimeria* spp. from the rabbit. Parasitol Res. 1997;83(3):300-2.

Chako CZ, Tyler JW, Schultz LG, Chiguma L, Beerntsen BT. Cryptosporidiosis in people: it's not just about the cows. J Vet Intern Med. 2010 Jan-Feb;24(1):37-43.

Chapman HD, Cherry TE, Danforth HD, Richards G, Shirley MW, Williams RB. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. Int J Parasitol. 2002 May;32(5):617-29.

Chapman HD. Coccidiosis in the turkey. Avian Pathol. 2008 Jun;37(3):205-23.

Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. Vet Res. 2009 Mar-Apr;40(2):37.

Collins TM, Fedrigo O, Naylor GJ. Choosing the best genes for the job: the case for stationary genes in genome-scale phylogenetics. *Syst Biol.* 2005 Jun;54(3):493-500.

Cornelissen AW, Overdulve JP, van der Ploeg M. Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology.* 1984 Jun;88(Pt 3):531-53.

Couch L, Stone PA, Duszynski DW, Snell HL, Snell HM. A survey of the coccidian parasites of reptiles from islands of the Galápagos Archipelago: 1990-1994. *J Parasitol.* 1996 Jun;82(3):432-7.

Coudert P, Licois D, Streun A. Characterization of *Eimeria* species. I. Isolation and study of pathogenicity of a pure strain of *Eimeria perforans*(Leuckart, 1879; Sluiter and Swellengrebel, 1912). *Z Parasitenkd.* 1979 Sep;59(3):227-34.

Coudert P. Some peculiarities of rabbit coccidiosis. In: Yvone P. (Ed.), *Coccidia and Coccidiomorphs*, Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France, 17–20 October. Les Colloques de l'INRA series, vol. 49, INRA, Paris, 1989. p. 481–8.

Coudert P, Licois D, Drouvet-Viard F. *Eimeria* species and strains of rabbits. In: Eckert J, Braun R, Shirley MW, Coudert P. COST. 89/820. *Biotechnology: guidelines on techniques in coccidiosis research*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 1995. p. 52-73.

Current WL, Upton SJ, Long PL. Taxonomy and life cycles. In: Long PL (Ed.) *Coccidiosis of man and domestic animals*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.; 1990. p. 1-16

Dalloul RA, Lillehoj HS. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. *Avian Dis.* 2005 Mar;49(1):1-8.

Donoghue PC, Benton MJ. Rocks and clocks: calibrating the Tree of Life using fossils and molecules. *Trends Ecol Evol.* 2007 Aug;22(8):424-31.

Doran JD. Comparative development of *Eimeria tenella* in primary cultures of kidney cells from the chicken, pheasant, partridge, and turkey. *J Parasitol.* 1971 Dec;57(6):1376-7.

Doran DJ. The life cycle of *Eimeria dispersa* Tyzzer 1929 from the turkey in gallinaceous birds. J Parasitol. 1978 Oct;64(5):882-5.

Doran DJ, Augustine PC. Comparative development of *Eimeria tenella* from sporozoites to oocysts in primary kidney cell cultures from gallinaceous birds. J Protozool. 1973 Nov;20(5):658-61.

Drouet-Viard F, Coudert P, Licois D, Boivin M. Acquired protection of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) against coccidiosis using a precocious line of *Eimeria magna*: effect of vaccine dose and age at vaccination. Vet Parasitol. 1997a May;69(3-4):197-201.

Drouet-Viard F, Coudert P, Licois D, Boivin M. Vaccination against *Eimeria magna* coccidiosis using spray dispersion of precocious line oocysts in the nest box. Vet Parasitol. 1997b Jun;70(1-3):61-6.

Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol Biol. 2007;7:214.

Durham AM, Kashiwabara AY, Matsunaga FT, Ahagon PH, Rainone F, Varuzza L, et al. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. Bioinformatics. 2005 Jun 15;21(12):2812-3.

