HORWALD ALEXANDER BEDOYA LLANO

Caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em aves silvestres de diversas classes taxonômicas: relações entre *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona* e organismos correlacionados prevalentes no Brasil

São Paulo

2019

Horwald Alexander Bedoya Llano

Caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em aves silvestres de diversas classes taxonômicas: relações entre *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona* e organismos correlacionados prevalentes no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental aplicada às zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3851
FMVZ

Bedoya Llano, Horwald Alexander

Caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em aves silvestres de diversas classes taxonômicas: relações entre *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona* e organismos correlacionados prevalentes no Brasil / Horwald Alexander Bedoya Llano. – 2019.

128 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2019.

1. 18S. 2. Atoplasma. 3. COX1. 4. ITS1. 5. SAG. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

São Paulo, 17 de abril de 2019
CEUA N [9077070416](#)

IImo(a). Sr(a).

Responsável: Rodrigo Martins Soares

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Título da proposta: "Caracterização molecular de Sarcocystis spp em aves silvestres de diversas classes taxonômicas: relações entre Sarcocystis falcatula, Sarcocystis neurona e organismos correlacionados prevalentes no Brasil."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 004524)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Parcial (versão de 31/janeiro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: Todas as amostras já foram processadas em laboratório. Os resultados estão sendo analisados in silico. 2. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: seis meses. 3. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: Sim. 4. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: Não."

Comentário da CEUA: "Apresentado relatório parcial do estudo, o qual se estenderá por mais seis meses."

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Pa

FICHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LLANO, Horwald Alexander Bedoya

Título: Caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em aves silvestres de diversas classes taxonômicas: relações entre *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona* e organismos correlacionados prevalentes no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: __/__/__

BANCA EXANIMADORA

Prof. Dr.

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Julgamento: _____

A minha mãe, com todo o amor

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

A meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela oportunidade dada, por todos seus ensinamentos, pela paciência, orientação, disponibilidade e amizade no decorrer destes anos.

À profa. Dra. Lara Borges Keid por seus ensinamentos, paciência e pela ajuda que me ofereceu em todo o relacionado com o laboratório.

Ao Prof. Dr. Luís Pita Gondim pela sua amizade, confiança, ensinamentos, e pela disponibilização do Laboratório da UFBA para a realização de parte deste trabalho.

À Profa. Dra. Solange Gennari por abrir as portas da USP para mim, pelo apoio, ensinamentos e carinho com que trata a todos seus alunos.

Aos professores do Curso de Pós-graduação, especialmente àqueles com quem tive mais contato, ao Prof. Dr. Marcelo Labruna, Prof. Dr. Paulo Brandão e Prof. Dr. Fábio Gregori cujos ensinamentos contribuíram para minha formação.

Ao Silvio e à Maisa por me fazer parte da sua família quando morei na capital, mas sobretudo a Silvio por me transmitir o amor de trabalhar com fezes.

À Profa. Andréa Caetano da Silva quem abriu as portas do Brasil para mim.

Aos meus amigos colombianos que tanto admiro, respeito e são exemplo de tenacidade, Alejo, Gina, Juan David, Tatiana, Marisol e Santiago.

Aos amigos que encontrei no VPS-Pirassununga, Thiago, Patrícia, David, Leandro, Luana, Shara e Denissato.

Ao Prof. Dr. Adroaldo Zanella e à sua família pela sua amizade.

Aos meus mais recentes amigos da Bahia, Waléria, Rogério, Tainar, Aline, Carol, Mariana, Júlia, Bia e Ademir.

A todos os funcionários do VPS pelo auxílio sempre que necessário, João, Nil, Renatinho, Danival e Cristina.

Aos médicos veterinários e pessoal do DEPAVE pela colaboração direta com este trabalho.

Aos meus colegas do laboratório Jaqueline, Thalita, Dany, Glaucia, Heloise, meu muito obrigado pelo apoio, amizade e pela oportunidade de me apaixonar pelos “bichos” aquáticos.

À minha família, especialmente à minha mãe pelo seu amor, por acreditar em mim e me apoiar em todo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio financeiro, processo nº161046/2015-0.

E por fim...Ao meu Brasil brasileiro que tanto amo e levo no meu coração.

Eternamente grato.

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena
(Fernando Pessoa)

RESUMO

LLANO, H.A.B. **Caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em aves silvestres de diversas classes taxonômicas: relações entre *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona* e organismos correlacionados prevalentes no Brasil.** 2019. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Sarcocystis são parasitos coccídios intracelulares caracterizados por um ciclo de vida obrigatório em dois hospedeiros. Multiplicação assexuada do parasito ocorre em hospedeiros intermediários, geralmente onívoros, com formação de cistos na musculatura. A fase sexual, com formação de oocistos/espocistos, ocorre no intestino delgado de hospedeiros definitivos, geralmente carnívoros. Mais de 30 espécies de *Sarcocystis* são reconhecidas em aves e algumas delas, como *S. falcatula* e *S. calchasi*, podem ser patogênicas para hospedeiros aberrantes. Em aves que atuam como hospedeiros intermediários, a infecção ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados com esporocistos. Aves que atuam como hospedeiros definitivos se infectam pelo consumo de tecidos contendo cistos. Poucos estudos em sarcocistose aviária têm sido realizados na América do Sul. No presente estudo, investigamos a presença de coccídios formadores de cistos na musculatura de aves silvestres coletadas pela Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Gestão da Fauna Selvagem (DEPAVE-3) no estado de São Paulo, Brasil. Amostras de músculo peitoral de 400 aves pertencentes a 103 espécies foram submetidas a extração e amplificação de DNA pela *n*PCR-ITS1 direcionada à sequência do primeiro espaço transcrito interno do DNA ribossômico para triagem das amostras. Estes primers permitem a detecção de uma ampla diversidade de organismos pertencentes a família Sarcocystidae, pois hibridizam em regiões conservadas dos genes codificadores de DNA ribossômico 18S e 5.8S. Em amostras positivas na *n*PCR-ITS1, outros fragmentos gênicos foram amplificados por PCR. Amostras relacionadas com *S. falcatula* foram caracterizadas com sequências gênicas codificadoras de antígenos de superfície (SAGs) e nas demais amostras, genes mais conservados como citocromo c oxidase subunidade I (COX1) e a fração do gene do DNA ribossômico (18S rDNA) foram amplificados. Os produtos amplificados foram sequenciados, em todos os casos. Com esta metodologia, 36 amostras positivas na *n*PCR-ITS1, foram relacionadas com *S. falcatula*, das quais 28 foram identificadas como *S. falcatula* (10 Piciformes, 8 Psittaciformes, 5 Columbiformes, 2 Accipitriformes, 1 Anseriformes, 1 Passeriformes, 1 Strigiformes), 7 como *Sarcocystis* sp. ex *Cacicus haemorrhous* (6 Passeriformes, 1 Piciformes), e uma como *Sarcocystis* sp. ex *Guirra guirra* (1 Cuculiforme). As duas últimas espécies são inéditas. Dez amostras de outros Sarcocystídeos também foram amplificadas na *n*PCR-ITS1, das quais uma foi identificada como *S. halioti* (1 Accipitriformes), seis como *Toxoplasma gondii* (3 Pelecaniformes, 2 Falconiformes, 1 Columbiformes), uma como *Sarcocystis* sp. ex *Coragyps atratus* (1 Cathartiformes) e uma como *Atoxoplasma* sp. ex *Icterus jamaicae* (1 Passeriformes). As duas últimas espécies são inéditas. Este estudo é a primeira pesquisa extensiva em aves silvestres no Brasil para espécies de Sarcocistídeos, relatando pela primeira vez infecção natural com *S. falcatula* em 14 espécies incluindo a Ordem Piciformes e mostrando a ampla diversidade de hospedeiros intermediários da América do Sul para *Sarcocystis* spp.

Palavras chave: 18S; Atoxoplasma; COX1; ITS1; SAG

ABSTRACT

LLANO, H.A.B. ***Sarcocystis* spp. molecular characterization in wild birds from different taxonomic classes: relations between *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona* and prevailing organisms associated in Brazil.** 2019. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Sarcocystis are intracellular coccidial parasites characterized by an obligatory life cycle in two hosts. Asexual multiplication of the parasite occurs in intermediate hosts, usually omnivores, with formation of cysts in the musculature. The sexual phase, with formation of oocysts / sporocysts, occurs in the small intestine of definitive hosts, usually carnivores. More than 30 species of *Sarcocystis* are recognized in birds and some of them, such as *S. falcatula* and *S. calchasi*, may be pathogenic for aberrant hosts. In birds that act as intermediate hosts, infection occurs by ingesting food or water contaminated with sporocysts. Birds that act as definitive hosts become infected by consuming tissue containing cysts. Few studies on avian sarcocystosis have been conducted in South America. Herein, we investigated the presence of cyst-forming coccidia in wild bird musculature collected by the Technical Division of Veterinary Medicine and Management of Wild Fauna (DEPAVE-3) in the state of São Paulo Brazil. Pectoral muscle samples from 400 birds belonging to 103 species were subjected to DNA extraction, and amplification by nPCR-ITS1 directed to the sequence of the first internal transcribed ribosomal DNA space for sample screening. These primers allow the detection of a wide diversity of organisms belonging to the Sarcocystidae family, as they hybridize in conserved regions of 18S and 5.8S ribosomal DNA coding genes. In nPCR-ITS1 positive samples, other gene fragments were amplified by PCR. *S. falcatula*-related samples were characterized with surface antigen coding gene sequences (SAGs), and in the other samples, more conserved genes such as cytochrome c oxidase subunit I (COX1) and the ribosomal DNA gene fraction (18S rDNA) were amplified. Amplified products were sequenced in all cases. With this methodology, 36 nPCR-ITS1 positive samples were related to *S. falcatula*, of which 28 were identified as *S. falcatula* (10 Piciformes, 8 Psittaciformes, 5 Columbiformes, 2 Accipitriformes, 1 Anseriformes, 1 Passeriformes, 1 Strigiformes), 7 as *Sarcocystis* sp. ex *Cacicus haemorrhous* (6 Passeriformes, 1 Piciformes), and one as *Sarcocystis* sp. ex *Guiraca guiraca* (1 Cuculiformes). The last two species are unpublished. Ten samples of other Sarcocystids were also amplified in nPCR-ITS1, one of which was identified as *S. halioti* (1 Accipitriformes), six as *Toxoplasma gondii* (3 Pelecaniformes, 2 Falconiformes, 1 Columbiformes), one as *Sarcocystis* sp. ex *Coragyps atratus* (1 Cathartiformes) and one as *Atoxoplasma* sp. ex *Icterus jamacaii* (1 Passeriformes). The last two species are unpublished. This study is the first extensive survey of wild birds in Brazil for Sarcocystidae species, reporting for the first-time natural *S. falcatula* infection in 14 species including the Order Piciformes and showing the wide diversity of South American intermediate hosts for *Sarcocystis* spp.

Keywords: 18S; Atoxoplasma; COX1; ITS1; SAG

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação taxonômica de Sarcocistídeos.....	19
Figura 2. Proporção de classes de vertebrados identificadas como hospedeiros intermediários e definitivos de <i>Sarcocystis</i> spp. disponíveis na literatura.	20
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Sarcocystis falcatula</i>	22
Figura 4. Loci codificador de DNA ribossômico em eucariotos.....	25
Figura 5. Fluxograma da metodologia empregada para identificação molecular de Sarcocistídeos em tecido muscular de aves.	34
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de nPCR-ITS1	40
Figura 7. Análise filogenética de <i>Sarcocystis</i> spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (ITS1)	46
Figura 8. Análise filogenética de <i>Sarcocystis</i> spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (SAG-2).....	57
Figura 9. Análise filogenética de <i>Sarcocystis</i> spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (SAG-3).....	58
Figura 10. Análise filogenética de <i>Sarcocystis</i> spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (SAG-4).....	59
Figura 11. Número de aves positivas para <i>S. falcatula</i> em relação à Ordem.....	60
Figura 12. <i>Sarcocystis falcatula</i> em músculo peitoral de Tucano de bico verde (<i>Ramphastos dicolorus</i>).	69
Figura 13. Macrocistos de <i>Sarcocystis</i> sp. em Guaxe (<i>Cacicus haemorrhous</i>).....	71
Figura 14. <i>Sarcocystis</i> sp. em músculo peitoral do Guaxe (<i>Cacicus haemorrhous</i>).72	
Figura 15. Análise filogenética de <i>Sarcocystis</i> spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (ITS1)	77
Figura 16. Análise filogenética de <i>Atoxoplasma</i> sp. ex <i>Icterus jamacaii</i> de um corupião de Brasil com sequências (18S rDNA).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de aves positivas para Sarcocistídeos pela <i>n</i> PCR-ITS1 e suas respectivas identificações moleculares	41
Tabela 2. Identidade de genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs) em aves positivas para <i>Sarcocystis</i> spp. com sequências homólogas de <i>Sarcocystis</i> spp. detectados em outros inquéritos no Brasil.	50
Tabela 3. Distância <i>p</i> das regiões 18S, COX1 e ITS1 entre sequências <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Accipiter striatus</i> , <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Coragyps atratus</i> e espécies de <i>Sarcocystis</i> em aves	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estudos de caracterização molecular de <i>Sarcocystis</i> spp. em aves	28
Quadro 2. Sequências dos primers utilizados nas reações de <i>nested</i> -PCR e seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados.....	37

APÊNDICE

Lista de aves amostradas.....	109
-------------------------------	-----

ANEXO

Laudo necroscópico da espécie <i>Cacicus haemorrhous</i> (#282-Guaxe)	128
---	-----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA DE PESQUISA	19
3. OBJETIVO	32
4. METODOLOGIA	32
4.1 Animais	32
4.2 Extração de DNA	32
4.3 Amplificação de DNA	33
4.3.1 Nested-PCR	34
4.4 Detecção do produto amplificado	35
4.5 Purificação do produto amplificado	36
4.6 Sequenciamento automático	36
4.7 Precipitação de DNA	36
4.8 Sequenciamento	37
4.9 Edição das sequências e análise molecular	38
4.10 Microscopia	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Triagem das amostras com nPCR-ITS1	40
5.2. Caracterização molecular das amostras positivas para fragmentos de nPCR-ITS1 de 1000bp	46
5.2.1 Análise de SAGs	49
5.2.2. Aspectos epidemiológicos e morfológicos de <i>S. falcatula</i>	60
5.2.3 Aspectos epidemiológicos e morfológicos de <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Cacicus haemorrhous</i>	70
5.3 Caracterização molecular das amostras positivas para fragmentos de nPCR-ITS1 entre 500 e 1000 pb	73
5.3.1 <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Accipiter striatus</i> (#213)	75
5.3.2 <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Coragyps atratus</i> (#471)	76
5.4 Caracterização molecular das amostras positivas para fragmentos de nPCR-ITS1 de 500bp	78
5.4.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	79
5.4.2 <i>Atoxoplasma</i> sp. ex <i>Icterus jamaicaii</i>	82
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	87
Apêndice A	109
Anexo	128

1. INTRODUÇÃO

Sarcocystis são parasitos intracelulares caracterizados por um ciclo de vida obrigatório em dois hospedeiros, sendo um denominado hospedeiro intermediário e outro, hospedeiro definitivo. Multiplicação assexuada do parasito com formação de cistos maduros na musculatura ocorre somente em hospedeiros intermediários, geralmente onívoros. A fase sexual, com formação de oocistos/espocistos, ocorre exclusivamente no intestino delgado de hospedeiros definitivos, geralmente carnívoros. Enquanto hospedeiros intermediários infectam-se após ingestão de esporocistos disponíveis no ambiente, os hospedeiros definitivos infectam-se exclusivamente pela ingestão de cistos maduros, por hábitos carnivoristas.

Mais de 30 espécies de *Sarcocystis* são reconhecidas em aves e algumas delas, como *Sarcocystis falcatula* e *Sarcocystis calchasi*, podem ser patogênicas para hospedeiros aberrantes. Todavia, poucos estudos sobre o conhecimento da diversidade de *Sarcocystis* spp. em aves têm sido realizados na América do Sul.

Assim, entende-se relevante a pesquisa de evidências de infecção de aves silvestres por Sarcocistídeos para contribuir com o conhecimento da biologia do agente e de aspectos epidemiológicos da infecção por parasitos deste grupo no Brasil e, por conseguinte, no continente sul americano.

A identificação da presença de DNA de parasitos Sarcocistídeos em musculatura de aves silvestres pode constituir-se em evidência do papel destes vertebrados como hospedeiros intermediários nas sarcocistose e, por este motivo, desenhou-se o experimento presente para identificar sequências gênicas de Sarcocistídeos em aves de diversas Ordens taxonômicas capturadas em um centro de triagem de animais silvestres localizado no estado de São Paulo. A identificação molecular de sequências de parasitos em um tecido animal permite uma inferência razoável sobre a ocorrência real da infecção.

Os resultados encontrados neste inquérito, além de relevantes *per se*, devem estimular e subsidiar pesquisas similares em outros biomas e com outras populações e assim, propagar e multiplicar o conhecimento a respeito dos Sarcocistídeos.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA DE PESQUISA

Protistas do gênero *Sarcocystis* são protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, Sub-classe Coccidia, ao qual também pertencem mais de 5000 espécies de microrganismos, muitos deles estreitamente relacionados com doenças de importância em humanos e animais como *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp. e *Neospora* spp. (Figura 1). Em virtude da taxonomia, as espécies desta sub-classe são genericamente referidas como coccídios.

Figura 1. Classificação taxonômica de Sarcocistídeos

Fonte: Adaptado de *Lifemap National Center for Biotechnology Information* (VIENNE, 2016)

O primeiro relato do gênero *Sarcocystis* foi descrito na Suíça por Miescher em 1843, quem observou lesões com aparência de “fios brancos leitosos” na musculatura de um rato. Anos depois, em 1882, Lankester cunhou o nome de *Sarcocystis* do grego *sarkos* (carne) e *kystis* (bexiga) com base na aparência e localização do cisto muscular (sarcocisto).

Os coccídios do gênero *Sarcocystis* infectam mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes evoluindo para ter um ciclo de vida heteróximo obrigatório, consistindo de um hospedeiro definitivo que é um predador ou onívoro e um

hospedeiro intermediário que é um onívoro ou herbívoro. Há cerca de 210 espécies de *Sarcocystis* nomeadas, no entanto, o ciclo de vida completo é conhecido apenas para 26 delas (DUBEY et al., 2015a). A maioria destas espécies são relatadas em hospedeiros intermediários, sendo que em menos da metade delas é o hospedeiro definitivo conhecido (PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012). Assim, relativamente poucas espécies de aves identificadas como hospedeiros intermediários ou definitivos têm sido descritas quando comparadas com mamíferos (Figura 2).

Figura 2. Proporção de classes de vertebrados identificadas como hospedeiros intermediários e definitivos de *Sarcocystis* spp. disponíveis na literatura.

Fonte: Adaptado de Prakas e Butkauskas (2012)

Odening descreveu 20 espécies de *Sarcocystis* em aves atuando como hospedeiros intermediários e 12 *Sarcocystis* spp. em aves como hospedeiros definitivos (ODENING, 1998). Nesse mesmo estudo foi verificado que muitas espécies de *Sarcocystis* descritas em aves correspondiam a uma única espécie, como no caso de *Sarcocystis jacarine* encontrado em Tiziu (*Volatinia jacarina*) no ano 1940, anos mais tarde foi confirmado que essa espécie correspondia a *S. falcatula*.