Dürr U, Pellerdy L. Oxygen consumption of coccidiosis-oocysts during sporulation. Acta Vet Acad Sci Hung. 1969;19(3):307-10.

Duszynski DW. Host specificity in the coccidia of small mammals: Fact or fiction? In: Berecky M. Advances in Protozoological Research. Symposia Biologica Hungarica. Budapest: Akadémiai Kiadó; 1986. vol. 33. p. 325-37.

Duszynski DW, Couch L, Upton SJ. The Coccidia of the World. Available from: <http://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/> [2010 jul 15].

Duszynski DW. Two new coccidia (Protozoa: Eimeriidae) from Costa Rican lizards with a review of the *Eimeria* from lizards. Journal of Protozoology. 1969;16:581-5.

Duszynski DW, Scott DT, Aragon J, Leach A, Perry T. Six new *Eimeria* species from vespertilionid bats of North America. J Parasitol. 1999a Jun;85(3):496-503.

Duszynski DW, Wilson AU, Wade D, Upton SJ, Levine ND. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) in the Primates and the Scandentia. *International Journal of Primatology*. 1999b 20(5):761-97.

Duszynski DW, Upton SJ. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of the mammalian order Insectivora. Special publication of the Museum of Southwestern Biology, N. 4. Albuquerque: The University of New Mexico; 2000.

Duszynski DW. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of the mammalian order Chiroptera. Special publication of the Museum of Southwestern Biology, N. 5, Albuquerque: The University of New Mexico; 2002.

Duszynski DW, Bolek MG, Upton SJ. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of amphibians of the world. *Zootaxa* 1667. 2007.

Eckert J, Braun R, Shirley MW, Coudert P. COST. 89/820. Biotechnology: guidelines on techniques in coccidiosis research. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 1995. 300 p.

Ellis J, Bumstead J. *Eimeria* species: studies using rRNA and rDNA probes. *Parasitology*. 1990 Aug;101(1):1-6.

Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol*. 2010 Apr;26(4):190-6.

Escalante AA, Ayala FJ. Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun20;92(13):5793-7.

Escalante AA, Cornejo OE, Freeland DE, Poe AC, Durrego E, Collins WE, Lal AA. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 8;102(6):1980-5.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998 Mar;8(3):175-85.

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998 Mar;8(3):186-94.

Fernandez S, Costa AC, Katsuyama AM, Madeira AM, Gruber A. A survey of the inter- and intraspecific RAPD markers of *Eimeria* spp. of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools. *Parasitol Res.* 2003a Apr;89(6):437-45.

Fernandez S, Pagotto AH, Furtado MM, Katsuyama AM, Madeira AM, Gruber A. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitology.* 2003b Oct;127(Pt 4):317-25.

Fernandez S, Katsuyama AM, Kashiwabara AY, Madeira AM, Durham AM, Gruber A. Characterization of SCAR markers of *Eimeria* spp. of domestic fowl and construction of a public relational database (The *Eimeria* SCARdb). *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Sep 1;238(1):183-8.

Fernando MA, Remmler O. Four new species of *Eimeria* and one of *Tyzzeria* from the Ceylon jungle fowl *Gallus lafayettei*. *J Protozool.* 1973 Feb;20(1):43-5.

Fitz-Coy SH. Antigenic variation among strains of *Eimeria maxima* and *E. tenella* of the chicken. *Avian Dis.* 1992 Jan-Mar;36(1):40-3.

Gagnon S, Bourbeau D, Levesque RC. Secondary structures and features of the 18S, 5.8S and 26S ribosomal RNAs from the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene.* 1996 Sep 16;173(2):129-35.

Gajadhar AA, Leighton FA. *Eimeria wobeseri* sp. n. and *Eimeria goelandi* sp. n. (Protozoa: Apicomplexa) in the kidneys of herring gulls (*Larus argentatus*). *J Wildl Dis.* 1988 Jul;24(3):538-46.

Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci.* 1996 Dec;12(6):543-8.