Algumas espécies de *Sarcocystis* geralmente são mais específicas em relação ao hospedeiro intermediário que ao hospedeiro definitivo. Por exemplo *Sarcocystis cruzi* tem como hospedeiro intermediário os bovinos e bubalinos, enquanto hospedeiros definitivos são o cão, lobo, coiote, guaxinim, chagal e raposa (DUBEY et al., 2015a). Essa especificidade não ocorre com *S. falcatula* e

Sarcocystis neurona, sendo que ambos parasitos têm como hospedeiro definitivo espécies de gambá, mas como hospedeiros intermediários, grande variedade de aves e mamíferos, respectivamente.

O primeiro estudo indicando a importância do gambá como hospedeiro definitivo na sarcocistose aviária foi no Texas, EUA (BOX; DUSZYNSKI, 1978). Tecidos de músculo peitoral contendo cistos macroscópicos de aves passeriformes naturalmente infectadas foram utilizados para alimentar gambás da espécie *Didelphis virginiana*, ocorrendo a liberação de esporocistos nas fezes, que por sua vez foram fonte de infecção para outras aves passeriformes, completando assim o ciclo. Com o intuito de conhecer outras espécies de aves susceptíveis à infecção por *Sarcocystis* spp., esporocistos coletados a partir de gambás (*D. virginiana*) experimentalmente infectados foram inoculados oralmente em aves, desta vez incluindo vários gêneros pertencentes à Ordem Passeriformes, Psitaciformes, Columbiformes e Galliformes (BOX; SMITH, 1982). Aves pertencentes às duas primeiras Ordens foram suscetíveis à infecção vindo a óbito em poucos dias e apresentando lesões em pulmão, com detecção das fases assexuadas de reprodução (merogonia) e/ou formação de cistos em músculos. Em aves Columbiformes foram achadas lesões pulmonares associadas a merontes, mas sem presença de cistos, já para aves Galliformes não foi detectada infecção. Esta resistência à infecção, também foi observada em Anseriformes (BOX; DUSZYNSKI, 1978).

O gambá se infecta após ingerir tecido muscular cru (ou ocasionalmente, tecido neural), contendo sarcocistos maduros com bradizoítos em seu interior. Oocistos não são fonte de infecção para o hospedeiro definitivo. Bradizoítos são liberados do sarcocisto pela digestão no estômago e intestino, penetrando na mucosa do intestino delgado e se transformado em gamontes de ambos os sexos, na lâmina própria. Após fecundação, a parede do oocisto se desenvolve em torno do zigoto e o oocisto esporulado é formado. A esporulação dos oocistos ocorre na lâmina própria, resultando em dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos. A parede do oocisto é fina e muitas vezes se rompe ao sair da lâmina, liberando esporocistos para o lúmen intestinal que são eliminados com as fezes. Devido à falta de sincronia da esporulação, oocistos esporulados e não esporulados podem ser encontrados simultaneamente. O período pré-patente para a maioria das

espécies de *Sarcocystis* é entre 7 e 14 dias, enquanto o período patente é de um mês ou mais (DUBEY et al., 2015a).

Aves se infectam pela ingestão de esporocistos em alimentos ou água contaminados com fezes de gambá. Elas também infectar através da ingestão de hospedeiros paratênicos, tais como moscas e baratas que transportam esporocistos dentro ou sobre os seus corpos (CLUBB et al., 1992). Os esporocistos ingeridos são rompidos e esporozoítos são liberados no intestino delgado das aves, onde eles migram para corrente sanguínea de modo a invadir diferentes tecidos. Esquizontes passam por duas gerações assexuadas no endotélio (Figura 3). A primeira fase de multiplicação ocorre em células endoteliais das arteríolas e a segunda, em células endoteliais dos capilares e vênulas na maioria dos órgãos do hospedeiro. Os pulmões são os principais órgãos afetados, mas alterações patológicas podem ser observadas também em fígado, em baço, nos rins, no intestinos e músculos esqueléticos e cardíaco (SMITH et al., 1987).

Figura 3. Ciclo biológico do *Sarcocystis falcatula*

Fonte: Adaptado de Dubey; Speer; Fayer (1989)

Sarcocistose aviária é uma doença hiperaguda, e muitos animais não mostram sinais clínicos antes da morte súbita. Outras aves podem demonstrar fraqueza, dispneia, anormalidades neurológicas, ou anorexia parcial ou total. Lesões macroscópicas podem incluir edema pulmonar, congestão e hemorragia, esplenomegalia e hepatomegalia (CLUBB et al., 1986; HILLYER et al., 1991; NEILL et al., 1989; PAGE et al., 1992). O número e distribuição de sarcocistos pode variar, o que é influenciado por fatores tais como o número de esporocistos ingerido, espécie do hospedeiro intermediário e/ou seu estado imunológico (DUBEY et al., 2015a). A maioria dos sarcocistos desenvolvem-se no músculo estriado esquelético, cardíaco, esôfago, língua e diafragma, no entanto, ocasionalmente podem ser encontrados no músculo liso de intestino, fibras de Purkinje do coração e no sistema nervoso central (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989).

No Brasil, as espécies *S. falcatula*, *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis speeri* e *Sarcocystis lindsayi* já foram descritas em esporocistos no gambá de orelha preta (*Didelphis aurita*), gambá de orelha branca (*Didelphis albiventris*) e gambá americano (*Didelphis marsupialis*) (DUBEY et al., 1999, 2000a, 2001a, 2001b; DUBEY; LINDSAY, 1999; DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001; STABENOW et al., 2012).

As primeiras descrições atribuídas a *S. falcatula* no país, foi um surto que ocasionou a morte de 38 aves psitacídeas, no Parque Natural das Aves Foz de Iguaçu, no Sul do Brasil (GODOY et al., 2009). A maior parte destas aves eram espécies do Velho Mundo, manifestando a forma pulmonar hiperaguda. Apesar de estar em contato com outras espécies de aves do Novo Mundo, estas últimas não apresentaram sintomatologia, só vindo a óbito cinco indivíduos. Acredita-se que espécies que sobrevivem à fase pulmonar da doença são aquelas que co-evoluíram com a presença de marsupiais no ambiente (MCCORMICK-RANTZE; LATIMER; WILSON, 2003).

Sarcocystis lindsayi é outra espécie de *Sarcocystis* próxima ao *S. falcatula* descrita em esporocistos de duas espécies de gambás sul-americanos (*D. albiventris* e *D. aurita*), no entanto, ainda não é conhecido o hospedeiro natural intermediário (DUBEY; LINDSAY; REZENDE, 2000; STABENOW et al., 2012).

Nos últimos 15 anos estudos moleculares vêm acompanhando a classificação de Sarcocistídeos em aves. A ultraestrutura da parede do cisto não é

suficiente para descrever uma nova espécie e responder à pergunta acerca da especificidade do hospedeiro. Por exemplo quando se investigou *S. calchasi* no pombo doméstico (*Columba livia f. domestica*) e *Sarcocystis columbae* no pombo da floresta (*Columba palumbus*), ambas espécies coincidiam morfológicamente no mesmo tipo de parede do cisto: Tipo 1, no entanto, estudos filogenéticos demonstraram que eram espécies diferentes (OLIAS et al., 2010a).

Na maioria das espécies de *Sarcocystis*, pelo menos um gene já foi sequenciado, o gene codificando a subunidade menor de DNA (18S rDNA) (DUBEY et al., 2015b). A sequência de esta região é altamente conservada permitindo facilmente aplicação de *primers* para organismos relacionados, porém há uma alta possibilidade de que espécies intimamente relacionadas, embora fenotipicamente distintas, possam diferir pouco ou nada neste locus. Exemplo disso, são as espécies *S. falcatula* e *S. neurona*, elas foram consideradas algum tempo como espécies sinónimas por apresentar mínimas diferenças neste locus (FENGER et al., 1995; DAME et al., 2006). O gene 18S rDNA não é suficientemente variável para permitir a diferenciação entre espécies de *Sarcocystis* que utilizam aves como hospedeiros intermediários (OLIAS et al., 2010b; PRAKAS et al., 2013), no entanto, novas descrições de espécies, sempre que possível, deveriam incluir esse gene para futuras comparações (DUBEY et al., 2015a).

O primeiro espaço transcrito interno (ITS1) é um fragmento adjacente a genes codificadores de DNA ribossômico 18S e 5.8S em eucariotos (Figura 4), frequentemente usado para diferenciação entre espécies com níveis taxonômicos próximos, como gênero e espécie (ÁLVAREZ; WENDEL, 2003; PRASAD et al., 2007). As vantagens da utilização deste marcador são a sua universalidade e sensibilidade do ensaio associado à sua detecção, pois ITS1 está presente em diversas cópias no genoma de qualquer eucarioto, sendo mais eficientemente detectados que outros loci nucleares, normalmente presentes em menor número de cópias (ÁLVAREZ; WENDEL, 2003). Uma desvantagem é que devido à alta variabilidade e grande número de *gaps* entre as sequências a comparar, o alinhamento das mesmas torna-se difícil (PRAKAS et al., 2013).

Figura 4. Loci codificador de DNA ribossômico em eucariotos

Fonte: Adaptado de Dyomin et al. (2017)

Legenda: SSU: Fragmento codificador da subunidade menor de RNA ribossômico, LSU: Fragmento codificador da subunidade maior de RNA ribossômico. ITS1 e ITS2: Primeiro e segundo espaçadores transcritos internos.

Um dos primeiros relatos de diferenciação molecular entre espécies de *Sarcocystis* muito próximas usando essa região foi realizado por Marsh et al. (1999). Estes autores detectaram diferenças de 12 nucleotídeos entre *S. neurona* e *S. falcatula*, além de observar uma população heterogênea entre isolados *S. falcatula* de diferentes regiões nos Estados Unidos.

Vários estudos de identificação e classificação de espécies de *Sarcocystis* em aves utilizando ITS1 vêm sendo relatados nos últimos anos na Europa (KUTKIENE et al., 2012; KUTKIENĖ et al., 2012; PRAKAS et al., 2013, 2014, 2018a; GJERDE, 2014; GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018).

Com este marcador, foi possível conhecer que algumas espécies de *Sarcocystis* não são tão estreitamente ligadas a um só hospedeiro, tendo a capacidade de infectar aves de diferentes espécies. Exemplo disso é a espécie *Sarcocystis wobeseri*, encontrada em gansos e patos, as duas espécies pertencentes à Ordem Anseriformes (KUTKIENE et al., 2010). Na análise de ITS1 de um cisto muscular em uma espécie de gaivota pertencente à Ordem Charadriiforme, foi possível verificar o mesmo parasito em Ordens diferentes de hospedeiros (PRAKAS et al., 2011a). Outro caso similar ocorre com *S. calchasi* confirmado em pombos domésticos, cacatuas e falcões europeus (OLIAS et al., 2010a, 2011, 2014).

Inferências filogenéticas para prever os possíveis hospedeiros definitivos quando este ainda não está elucidado ou explicar patogenicidade ao hospedeiro intermediário, também são realizados com esse marcador. Prakas et al.

(2014) descreveram *Sarcocystis lari* em músculo de gaivota (*Larus marinus*), análise filogenética com ITS1 permitiu localizar essa espécie próxima a *S. calchasi*, *Sarcocystis columbae* e *Sarcocystis turdusi* que tem como hospedeiros definitivos aves carnívoras da espécie *Accipiter*, portanto, o hospedeiro definitivo dessa nova espécie deveria ser uma ave carnívora. Anos mais tarde, essa suspeita foi confirmada comprovando esporocistos idênticos a *S. lari* no intestino da águia *Haliaeetus* (GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018).

Genes mitocondriais como citocromo c oxidase subunidade I (COX1) têm se mostrado importantes marcadores moleculares para diferenciação de espécies. COX1 foi usado com sucesso para discriminar espécies de *Sarcocystis* que usam ruminantes como hospedeiros intermediários (cervídeos, bovinos, ovinos) (GJERDE, 2013). No entanto, espécies de *Sarcocystis* que usam aves ou mamíferos carnívoros como hospedeiros intermediários, as diferenças são mínimas com este marcador, chegando apenas a 1%, sem permitir a diferenciação entre espécies (GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018).

Genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs) codificam proteínas imunodominantes associadas com estruturas na superfície do parasito, usadas amplamente para fins diagnósticos (HOANE et al., 2005; HOWE et al., 1998). Acredita-se que estas proteínas estejam envolvidas principalmente na adesão, transdução, invasão, transporte de material e resposta imune do hospedeiro (MINEO; KASPER, 1994; GRIMWOOD; SMITH, 1996; KIM; BOOTHROYD, 2005; SAEIJ; ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2008).

Em protozoários do filo Apicomplexa, sequências homólogas aos SAGs têm sido estudadas amplamente. Em *Toxoplasma gondii* 182 SRS (Sequências Relacionas à SAG) foram descritas até agora e, provavelmente, essa multiplicidade de antígenos corresponda com ampla gama de hospedeiros intermediários (LEKUTIS et al., 2001; JUNG; LEE; GRIGG, 2004; WASMUTH et al., 2012). Em contraste, um total de seis SnSAGs (Antígenos de Superfície de *Sarcocystis neurona*), com apenas alguns deles expressos nos diferentes estágios do parasito, foram descritos em *S. neurona* (HOWE et al., 2005; CROWDUS et al., 2008; WENDTE et al., 2010).

SAGs estão sendo utilizados para conhecer a diversidade de populações de *Sarcocystis* spp. no Brasil. Monteiro et al. (2013) e Valadas et al. (2016)

encontraram uma ampla multiplicidade genética em SAGs de *Sarcocystis* spp., caracterizados em esporocistos de gambás. Em conjunto entre os dois trabalhos, 10 variantes foram encontradas para SAG2, 15 para SAG3 e 11 para SAG4.

Resultados obtidos em 19 isolados a partir de periquitos (*Melopsittacus undulatus*) infectados com esporocistos, revelaram heterogeneidade na composição de SAGs em *S. falcatula*, 4 variantes para SAG2, 4 em SAG3 e 2 em SAG4 foram encontrados em dois estudos (GONDIM et al., 2017; CESAR et al., 2018).

Aves infectadas naturalmente com *S. falcatula* no Brasil, demonstraram variantes em SAGs já descritas em esporocistos. A confirmação molecular e por histopatologia de *S. falcatula* como agente etiológico da morte de uma espécie de Pelecaniformes no Brasil, maçarico-de-cabeça-pelada (*Phimosus infuscatus*), demonstrou uma combinação de alelos nos SAGs inédita (KONRADT et al., 2017; CESAR et al., 2018). Outro estudo, desta vez sem ocasionar lesões aparentes na espécie pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), constatou um arranjo diferente de SAGs (ACOSTA et al., 2018).

Pesquisas de caracterização molecular das espécies de *Sarcocystis* em aves silvestres vêm sendo relatadas com frequência nos últimos anos. O quadro 1 apresenta os principais marcadores utilizados em estudos em sua maioria europeios, como pode ser observado, são limitados os relatos nas Américas e estão focados em apenas uma espécie, *S. falcatula*.

Quadro 1. Estudos de caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em aves

Espécies	Hospedeiros intermediários (Ordem)	Dados moleculares	Distribuição	Referência
<i>S. albifrons</i>	Anseriformes	18S, 28S, ITS1	Lituânia	(KUTKIENE et al., 2012)
<i>S. anasi</i>	Anseriformes	18S, 28S, ITS1	Lituânia	(KUTKIENE et al., 2012)
<i>S. calchasi</i>	Columbiformes e Psittaciformes	18S, 28S, ITS1	Europa, EUA	OLIAS et al., 2010b, 2010a; RIMOLDI et al., 2013; HODO et al., 2016; PARMENTIER et al., 2019)
<i>S. chloropusae</i>	Gruiformes	18S, 28S, ITS1	Egito	(EL-MORSEY et al., 2015)
<i>S. columbae</i>	Columbiformes	18S, 28S, ITS1	Alemanha, Lituânia	(OLIAS et al., 2010b; PRAKAS et al., 2011b)
<i>S. cornixi</i>	Passeriformes	18S, 28S, ITS1	Lituânia	(KUTKIENĖ et al., 2009)
<i>S. corvusi</i>	Passeriformes	18S, 28S, ITS1	Lituânia	(PRAKAS et al., 2013)
<i>S. falcatula</i>	Passeriformes Psittaciformes Columbiformes Pelecaniformes Strigiformes Falconiformes Sphenisciformes	18S, 28S, ITS1, CYTB, ROPB,	Américas	MARSH et al., 1999; DAME et al., 2006; OLIAS et al., 2009; WÜNSCHMANN et al., 2009; WUNSCHMANN et al., 2010; TRUPKIEWICZ et al., 2016; KONRADT et al., 2017; ACOSTA et al., 2018; CESAR et al., 2018; GALLO et al., 2018)
<i>S. fulicae</i>	Gruiformes	18S, 28S, ITS1	Lituânia	(PRAKAS et al., 2018a)
<i>S. halioti</i>	Accipitriformes	18S, 28S, COX1, ITS1	Noruega, Lituânia	(GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018; PRAKAS et al., 2018b)
<i>S. lari</i>	Charadriiformes	18S, 28S, ITS1	Lituânia	(PRAKAS et al., 2014; GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018)
<i>S. lindsayi</i>	Psittaciformes	Experimentalmente ITS1	Brasil	(DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001)
<i>S. ramphastosi</i>	Piciforme	18S	África do Sul, Costa Rica	(DUBEY et al., 2008)
<i>S. rileyi</i>	Anseriformes	18S, 28S, ITS1, COX1	EUA, Lituânia, Noruega, outros	(DUBEY; ROSENTHAL; FELIX, 2010; GJERDE, 2014; PRAKAS et al., 2015)
<i>S. turdusi</i>	Passeriforme	18S, 28S, ITS1	Lituânia	(KUTKIENĖ et al., 2012; MAYR et al., 2016)
<i>S. wobeseri</i>	Anseriforme Charadriiformes	18S, 28S, ITS1	Lituânia	(KUTKIENE et al., 2010; PRAKAS et al., 2011a)

Fonte: Llano (2019)

Outros coccídios referidos em aves são as espécies *Atoxoplasma* e *Toxoplasma*. *Atoxoplasma* spp. são protozoários com um ciclo de vida monóxeno que inclui a invasão a células intestinais e ao sistema reticulo-endotelial. As infecções por *Atoxoplasma* têm sido reportadas em todo o mundo usualmente associadas a aves em cativeiro, porém não é tão frequente quanto coccidioses por *Isospora* spp. (GREINER, 2009). A lista de alguns Passeriformes onde foi confirmado o parasito inclui: canários (*Serinus canarius*), dom-fafe (*Pyrrhula pyrrhula*), estorninho-de-bali (*Leucopsar rothschildi*), pardais (*Passer domesticus*), pitanssilgos (*Spinus tristis*) e tangaras (*Tangara* spp) (BOX, 1981; PARTINGTON et al., 1989; MCNAMEE; PENNYCOTT; MCCONNELL, 1995; ADKESSON; ZDZIARSKI; LITTLE, 2005; CUSHING et al., 2011).

A taxonomia de *Atoxoplasma* tem sido amplamente discutida ao longo dos anos. Alguns autores consideram essa espécie sinônima com espécies de *Isospora* que realizam parte de seu ciclo em nível extraintestinal.