Gasser RB, Woods WG, Wood JM, Ashdown L, Richards G, Whithear KG. Automated, fluorescence-based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. *Electrophoresis.* 2001 Oct;22(16):3546-50.

Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 1998 Mar;8(3):195-202

Gutell RR, Gray MW, Schnare MN. A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures: 1993. *Nucleic Acids Res.* 1993 Jul 1;21(13):3055-74.

Hall BG. CodonAlign 2.0, Rochester, NY. 2001. Available from: <http://www.sinauer.com/hall/2e/> [2009 Jan 20].

Hammond DM, Long PL. The Coccidia: *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*, and Related Genera. London: Baltimore & Butterworths: University Park Press; 1973. 539 p.

Hanada S, Omata Y, Umemoto Y, Kobayashi Y, Furuoka H, Matsui T, et al. Relationship between liver disorders and protection against *Eimeria stiedai* infection in rabbits immunized with soluble antigens from the bile of infected rabbits. *Vet Parasitol.* 2003a Feb 13;111(2-3):261-6.

Hanada S, Umemoto Y, Omata Y, Koyama T, Nishiyama K, Kobayashi Y, Furuoka H, Matsui T, Maeda R, Saito A. *Eimeria stiedai* merozoite 49-kDa soluble antigen induces protection against infection. *J Parasitol.* 2003b Jun;89(3):613-7.

Hayakawa T, Culleton R, Otani H, Horii T, Tanabe K. Big bang in the evolution of extant malaria parasites. *Mol Biol Evol.* 2008 Oct;25(10):2233-9.

Hedtke SM, Townsend TM, Hillis DM. Resolution of phylogenetic conflict in large data sets by increased *taxon* sampling. *Syst Biol.* 2006 Jun;55(3):522-9.

Hikosaka K, Watanabe Y, Tsuji N, Kita K, Kishine H, Arisue N, Palacpac NM, Kawazu S, Sawai H, Horii T, Igarashi I, Tanabe K. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Mol Biol Evol.* 2010a May;27(5):1107-16

Hikosaka K, Nakai Y, Watanabe YI, Tachibana SI, Arisue N, Palacpac NM, Toyama T, Honma H, Horii T, Kita K, Tanabe K. Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. *Mitochondrion.* 2010b Oct 31; [Epub ahead of print]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/15677249>.

Hnida JA, Duszynski DW. Cross-transmission studies with *Eimeria arizonensis*, *E. arizonensis*-like oocysts and *Eimeria langebarteli*: host specificity at the genus and species level within the Muridae. *J Parasitol.* 1999b Oct;85(5):873-7.

Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 1999 Sep;9(9):868-77.

Hughes AL, Verra F. Very large long-term effective population size in the virulent human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Proc Biol Sci. 2001 Sep 7;268(1478):1855-60.

Jeffers TK. Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. J Parasitol. 1975 Dec;61(6):1083-90.

Jelínková A, Licois D, Pakandl M. The endogenous development of the rabbit coccidium *Eimeria exigua* Yakimoff, 1934. Vet Parasitol. 2008 Oct 1;156(3-4):168-72.

Jirků M, Jirků M, Oborník M, Lukes J, Modrý D. A model for taxonomic work on homoxenous coccidia: redescription, host specificity, and molecular phylogeny of *Eimeria ranae* Dobell, 1909, with a review of anuran-host *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriorina). J Eukaryot Microbiol. 2009 Jan-Feb;56(1):39-51.

Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Ferreira MU, Kanbara H, Hughes AL. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. Mol Biol Evol. 2005 Aug;22(8):1733-9.

Joyner LP. Host and Site Specificity. In: Long PL. The Biology of the Coccidia. Baltimore: University Park Press; 1982; p. 35-62.

Kalanon M, McFadden GI. Malaria, *Plasmodium falciparum* and its apicoplast. Biochem Soc Trans. 2010 Jun;38(3):775-82.

Kappe SH, Vaughan AM, Boddey JA, Cowman AF. That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda. Science. 2010 May 14;328(5980):862-6.