O gênero *Atoxoplasma* foi definido por Garnham (1950) como parasitos presentes em monócitos de aves, estritamente específicos para um hospedeiro e não patogênicos. O nome foi escolhido pela semelhança com as formas (taquizoítos) no fluido peritoneal em camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*. Segundo Greiner (2009), partes dessa descrição não estariam corretas, já que algumas espécies seriam patogênicas para seus hospedeiros e ainda não haveria certeza em relação à especificidade para o hospedeiro. Em 1959, Lainson, propôs o ácaro-vermelho (*Dermanyssus gallinae*) como vector de *Atoxoplasma* em pardais (*P. domesticus*) e afirmou que esse parasito era sinônimo de *Lankesterella* por ter o mesmo ciclo de vida. Em 1970, Box rejeitou essa teoria, descrevendo a transmissão oro-fecal, de uma espécie de *Isospora* com reprodução sexual em enterócitos e assexual em células fagocíticas mononucleares de canários (*S. canaria*), sem a presença de ácaros como vectores. Para Levine (1982) o gênero *Atoxoplasma* deve ser mantido, devendo ser atribuído a uma nova família Atoxoplasmatidae, contendo coccídios de ciclo homóxeno com desenvolvimento de merogônia em células sanguíneas e intestinais e gametogônia em enterócitos do mesmo hospedeiro. Além disso, adverte a necessidade de realizar análises coprológicas acompanhados de sanguíneos para confirmar os dois estágios do parasito: oocistos e merozoítos, respectivamente.

O nível de especificidade de hospedeiro ainda não é claro. Khan e Desser (1971), inocularam sangue com o parasito de uma espécie de pássaro (*Coccothraustes vespertinus*) a patos e a outras quatro espécies de Passeriformes. Todas as espécies de aves foram infectadas entre 8-14 dias p.i., exceto os patos. Box (1970), conseguiu infectar pardais (*P. domesticus*) com oocistos liberados pela mesma espécie, não entanto, tentativas usando esses oocistos para infectar outras aves como canários (*S. canaria*) não tiveram sucesso.

A via de transmissão é oro-fecal, que envolve a ingestão de oocistos esporulados por um hospedeiro aviário adequado, sendo um ciclo monóxeno. No intestino, esporozoítos são liberados invadindo enterócitos e células sanguíneas do sistema fagocítico mononuclear, onde ocorre a reprodução assexuada (merogônia). A partir da última merogônia são produzidos merozoítos que podem chegar via hematogena a fígado, baço, pulmão ou coração. A reprodução sexuada (gametogônia) ocorre em células epiteliais com formação de oocistos que são liberados no ambiente. Não é possível diferenciar morfológicamente oocistos de *Isospora* com *Atoxoplasma* (LEVINE, 1982; ADKESSON; ZDZIARSKI; LITTLE, 2005; GREINER, 2009).

Os sinais clínicos são inespecíficos e estão associados a anoréxia, perda de peso, diarreia, letargia e penas eriçadas (GREINER, 2009). O diagnóstico de Atoxoplasmose é apenas confirmado se há detecção de oocistos nas fezes e ao mesmo tempo, presença de merozoítos em células mononucleares no esfregaço sanguíneo. Isto poderia requerer uma amostragem diário de sangue e fezes pelo menos de 5 a 7 dias. Merozoítos podem ser mais facilmente detectados com métodos de hemoconcentração, retirando para examinar só a camada leucoplaquetária. Na necropsia, hepatomegalia, esplenomegalia e pequenos pontos finos na superfície desses órgãos ocasionalmente podem ser observados. É útil fazer *imprint* de baço e fígado para detectar merozoítos. A identificação de ultraestruturas pela MET e técnicas moleculares são ferramentas diagnósticas que vêm sendo aplicadas nos últimos anos (QUIROGA et al., 2000; ADKESSON; ZDZIARSKI; LITTLE, 2005).

O tratamento de aves infectadas é difícil e a infecção muitas vezes não é eliminada. Tetraciclina e sulfas podem reduzir a excreção de oocistos, mas não elimina a infecção nas vísceras e tecidos (FLAMMER; HURLBERT; WHITT, 1989).

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório que possui os felídeos como hospedeiros definitivos e humanos e animais endotérmicos, incluindo as aves, como hospedeiros intermediários (DUBEY, 2016). A via de transmissão é pela ingestão de alimento ou água contaminados com oocistos esporulados, consumo de tecidos infectados com cistos ou congenitamente (DUBEY, 2016). Uma numerosa lista de espécies de aves silvestres onde foi reportada infecção por *T. gondii* foi realizada por (DUBEY, 2002). A lista inclui aves pertencentes à Ordem: Anseriformes, Accipitriformes, Galliformes, Gruiformes, Charadriiformes, Columbiformes, Passeriformes, Pelecaniformes, Psittaciformes, Sphenisciformes e Strigiformes.

Estudos de infecção em aves por *T. gondii* podem ser úteis para avaliar contaminação ambiental com oocistos numa determinada região (GONDIM et al., 2010). Além disso, aves carnívoras podem indicar infecção na população de roedores e pequenos mamíferos que também são fonte de infecção para felídeos (DUBEY; FELIX; KWOK, 2010).

3. OBJETIVO

Detectar e identificar molecularmente coccídeos da família Sarcocystidae a partir de amostras de músculo peitoral de aves silvestres naturalmente infectadas.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Aves silvestres que vieram a óbito provenientes do Departamento de Parques e Áreas Verdes da Cidade de São Paulo, SP (DEPAVE-3 Fauna, Prefeitura Municipal de São Paulo, SP), foram necropsiados e fragmentos de tecido do músculo peitoral foram recolhidos, identificados e acondicionados em microtubos de 1,5 mL, a temperatura de -20°C, até o envio ao laboratório. Este procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/USP) sob o nº 9077070416.

4.2 Extração de DNA

Para extração do DNA, cada amostra de tecido muscular foi macerada em gral e pistilo e homogeneizada em tampão TE (Tris HCL 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) na proporção de 2 g de tecido para 8 ml de TE. Desta suspensão, 200 µL foram transferidos a um microtubo e centrifugado a 10000g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento resultante foi conservado a -20 °C.

O protocolo para extração do DNA foi realizado segundo as especificações do produto *DNeasy Blood & Tissue Kit*® (Qiagen, Hilden, Germany). A descrição do protocolo encontra-se a seguir:

Para a lise celular, ao microtubo com o sedimento foram adicionados 180 µL do buffer ATL e 20 µL de proteinase K, seguido por homogeneização e agitação vigorosa em vórtex, após foi incubado em banho seco a 56 °C *overnight*. Para purificação das amostras, adicionou-se 200 µL do buffer AL, agitou-se em vórtex e

seguidamente foi acrescentado 200 μ L de etanol 100% e novamente homogeneizando em vórtex. O material resultante foi transferido para uma coluna “mini spin” em um tubo coletor de 2 ml e centrifugado a 13000g por um minuto. Desprezou-se o tubo coletor, sendo adicionados 500 μ L do buffer AW1, homogeneizado em vórtex e centrifugado 13000g por minuto. O mesmo procedimento foi repetido, desta vez adicionando o buffer AW2 e centrifugando por três minutos. Por fim, adicionou-se 50 μ L do buffer AE, centrifugando 13000g por um minuto, e o material resultante foi armazenado no freezer a -20 °C até a sua utilização.

4.3 Amplificação de DNA

As amostras de DNA extraído foram amplificadas pela *nested*-PCR direcionada à sequência do primeiro espaço transcrito interno do DNA ribossômico (ITS1), para triagem das amostras. Estes primers permitem a detecção de uma ampla diversidade de organismos pertencentes a família Sarcocystidae, pois hibridizam em regiões conservadas dos genes codificadores de DNA ribossômico 18S e 5.8S. Resultados da eletroforese permitiram visualizar claramente três tipos de bandas com dimensões diferentes. Um primeiro grupo com bandas de aproximadamente 1000 pares de bases (pb) ou mais, o que é esperado para *S. falcatula* e *S. neurona*, um segundo grupo com bandas entre 500 e 1000 pb, esperado para outras espécies do gênero *Sarcocystis* e um terceiro com cerca de 500 pb, compatíveis com organismos da sub-família toxoplasmatinae.

As amostras do primeiro grupo foram identificadas também com *nested*-PCRs direcionadas a genes codificadores de SAG2, SAG3, SAG4. Estes marcadores foram empregados porque uma ampla diversidade em sequências codificadoras de antígenos de superfície (SAGs) foi verificada em estudos com *S. falcatula* no Brasil. Em cerca de 50 amostras de esporocistos de gambás (*Didelphis* spp.) da região Sul e Sudeste foram identificadas 10 variantes para SAG2, 15 para SAG3 e 11 para SAG4 (MONTEIRO et al., 2013; VALADAS et al., 2016). Essa abundância de alelos também foi detectada em isolados obtidos a partir da infecção em periquitos (*M. undulatus*) com esporocistos, 19 amostras revelaram 4 variantes para SAG2, 4 para SAG3 e 3 para SAG4 (GONDIM et al., 2017; CESAR et al., 2018).

Para o segundo grupo, genes mais conservados como citocromo c oxidase subunidade I (COX1) e a fração do gene do DNA ribossômico (18S rDNA) foram amplificados. Esses alvos são amplamente usados para estudos filogenéticos de espécies de sarcocistídeos em aves (PRAKAS et al., 2013, 2018b; GJERDE, 2014; GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018). As amplificações em *nested-PCR* para os alvos ITS1, SAG2, SAG3, SAG4, COX1 e 18S foram denominadas nPCR-ITS1, nPCR-SAG2, nPCR-SAG3, nPCR-SAG4, nPCR-COX1 e nPCR-18S, respectivamente.

Para o terceiro grupo uma amostra apenas foi submetida amplificação de 18S. A figura 5 resume a metodologia em um fluxograma. A sequência dos primers utilizados nas reações estão descritos no quadro 2.

Figura 5. Fluxograma da metodologia empregada para identificação molecular de Sarcocistídeos em tecido muscular de aves.

Fonte: Llano (2019)

4.3.1 Nested-PCR

O primeiro ciclo de amplificação com os primers externos para todas as reações na PCR foram obtidas adicionando 4 µL de DNA extraído da amostra alvo,

2,5 µL de 10x PCR Buffer (KCL 50mM; Tris HCl 10mM; pH 9,0), 1 µL de MgCL₂ (50mM), 0,5 µL da mistura de dNTPs (10mM), 0,35 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase Platinum-Invitrogen (5 U/ul) e 16,1 µL de água ultrapura autoclavada totalizando um volume de 25 µL de Mix por microtubo. DNA de *T. gondii* foi utilizado como controle positivo nas reações direcionadas a ITS1, 18S, COX1 e DNA de *S. neurona* como controle positivo para SAGs. Como controle negativo foi utilizada água ultrapura autoclavada.

As condições dos ciclos da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidas de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C para hibridização dos primers, extensão inicial a 72°C por 50 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para o segundo ciclo de amplificação com os primers internos, a mistura de reação para a *nested*-PCR foi obtida adicionando 2 µL da amostra amplificada no primeiro PCR, 2,5 µL de 10x PCR Buffer (KCL 50mM; Tris HCl 10mM; pH 9,0), 1 µL de MgCL₂ (50mM), 0,5 µL da mistura de dNTPs (10mM), 1 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase Platinum-Invitrogen (5 U/ul) e 16,8 µL de água ultrapura autoclavada totalizando um volume de 25 µL de Mix por microtubo. Os controles e o ciclo do *nested*-PCR foram os mesmos utilizados no PCR convencional.

4.4 Detecção do produto amplificado

Os fragmentos amplificados pela *nested*-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra previamente misturada com 5 µL de corante (30% de glicerol; 0,25% de azul de bromofenol), mais o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (GeneRuler™ 100pb DNA Ladder) foram depositados em cada orifício do gel e imersos em tampão de TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 1mM). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 60 minutos e a visualização das bandas foi realizada através de transiluminação com luz ultravioleta.

4.5 Purificação do produto amplificado

Após a separação dos produtos amplificados pela eletroforese, as bandas de interesse foram recortadas e purificadas com *Kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Sequenciamento automático

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *Kit ABI PRISM™ Big Dye Terminator™* (Applied Biosystem). Foram misturados 13,5 µL de DNA purificado, 3 µL de Premix Ready Reaction (Big Dye™), 2,5 µL de tampão de sequenciamento (5X conc.) e 1 µL de cada um dos *primers* internos utilizados na reação do *nested* PCR (JS4b eCT2b) para um volume total de 20 µL. O ciclo de sequenciamento foi efetuado no termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems (ABI) com desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, desnaturação a 96°C por 10 segundos, seguida de 25 ciclos de hibridização dos primers a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. O ciclo se repete por mais 39 vezes a partir da desnaturação.

4.7 Precipitação de DNA

Após do ciclo de sequenciamento, foram adicionados 60 µL de etanol a 100% e 5 µL de EDTA pH 8,0 (125mM) nas amostras. Após da homogeneização, as amostras foram incubadas por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente e local escuro. Posteriormente, foram centrifugadas a 10.000g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 70 µL de etanol a 70% (v/v em água). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000g por 30 minutos. O etanol foi removido com a pipeta e as amostras foram colocadas em banho seco a 90°C por 2 minutos até secagem completa dos microtubos. As amostras foram mantidas em local escuro a -20°C até o sequenciamento.

4.8 Sequenciamento

A eletroforese capilar de sequenciamento dos produtos de PCR, foi realizada com o sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®), seguindo o protocolo do manual técnico do equipamento.

Quadro 2. Sequências dos primers utilizados nas reações de *nested*-PCR e seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados

Lócus	Primer	Sequência	Round*	Tamanho**	Referência
ITS-I	JS4	CGAAATGGGAAGTTTGAAC	1	~1100	(ŠLAPETA et al., 2002)
	CT2c	CTGCAATTCACATTCGC	1		(SOARES et al., 2011a)
	JS4b	AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	2		
	CT2b	TTGCGCGAGCCAAGACATC	2		
COX1	COX1-227F25	GTTTTGGTAACTACTTTGTACCGAT	1	590	Neste estudo
	COX1-885R25	GAAATATGCACGAGTATCTACCTCT	1		
	COX1-275F22	TGTACCCACGAATTAATGCAGT	2		
	COX1-844R21	GTGTGCCCATACTAGAGAACC	2		
SAG2	SAG2-F1	CAACAATTGCGTGACACAA	1	338	(VALADAS et al., 2016)
	SAG2-R1	ACAACACTGTGAGAGATGCGA	1		(MONTEIRO et al., 2013)
	SAG2-F2	GGTCAGAGCTTTGTGCTGAA	2		
	SAG2-459R21	CACATTGCAAGCASGACACCA	2		Neste estudo
SAG3	SAG3-F1	CTCGCAGTTGCCTGCCTTG	1+2	511	(MONTEIRO et al., 2013)
	SAG3-589R21	TGGTCCTGTAGCAGTAACACA	1+2		(VALADAS et al., 2016)
SAG4	SAG4-F2	CCGAGGTACAGTTCAAGGCG	1	282	(MONTEIRO et al., 2013)
	SAG4-R1	CGACGACGATACCCAATGCC	1		
	SAG4-541F21	GGCAACGCCGCAGCMCTGCAA	2		(VALADAS et al., 2016)
	SAG4-803R20	CAATGCCGAMGCGGTACGAG	2		Neste estudo
18S	18S9L	GGATAACCTGGTAATTCTATG	1+2	824	(LI et al., 2002)
	18S1H	GGCAAATGCTTTCGCAGTAG	1+2		

Fonte: Llano (2019)

Legenda: *Rodada de amplificação em que os primers foram usados. (1): Primers utilizados apenas na primeira rodada de amplificação. (2): Primers utilizados apenas na segunda rodada de amplificação. (1+2): Primers utilizados na primeira e segunda rodada de amplificação. **Dimensões são estimadas com base em amostras de *S. falcatula*, podendo haver pequenas diferenças para outras espécies.

4.9 Edição das sequências e análise molecular

A qualidade dos produtos sequenciados foi analisada pelo programa Phred-Phrad, contido no software *Codon Code Aligner* v. 4.2.1. As sequências de nucleotídeos foram alinhadas com auxílio do programa *Clustal W*, contido no software *BioEdit Sequence Alignment Editor*, tornando-se como base as sequências homólogas disponíveis no *GenBank*.

As sequências produzidas foram comparadas com homologas disponíveis no Genbank por meio de busca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). O grau de diversidade nucleotídica entre as sequências e árvores filogenéticas foi avaliado com auxílio do programa MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (KUMAR et al., 2018). Árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Máxima Verossimilhança. Os modelos evolutivos foram calculados para cada filogenia, variando de acordo com o caso. A porcentagem de réplicas nas quais os táxons foram agrupados em cada *cluster* foi calculado usando o teste de *bootstrap* (um total de 1000 réplicas). Filogenias de alelos SAG foram estimadas também por meio de redes baseadas em modelo evolutivo *median-joining* (Röhl et al., 1999), implementado no programa PopART (LEIGH; BRYANT, 2015).

O grau de diversidade entre genótipos SAGs caracterizados em *S. falcatula* foi calculado usando índice de Simpson (*D*) (SIMPSON, 1949), segundo a fórmula:

$$D = 1 - \left(\frac{1}{N(N-1)} \right) \sum_{n=1}^s nj(nj-1)$$

sendo *N* o número de amostras caracterizadas, *s* o número de genótipos e *nj* o número de amostras pertencentes ao genótipo *j*.

4.10 Microscopia

Em cooperação com Universidade Federal da Bahia (UFBA), foi possível realizar as técnicas de histopatologia e microscopia eletrônica em duas amostras confirmadas molecularmente como *S. falcatula*.

Para microscopia óptica foram seccionados amostras de tecido em fragmentos aproximadamente de 1cm³. O processamento laboratorial de desidratação, diafanização, impregnação pela parafina, inclusão de fragmentos, obtenção dos cortes histológicos, estendimento, colagem e por fim, coloração com hematoxilina e eosina (HE) foi realizado no laboratório de histopatologia-Histocito em Salvador-BA. As lâminas foram examinadas ao microscópio de luz em diversas objetivas.

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), o material foi retirado dos blocos de parafina, com auxílio de cortes a mão livre usando um micrótomo, após constatação e marcação ao microscópio óptico. O procedimento de desparafinação, fixação em glutaraldeído e preparação para MET, foi realizado no Instituto Gonçalo Moniz-Fiocruz Bahia. O material assim preparado foi examinado e microfotografado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem das amostras com nPCR-ITS1

Quatrocentas aves de 104 espécies foram submetidas à extração de DNA nuclear de amostras de tecido muscular peitoral. A lista de Ordens de aves avaliadas inclui: Accipitriformes, Anseriformes, Apodiformes, Caprimulgiformes, Cathartiformes, Charadriiformes, Columbiformes, Coraciformes, Cuculiformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Passeriformes, Pelecaniformes, Piciformes, Psittaciformes, Suliformes, Strigiformes e Tinamiformes (Apêndice).