Kawahara F, Taira K, Nagai S, Onaga H, Onuma M, Nunoya T. Detection of five avian *Eimeria* species by species-specific real-time polymerase chain reaction assay. Avian Dis. 2008 Dec;52(4):652-6.

Kawahara F, Zhang G, Mingala CN, Tamura Y, Koiwa M, Onuma M, Nunoya T. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. Vet Parasitol. 2010 Nov 24;174(1-2):49-57.

Kheysin EM. Life cycles of coccidian of domestic animals. Translated by: Plous FK Jr. Baltimore: University of Park Press; 1971.

Kirkpatrick NC, Blacker HP, Woods WG, Gasser RB, Noormohammadi AH. A polymerase chain reaction-coupled high-resolution melting curve analytical approach for the monitoring of monospecificity of avian *Eimeria* species. *Avian Pathol.* 2009 Feb;38(1):13-9.

Kuo CH, Wares JP, Kissinger JC. The Apicomplexan whole-genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees. *Mol Biol Evol.* 2008 Dec;25(12):2689-98.

Kvičerová J, Ptácková P, Modrý D. Endogenous development, pathogenicity and host specificity of *Eimeria cahirinensis* Couch, Blaustein, Duszynski, Shenbrot and Nevo, 1997 (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Acomys dimidiatus* (Cretzschmar 1826) (Rodentia: Muridae) from the Near East. *Parasitol Res.* 2007 Jan;100(2):219-26.

Kvičerová J, Pakandl M, Hypsa V. Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology.* 2008 Apr;135(4):443-52.

Lainson R, Ribeiro L. *Eimeria lepidosirenis* n.sp. (Apicomplexa:Eimeriidae) of the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa* (Osteichthyes:Dipnoi) from Amazonian Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 May;101(3):327-9.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007 Nov 1;23(21):2947-8.

Law AE, Mullineaux CW, Hirst EM, Saldanha J, Wilson RJ. Bacterial orthologues indicate the malarial plastid gene *ycf24* is essential. *Protist.* 2000 Dec;151(4):317-27.

Leighton FA, Gajadhar AA. *Eimeria fraterculae* sp. n. in the kidneys of Atlantic puffins (*Fratercula arctica*) from Newfoundland, Canada: species description and lesions. *J Wildl Dis.* 1986 Oct;22(4):520-6.

Levine PP. A new coccidium pathogenic for chickens. *Eimeria brunetti* n. sp. (Protozoa: Eimeriidae). *Cornell Veterinarian.* 1942;32:430-9.

Levine ND. *Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man.* Minneapolis: Burgess Publishing Company; 1961. p. 158-253.

Levine ND, Ivens V. Cross-transmission of *Eimeria* spp. (Protozoa, Apicomplexa) of rodents--a review. *J Protozool.* 1988 Aug;35(3):434-7.

Lew AE, Anderson GR, Minchin CM, Jeston PJ, Jorgensen WK. Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. *Vet Parasitol.* 2003 Feb 28;112(1-2):33-50.

Licois P, Coudert P. Coccidioses et diarrhées dulapin à 343 l'engraissement. *Bull. GTV.* 1982(5):109–22.

Licois D, Coudert P, Boivin M, Drouet-Viard F, Provot F. Selection and characterization of a precocious line of *Eimeria intestinalis*, an intestinal rabbit coccidium. *Parasitol Res.* 1990;76(3):192-8.

Licois D, Coudert P, Bahagia S, Rossi GL. Endogenous development of *Eimeria intestinalis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Parasitol.* 1992 Dec;78(6):1041-8.

Licois D, Coudert P, Drouet-Viard F, Boivin M. *Eimeria media*: selection and characterization of a precocious line. *Parasitol Res.* 1994;80(1):48-52.

Licois D, Coudert P, Drouet-Viard F, Boivin M. *Eimeria magna*: pathogenicity, immunogenicity and selection of a precocious line. *Vet Parasitol.* 1995 Nov;60(1-2):27-35.