Deste total, 45 amostras foram positivas para nPCR-ITS1. Fragmentos com 1000 pb ou mais foram detectados em 36 amostras (9%), duas amostras com fragmentos entre 500 e 1000 pb (0,5%) e sete amostras com fragmentos de aproximadamente 500 pb ou inferior (1,7%). Exemplos de produtos de nPCR-ITS1 são encontrados na figura 6. Na tabela 1, consta a lista das espécies positivas pela nPCR-ITS1 assim como informações referentes ao sexo, proporção de animais positivos em relação a indivíduos da mesma espécie, procedência, ano de colheita, dimensão do produto sequenciado e porcentagem de similaridade com sequências depositadas no Genbank após busca BLAST.

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de nPCR-ITS1

Fonte: Llano (2019)

Legenda: A primeira coluna representa padrão de peso molecular com múltiplos de 100 pares de bases. As colunas 2-4 e 6-8 correspondem a amostras positivas com fragmento de aproximadamente 1000 pb ou mais. As colunas 5 e 9 correspondem às amostras positivas com fragmento entre 500 e 1000 pb. Coluna 11 corresponde a amostra positiva com fragmento de cerca de 500 pb. Coluna 10 controle negativo.

Tabela 1. Relação de aves positivas para Sarcocistídeos pela *n*PCR-ITS1 e suas respectivas identificações moleculares

Nome comum Nome inglês (<i>Nome científico</i>)	Sexo*	Positivos/ Total (%)	Procedência	Ano da colheita	N° pb sequenciadas	% Identidade BLAST (N° acesso)
Tamanho produto aprox. 1000 pb (n=36)						
Psittaciformes: Psittacidae						
238 -Periquito-verde Plain Parakeet (<i>Brotogeris tirica</i>)	M	4/14 (20,5)	Butantã/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
189 -Periquito-verde Plain Parakeet (<i>Brotogeris tirica</i>)	M		Aclimação/SP	2016	651	99,7% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
210 -Periquito-verde Plain Parakeet (<i>Brotogeris tirica</i>)	F		Jardim Marajoara/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
231 -Periquito verde Plain Parakeet (<i>Brotogeris tirica</i>)	F		Vi. Mariana/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
206 -Maritaca-verde Scaly-headed Parrot (<i>Pionus maximiliani</i>)	M	1/2 (50)	Perus-São Paulo/SP	2016	1012	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
504 -Papagaio-verdadeiro Turquoise-fronted Amazon (<i>Amazona aestiva</i>)	M	3/9 (33,3)	Vi. Mariana/SP	2018	1013	99,9% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
519 -Papagaio-verdadeiro Turquoise-fronted Amazon (<i>Amazona aestiva</i>)	F		Nova Paulisata/SP	2018	1013	99,9% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
349 -Papagaio-verdadeiro Turquoise-fronted Amazon (<i>Amazona aestiva</i>)	M		Leme/SP	2017	652	99,7% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
Piciformes: Picidae						
227 -Pica-pau-de-cabeça-amarela Blond-crested Woodpecker (<i>Celeus flavescens</i>)	F	3/9 (33,3)	Morumbi/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
387 -Pica-pau-de-cabeça-amarela Blond-crested Woodpecker (<i>Celeus flavescens</i>)	F		Vila Represa/SP	2017	419	99,5% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)

103 -Pica-pau-de-cabeça-amarela Blond-crested Woodpecker (<i>Celeus flavescens</i>)	M		Pinheiro/SP	2016	1013	99,9% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
208 -Pica-pau-de-banda-branca Lineated Woodpecker (<i>Dryocopus lineatus</i>)	F	1/6 (16,6)	Nossa Sra. Carmo/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
Piciformes: Ramphastidae						
197 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	M	6/8 (75)	Interlagos/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
222 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	F		Parque do Carmo/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
230 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	F		Parelheiros/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
233 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	M		Santana/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
244 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	M		Cotia/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
258 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	F		Jd. Colonial Geomini, Z. Oeste/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
138 - Araçari-banana Saffron Toucanet (<i>Pteroglossus bailloni</i>)	M	1/2 (50)	Pq. Est Caverna do diabo/SP	2016	1021	93,4% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
Columbiformes: Columbidae						
181 -Asa-branca Picazuro Pigeon (<i>Patagioenas picazuro</i>)	M	2/13 (15,3)	Campo Belo /SP	2016	1012	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
262 -Asa-branca Picazuro Pigeon (<i>Patagioenas picazuro</i>)	M		Parque Anhanguera/SP	2016	1013	99,9% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
264 -Juriti-gemedeira Grey-fronted Dove (<i>Leptotila rufaxilla</i>)	M	1/2 (50)	Parque Anhanguera/SP	2016	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)

326- Avoante Eared Dove (<i>Zenaida auriculata</i>)	F	2/6 (33,3)	Parque Ibirapuera/SP	2017	654	99,5% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
330- Avoante Eared Dove (<i>Zenaida auriculata</i>)	F		Parque Ibirapuera/SP	2017	419	99,8% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
Passeriformes: Vireonidae 283- Pitiguari Rufous-browed Peppershrike (<i>Cyclarhis gujanensis</i>)	F	1/1 (100)	Jardim Taquaral/SP	2017	1013	99,9% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
Passeriformes: Thraupidae 137- Tiê-preto Ruby-crowned Tanager (<i>Tachyphonus coronatus</i>)	M	1/1 (100)	Pq. Est Caverna do diabo/SP	2016	1021	93,2% <i>S. falcatula</i> is. Cornell 1 AF098242
452- Tiê-sangue Brazilian Tanager (<i>Ramphocelus bresilius</i>)	F	1/1 (100)	Apreensão El dorado/SP	2017	1021	93,4% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
Passeriformes: Icteridae 431- Guaxe Red-rumped Cacique (<i>Cacicus haemorrhous</i>)	M	4/6 (66,6)	Apreensão El dorado/SP	2017	1021	93,2% <i>S. falcatula</i> is. Cornell 1 AF098242
282- Guaxe Red-rumped Cacique (<i>Cacicus haemorrhous</i>)	M		Apreensão El dorado/SP	2017	1021	93,0% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
444- Guaxe Red-rumped Cacique (<i>Cacicus haemorrhous</i>)	M		Apreensão El dorado/SP	2017	1021	93,0% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
453- Guaxe Red-rumped Cacique (<i>Cacicus haemorrhous</i>)	F		Apreensão El dorado/SP	2017	1021	93,0% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
Accipitriformes: Accipitridae 174- Gavião-asa-de-telha Harris's Hawk (<i>Parabuteo unicinctus</i>)	F	1/4 (25)	Vila Sônia/SP	2016	651	99,7% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
149- Gavião-carijó Roadside Hawk (<i>Rupornis magnirostris</i>)	F	1/5 (20)	Interlagos/SP	2016	1013	99,9% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
Strigiformes: Strigidae	M	1/9	Jd. São Luis/SP	2017	1013	99,9% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet

407 -Corujinha-de-mato Tropical Screech-owl (<i>Megascops choliba</i>)		(11,1)				(MH626538)
Anseriformes: Anatidae						
425 - Ganso Gander (<i>Anas sp.</i>)	M	1/2 (50)	Parque Ibirapuera/SP	2017	1013	99,9% <i>S. falcatula</i> is. Lorikeet (MH626538)
Cuculiformes: Cuculidae						
163 -Anu-branco Guira Cuckoo (<i>Guira guira</i>)	M	1/2 (50)	Barra Funda/SP	2016	1008	93.5% <i>S. lindsayi</i> (AF387164)
Tamanho produto aprox. 900 pb (n=2)						
Accipitriformes: Accipitridae						
213 -Gavião-miúdo Sharp-shinned Hawk (<i>Accipiter striatus</i>)	F	1/5 (20)	Itaquera/SP	2016	842	99,2% <i>Sarcocystis halioti</i> is. Ha 1.6 (MF946589)
Cathartiformes: Cathartidae						
471 -Urubu-de-cabeça-preta American-Black Vulture (<i>Coragyps atratus</i>)	M	1/11 (9,1)	Vi. Oratório/SP	2016	800	90,0% <i>Sarcocystis lari</i> is. Ha. 1.8 (MF946599)
Tamanho produto aprox. 500 pb (n=7)						
Columbiformes: Columbidae						
260 -Asa-branca Picauro Pigeon (<i>Patagioenas picazuro</i>)	M	1/13 (7,7)	Parque Anhanguera/SP	2016	411	100% <i>Toxoplasma gondii</i> (MH793505)
Falconiformes: Falconidae						
187 -Quiriquiri American Kestrel (<i>Falco sparverius</i>)	M	2/6 (33,3)	Jardim Sapopemba/SP	2016	411	100% <i>Toxoplasma gondii</i> (MH793505)
493 -Quiriquiri American Kestrel (<i>Falco sparverius</i>)	F		Vi. Curuçã/SP	2017	411	100% <i>Toxoplasma gondii</i> (MH793505)
Pelecaniformes: Ardeidae						
426 -Garça-branca Snowy Egret (<i>Egretta thula</i>)	F	2/2 (100)	Mandaqui/SP	2017	411	100% <i>Toxoplasma gondii</i> (MH793505)
293 -Garça-branca Snowy Egret	M		Marsilac/SP	2017	411	100% <i>Toxoplasma gondii</i> (MH793505)

(<i>Egretta thula</i>)						
433-Savacu Turquoise-fronted Amazon (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	M	1/2 (50)	Pirituba/SP	2017	411	100% <i>Toxoplasma gondii</i> (MH793505)
Passeriformes: Thraupidae 498-Corruptão Campo Troupial (<i>Icterus jamacaii</i>)	M	1/15 (6,6)	sd	2018	317	78,6% <i>Atoxoplasma</i> spp. (AY331573)

Fonte: Llano (2019)

Legenda: *Não houve diferença estatística entre machos e fêmeas ($p=0,873$ teste Fischer's). A porcentagem de positivos entre o total está relacionada ao número de aves da mesma espécie. sd: sem dados

5.2. Caracterização molecular das amostras positivas para fragmentos de nPCR-ITS1 de 1000bp

A análise filogenética dos produtos de nPCR-ITS1 das 36 amostras deste grupo gerou uma árvore com três clados bem diferenciados (Figura 7). Todas os produtos de ITS1 foram submetidos a busca BLAST e o resultado de maior identidade para cada sequência é apresentado na tabela 3.