Lindsay DS, Blagburn BL. Biology of mammalian *Isospora*. *Parasitol Today.* 1994 Jun;10(6):214-20.

Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL. Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):19-34.

Long PL, Millard BJ, Joyner LP, Norton CC. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Lat.* 1976 Jul-Sep;6(3):201-17.

Long PL, Millard BJ. Rejection of *Eimeria* by foreign hosts. *Parasitology.* 1979a Apr;78(2):239-47.

Long PL, Millard BJ. Immunological differences in *Eimeria maxima*: effect of a mixed immunizing inoculum on heterologous challenge. *Parasitology.* 1979b Dec;79(3):451-7.

Long PL, Joyner LP. Problems in the identification of species of *Eimeria*. J Protozool. 1984 Nov;31(4):535-41.

Maddison WP, Maddison DR. MacClade: analysis of phylogeny and character evolution. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 1992.

Marquardt WC. Host and Site Specificity in the Coccidia. In: Hammond DM, Long PL. The Coccidia. Baltimore & Butterworths, London: University Park Press; 1973; p. 23-43.

Mayberry LF, Marquardt WC, Nash DJ, Plan B. Genetic dependent transmission of *Eimeria separata* from *Rattus* to three strains of *Mus musculus*, an abnormal host. J Parasitol. 1982 Dec;68(6):1124-6.

Martin AG, Danforth HD, Barta JR, Fernando MA. Analysis of immunological cross-protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of *Eimeria maxima*. Int J Parasitol. 1997 May;27(5):527-33.

Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics. 2010 Oct 1;26(19):2462-3.

McAllister CT, Upton SJ. The coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of Crocodilia, with descriptions of two new species from *Alligator mississippiensis* (Reptilia: Alligatoridae), from Texas. Journal of Parasitology. 1990;76:332-6.

McDonald V, Shirley MW, Bellatti MA. *Eimeria maxima*: characteristics of attenuated lines obtained by selection for precocious development in the chicken. Exp Parasitol. 1986 Apr;61(2):192-200.

McDougald LR, Jeffers TK. *Eimeria tenella* (Sporozoa, Coccidia): Gametogony following a single asexual generation. Science. 1976 Apr 16;192(4236):258-9.

McDougald LR, Reid WM. Coccidiosis. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM. Diseases of Poultry. 10th ed. Ames: Iowa State University Press; 1997. p. 865-83.

McQuiston TE. *Eimeria palumbi*, a New Coccidian Parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos Dove (*Zenaida galapagoensis*). TRANS. AM. MICROSC. Soc. 1991 Apr;110(2):178-81.

Mehlhorn H. Encyclopedia of Parasitology. 3rd ed. Heidelberg: Springer; 2008.

Min W, Dalloul RA, Lillehoj HS. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. J Vet Sci. 2004 Dec;5(4):279-88.

Miska KB, Schwarz RS, Jenkins MC, Rathinam T, Chapman HD. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Eimeria* from turkeys and gamebirds: implications for evolutionary relationships in Galliform birds. J Parasitol. 2010 Oct;96(5):982-6.

Morgan JA, Morris GM, Wlodek BM, Byrnes R, Jenner M, Constantinoiu CC, et al. Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens. Mol Cell Probes. 2009 Apr;23(2):83-9.

Morrison DA, Bornstein S, Thebo P, Wernery U, Kinne J, Mattsson JG. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidian (Sporozoa). Int J Parasitol. 2004 Mar 29;34(4):501-14.

Morrison WI. The biological and practical significance of antigenic variability in protective T cell responses against *Theileria parva*. Vet Parasitol. 2007 Aug 19;148(1):21-30.

Morrison WI. Progress towards understanding the immunobiology of *Theileria* parasites. Parasitology. 2009 Oct;136(12):1415-26.

Mu J, Joy DA, Duan J, Huang Y, Carlton J, Walker J, Barnwell J, Beerli P, Charleston MA, Pybus OG, Su XZ. Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. Mol Biol Evol. 2005 Aug;22(8):1686-93.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335-50.

Musaev M, Gaibova G, Ismailova G, Alieva F, Iskenderova N. The Coccidia of the Gallinaceous Birds in Azerbaijan. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences. 1998;22:409-13.

Norton CC, Hein HE. *Eimeria maxima*: a comparison of two laboratory strains with a fresh isolate. Parasitology. 1976 Jun;72(3):345-54.

Norton CC, Catchpole J, Rose ME. *Eimeria stiedai* in rabbits: the presence of an oocyst residuum. *Parasitology*. 1977 Aug;75(1):1-7.

Norton CC, Catchpole J, Joyner LP. Redescriptions of *Eimeria irresidua* Kessel & Jankiewicz, 1931 and *E. flavescens* Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. *Parasitology*. 1979 Oct;79(2):231-48.

Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jan;23(1):218-34.

Owen D. Life cycle of *Eimeria stiedae*. *Nature*. 1970 Jul 18;227(5255):304.

Pakandl M. Efficacy of salinomycin, monensin and lasalocid against spontaneous *Eimeria* infection in rabbits. *Folia Parasitol (Praha)*. 1986;33(3):195-8.

Pakandl M. Description of *Eimeria vej dovskyi* sp.n. and redescription of *Eimeria media* Kessel, 1929 from the rabbit. *Folia Parasitol(Praha)*. 1988;35(1):1-9.

Pakandl M. Life cycle of *Eimeria coecicola* Cheissin, 1947. *Folia Parasitol (Praha)*. 1989;36(2):97-105.

Pakandl M, Licois D, Coudert P. Electron microscopic study on sporocysts and sporozoites of parental strains and precocious lines of rabbit coccidian *Eimeria intestinalis*, *E. media* and *E. magna*. *Parasitol Res*. 2001 Jan;87(1):63-6.

Pakandl M. Selection of a precocious line of the rabbit coccidium *Eimeria flavescens* Marotel and Guilhon (1941) and characterization of its endogenous cycle. *Parasitol Res*. 2005 Sep;97(2):150-5.

Pakandl M, Jelínková A. The rabbit coccidium *Eimeria piriformis*: Selection of a precocious line and life-cycle study. *Vet Parasitol*. 2006 Apr 30;137(3-4):351-4.

Pakandl M, Hlaskova L. The reproduction of *Eimeria flavescens* and *Eimeria intestinalis* in suckling rabbits. *Parasitol Res*. 2007 Oct;101(5):1435-7.

Pakandl M, Hlásková L, Poplstein M, Neveceralová M, Vodicka T, Salát J, Mucksová J. Immune response to rabbit coccidiosis: a comparison between infections with *Eimeria flavescens* and *E. intestinalis*. *Folia Parasitol (Praha)*. 2008a Mar;55(1):1-6.

Pakandl M, Hlášková L, Poplstein M, Chromá V, Vodicka T, Salát J, Mucksová J. Dependence of the immune response to coccidiosis on the age of rabbit suckling. *Parasitol Res.* 2008b Nov;103(6):1265-71.

Pakandl M. Coccidia of rabbit: a review. *Folia Parasitol (Praha).* 2009 Sep;56(3):153-66.

Pamilo P, Nei M. Relationships between gene trees and species trees. *Mol Biol Evol.* 1988 Sep;5(5):568-83.

Peeters JE, Geeroms R. Efficacy of toltrazuril against intestinal and hepatic coccidiosis in rabbits. *Vet Parasitol.* 1986 Nov;22(1-2):21-35.

Perrière G, Gouy M. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie.* 1996;78:364-9.

Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14(9):817-8.

Power ML, Richter C, Emery S, Hufschmid J, Gillings MR. *Eimeria trichosuri*: phylogenetic position of a marsupial coccidium, based on 18S rDNA sequences. *Exp Parasitol.* 2009 Jun;122(2):165-8.

Procunier JD, Fernando MA, Barta JR. Species and strain differentiation of *Eimeria* spp. of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. *Parasitol Res.* 1993;79(2):98-102.

Rambaut, A. Se-AL v2.0: Sequence alignment editor. 1996. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/> [2009 jan 20].

Rambaut A, Drummond AJ. Tracer v1.4. 2007. Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer/> [2010 jan 10].

Reduker DW, Duszynski DW. *Eimeria ladronensis* n. sp. and *E. albigulae* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the woodrat, *Neotoma albigula* (Rodentia: Cricetidae). *J Protozool.* 1985 Aug;32(3):548-50.

Reduker DW, Duszynski DW, Yates TL. Evolutionary relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa) infecting cricetid rodents. *Can J Zool.* 1987;65:722-35.

Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 2000 Jun;16(6):276-7.

Rich SM, Licht MC, Hudson RR, Ayala FJ. Malaria's Eve: evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4425-30.

Ricklefs RE, Outlaw DC. A molecular clock for malaria parasites. *Science.* 2010 Jul 9;329(5988):226-9.

Rokas A, Williams BL, King N, Carroll SB. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):798-804.

Romano CM. Caracterização Molecular e análise comparativa de genomas mitocondriais de *Eimeria* spp. de galinha doméstica. [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.

Roos DS. Genetics. Themes and variations in apicomplexan parasite biology. *Science.* 2005 Jul 1;309(5731):72-3.

Rose ME. Immunity. In: Hammond DM, Long PL. *The coccidia*. Baltimore: University Park Press; 1973. p. 295–341.

Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M, von Haeseler A. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics.* 2002 Mar;18(3):502-4.

Schnitzler BE, Thebo PL, Mattsson JG, Tomley FM, Shirley MW. Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathol.* 1998;27(5):490-7.

Schnitzler BE, Thebo PL, Tomley FM, Uggla A, Shirley MW. PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. *Avian Pathol.* 1999 Feb;28(1):89-93.

Scott DT, Duszynski DW. *Eimeria* from bats of the world: two new species from *Myotis* spp. (Chiroptera: Vespertilionidae). *J Parasitol.* 1997 Jun;83(3):495-501.

Segade P, Crespo C, Ayres C, Cordero A, Arias MC, García-Estévez JM, Iglesias Blanco R. *Eimeria* species from the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Reptilia: Testudines), in Galicia (NW Spain), with description of two new species. J Parasitol. 2006 Feb;92(1):69-72.

Seville RS, Gruver J. Species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in central Wyoming. J Parasitol. 2004Apr;90(2):348-51.

Shirley MW. Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. Parasitology. 1975 Dec;71(3):369-76.

Shirley MW. Electrophoretic variation of enzymes: a further marker for genetic studies of the *Eimeria*. Z Parasitenkd. 1978 Sep 4;57(1):83-7.

Shirley MW, Bellatti MA. Live attenuated coccidiosis vaccine: selection of a second precocious line of *Eimeria maxima*. Res Vet Sci. 1988 Jan;44(1):25-8.

Shirley MW, Bumstead N. Intra-specific variation within *Eimeria tenella* detected by the random amplification of polymorphic DNA. Parasitol Res. 1994;80(4):346-51.

Shirley MW. Coccidial parasites from the chicken: discrimination of different populations of *Eimeria tenella* by DNA hybridization. Res Vet Sci. 1994 Jul;57(1):10-4.

Shirley MW. The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella*--a coccidium from the chicken. Int J Parasitol. 2000 Apr 10;30(4):485-93.

Shirley MW, Ivens A, Gruber A, Madeira AM, Wan KL, Dear PH, Tomley FM. The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. Trends Parasitol. 2004 May;20(5):199-201.

Shirley MW, Smith AL, Tomley FM. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. Adv Parasitol. 2005;60:285-330.

Shirley MW, Smith AL, Blake DP. Challenges in the successful control of the avian coccidia. Vaccine. 2007 Jul 26;25(30):5540-7.

Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. Science. 2004 Apr 9;304(5668):248-53.

Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004 Mar 27;363(9414):1017-24.

Siroký P, Kamler M, Modrý D. *Eimeria lokuma* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new coccidium from the African helmeted turtle *Pelomedusa subrufa* (Lacépède) (Testudines: Pelomedusidae). *Syst Parasitol*. 2006 Sep;65(1):73-6.

Smith AL, Hesketh P, Archer A, Shirley MW. Antigenic diversity in *Eimeria maxima* and the influence of host genetics and immunization schedule on cross-protective immunity. *Infect Immun*. 2002 May;70(5):2472-9.

Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006 Nov 1;22(21):2688-90.

Striepen B, White MW, Li C, Guerini MN, Malik SB, Logsdon JM, Jr., et al. Genetic complementation in apicomplexan parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 30;99(9):6304-9.

Strimmer K, von Haeseler A. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 24;94(13):6815-9.

Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*. 2003 Jan 17;299(5605):414-6.

Sutton CA, Shirley MW, Wisher MH. Characterization of coccidial proteins by two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology*. 1989;99(2):175-87.

Stucki U, Braun R, Roditil. *Eimeria tenella*: characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species-specific probe. *Exp Parasitol*. 1993 Feb;76(1):68-75.

Swofford DL. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4beta10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2002.

Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000 Nov;30(12-13):1217-58.

Tenter AM, Barta JR, Beveridge I, Duszynski DW, Mehlhorn H, Morrison DA, Thompson RC, Conrad PA. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. Int J Parasitol. 2002 May;32(5):595-616.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997; Dec 15;25(24):4876-82.

Tyzzar EE. Coccidiosis in gallinaceous birds. Am J Epidemiol. 1929 Sep 10(2): 269-383.

Upton SJ, Reduker DW, Current WL, Duszynski DW. Taxonomy of North American fish Eimeriidae, NOAA Technical Report NMFS 11. 1984. p. 18.

Upton SJ, Oppert CJ. Description of the oöcysts of *Eimeria arnyi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern ring neck snake *Diadophis punctatus arnyi* (Serpentes: Colubridae). Systematic Parasitology 1991; 20:195-7.

Upton SJ, McAllister CT, Brillhart DB, Duszynski DW, Wash CD. Cross-transmission studies with *Eimeria arizonensis*-like oocysts (Apicomplexa) in New World rodents of the Genera *Baiomys*, *Neotoma*, *Onychomys*, *Peromyscus*, and *Reithrodontomys* (Muridae). J Parasitol. 1992 Jun;78(3):406-13.

Vannier E, Gewurz BE, Krause PJ. Human babesiosis. Infect Dis Clin North Am. 2008 Sep;22(3):469-88, viii-ix.

Vetterling JM. *Eimeria tenella*: host specificity in gallinaceous birds. J Protozool. 1976 Feb;23(1):155-8.

Vrba V, Blake DP, Poplstein M. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. Vet Parasitol. 2010 Dec;174(3-4):183-90.

Wilson RJ, Williamson DH. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. Microbiol Mol Biol Rev. 1997 Mar;61(1):1-16.

Yabsley MJ, Gottdenker NL, Fischer JR. Description of a new *Eimeria* sp. and associated lesions in the kidneys of double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*). J Parasitol. 2002 Dec;88(6):1230-3.

Zhao X, Duszynski DW. Phylogenetic relationships among rodent *Eimeria* species determined by plastid ORF470 and nuclear 18S rDNA sequences. Int J Parasitol. 2001a May 15;31(7):715-9.

Zhao X, Duszynski DW. Molecular phylogenies suggest the oocyst residuum can be used to distinguish two independent lineages of *Eimeria* spp in rodents. Parasitol Res. 2001b Aug;87(8):638-43

Zhao X, Duszynski DW, Loker ES. Phylogenetic position of *Eimeria antrozoii*, a bat coccidium (Apicomplexa: Eimeriidae) and its relationship to morphologically similar *Eimeria* spp. from bats and rodents based on nuclear 18S and plastid 23S rDNA sequences. J Parasitol. 2001 Oct;87(5):1120-3.