Figura 7. Análise filogenética de *Sarcocystis* spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (ITS1)

Fonte: Llano (2019)

Legenda: A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeo de Kimura de 2 parâmetros. (●): Sequências obtidas neste estudo. Esta análise envolveu 24 sequências nucleotídicas. Houve um total de 389 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X.

Um dos clados, o clado I, contempla 28 amostras provenientes de diversos hospedeiros e detectadas neste inquérito, *S. falcatula* is. Lorikeet, uma amostra de *S. falcatula* detectada no Brasil e outras amostras originárias dos

Estados Unidos anotadas como *Sarcocystis* sp ou *S. falcatula*. Um segundo clado contempla exclusivamente as amostras # (137, 138, 282, 431, 444, 452, 453) e um terceiro clado, a amostra #163 e *Sarcocystis lindsayi*.

No clado I, percebe-se que as vinte e oito amostras de aves silvestres deste inquérito foram estreitamente relacionadas a Sarcocistídeo anotado como *S. falcatula* is Lorikeet que ocasionou a morte de psitacídeos (*Trichoglossus moluccanus*) em um zoológico dos Estados Unidos (VERMA et al., 2018) e também com a amostra de *Sarcocystis* sp detectada no Espírito Santo, Brasil em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) (ACOSTA et al., 2018). As amostras do clado I divergem de outras amostras de *S. falcatula* obtidas do Genbank e que estão posicionadas nos ramos coloridos em verde, na figura 5. Os isolados *S. falcatula* is. Cornell 1 (AF098242) e *S. falcatula* is. Florida 1 (AF098244), descritos na América do Norte a partir de infecção no gambá (*D. virginianus*) com tecido de pássaro infectado (*Quiscalus quisqualis*), têm apenas 96,6 e 96,8% de identidade com amostras de aves silvestres deste estudo (#103, 149, 262, 283, 407, 425, 504, 519).

Alguns autores, baseados em evidências moleculares, sugerem que a espécie *S. falcatula* consiste de uma população heterogênea de várias subespécies ou possivelmente até uma espécie diferente de *Sarcocystis* (MARSH et al., 1999; DUBEY et al., 2000b, 2001c; DUBEY; LINDSAY; REZENDE, 2000; DUBEY; ROSENTHAL; SPEER, 2001; FERROGLIO; TRISCIUOGLIO, 2004). De fato, filogenias com ITS1 revelam a possível existência de ao menos duas linhagens moleculares de *S. falcatula* e as amostras brasileiras relacionadas a *S. falcatula* detectadas até o momento parecem pertencer a uma destas linhagens, enquanto outras linhagens contemplam isolados até então identificados apenas na América do Norte (ACOSTA et al., 2018; CESAR et al., 2018). Por esta razão, neste trabalho a filogenia baseada em ITS1 com as amostras cujos produtos amplificados foram de cerca de 1000 bp inclui amostras representantes de diferentes linhagens de *S. falcatula* disponíveis no Genbank.

Então, pelas informações obtidas com a análise de ITS1, as amostras de *Sarcocystis* de aves silvestres identificadas no clado I devem corresponder à mesma espécie descrita em pinguim-de-magalhães (*S.*

magellanicus) no Brasil (ACOSTA et al., 2018), que por sua vez também foi revelado idêntica, para este locus, a isolado de Sarcocystídeo diagnosticado como agente causal de meningoencefalite em maçarico-de-cabeça-pelada (*P. infuscatus*) (KONRADT et al., 2017) e a Sarcocystídeos patogênicos para periquitos australianos (*M. undulatus*) experimentalmente infectados com esporocistos procedentes de didelfídeos (GONDIM et al., 2017; CESAR et al., 2018).

No clado II, sete sequências obtidas com nPCR-ITS1 evidenciaram relação filogenética com *S. falcatula*, porém pela distância evolutiva revelada pela filogenia molecular de ITS1, estas amostras parecem tratar-se de uma espécie diferente. Pela análise deste locus, as amostras detectadas nas espécies guaxe, tiê-preto, tiê-sangue e tucano-araçari-banana foram relacionadas às espécies *S. falcatula* is. Lorikeet (MH626538) com 93,4% de identidade e com *S. falcatula* is. Cornell 1 (AF098242) isolado obtido a partir da infecção de gambá (*D. virginianus*) com tecido da ave (*Q. quisqualis*) naturalmente infectada (MARSH et al., 1999), com identidade de 93,2%. Por conseguinte, foi realizada caracterização com marcadores genéticos mais conservados 18S e COX1 para que fosse possível inferir seu posicionamento filogenético frente a outras espécies do gênero *Sarcocystis*.

Baseado em locus 18S, as sequências das amostras # (137, 138, 282, 431, 444, 452, 453) foram 100% idênticas entre si e com *Sarcocystis* sp. Is. 5 (KX470746) e *S. speeri* (KT207459), isolados obtidos a partir de infecção em periquitos com esporocistos de gambás sul-americanos. As sequências do gene COX1 destas amostras foram totalmente idênticas entre si e entre *S. falcatula* is. Lorikeet (MH665257) e *S. speeri* (KT207461). Das amostras # (137, 138, 282, 431, 444, 452, 453), foram sequenciados 547 bp de COX1 e 824bp de 18S.

No clado III, a amostra # 163 teve, na região ITS1, a maior identidade com *S. lindsayi* (AF387164), com valor de 93,5%. Para conhecer sua relação com outras espécies de *Sarcocystis* foi realizada caracterização com marcador COX1. Baseado neste locus, as 547 pb efetivamente sequenciadas desta amostra foram idênticas a *S. falcatula* is. Lorikeet (MH665257) e *S. speeri* (KT207461), isolados a partir do papagaio-arco-íris (*T.*

moluccanus) na América do norte e de gambá (*D. albiventris*) na América do Sul, respectivamente.

Pelo conjunto das informações de 18S, COX1 e ITS1, infere-se a existência de três espécies de *Sarcocystis* entre as 36 amostras de aves silvestres tratadas nesta seção. As 28 sequências ITS1 do clado I revelaram similaridade entre 99,5-99,9% com *S. falcatula* is. Lorikeet, podendo ser classificadas como *S. falcatula*. Para as amostras do segundo e terceiro clados, a similaridade máxima com sequências disponíveis no Genbank foi de apenas 92,6 - 93,4%. Embora todas as amostras de aves tenham sido idênticas em 18S e COX1, é possível considerar que as amostras do segundo e terceiro clados correspondam a espécies inéditas de *Sarcocystis* relacionadas com *S. falcatula* que foram nomeadas neste estudo como *Sarcocystis* sp. ex *Cacicus haemorrhous* e *Sarcocystis* sp. ex *Guira guira*, respectivamente.

5.2.1 Análise de SAGs

Os fragmentos génicos de cada marcador (SAG2, SAG3, SAG4) foram comparados com informação disponível no BLAST de sequências homólogas descritas para *Sarcocystis* spp. obtidos de esporocistos (MONTEIRO et al., 2013; VALADAS et al., 2016), de isolados em bioensaios com periquitos (GONDIM et al., 2017; CESAR et al., 2018) e de infecções naturais KONRADT et al., 2017; ACOSTA et al., 2018) (Tabela 2). As reconstruções filogenéticas com cada um dos marcadores SAG das aves estudadas são apresentadas nas figuras 8, 9 e 10.

Não foi possível determinar os genótipos SAGs para todas as 36 amostras deste grupo por uma das seguintes razões: presença de mistura de sequências (mais de um genótipo em uma mesma amostra), amplificação malsucedida.

Os genes SAGs apresentaram níveis variáveis de polimorfismo. Para SAG2 foram identificados sete alelos em 31 amostras, para SAG3, onze alelos em 34 amostras e para SAG4 seis alelos em 31 amostras. A análise em detalhe das sequências gênicas para cada locus é apresentada na tabela 2.

Tabela 2. Identidade de genes codificadores de antígenos de superfície (SAGs) em aves positivas para *Sarcocystis* spp. com sequências homólogas de *Sarcocystis* spp. detectados em outros inqueritos no Brasil.

Nome comum Nome inglês (Nome científico)	SAG2	SAG3	SAG4	Genótipo (G)
	Nº pb sequenciadas % Similaridade BLAST (Nº acesso)	Nº pb sequenciadas % Similaridade BLAST (Nº acesso)	Nº pb sequenciadas % Similaridade BLAST (Nº acesso)	
222 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	338 100% Infecção natural e experimental, esporocistos (MG493467, KY445390, JN185358)	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	1
230 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	338 100% Infecção natural e experimental, esporocistos (MG493467, KY445390, JN185358)	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	
233 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	338 100% Infecção natural e experimental, esporocistos (MG493467, KY445390, JN185358)	498 Inédita	282 100% Infecção natural e esporocistos (KX265019, JN185394)	2
262 -Asa-branca Picauro Pigeon (<i>Patagioenas picazuro</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445400, JN185368)	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 100% Infecção natural e esporocistos (KX265019, JN185394)	3
349 -Papagaio-verdadeiro Turquoise-fronted Amazon (<i>Amazona aestiva</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445400, JN185368)	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	4
326 - Avoante Eared Dove (<i>Zenaida auriculata</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445400, JN185368)	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	
330 - Avoante Eared Dove (<i>Zenaida auriculata</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445400, JN185368)	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	

189 -Periquito-verde Plain Parakeet (<i>Brotogeris tirica</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445400, JN185368)	412 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445420, KR107220)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	5
206 -Maritaca-verde Scaly-headed Parrot (<i>Pionus maximiliani</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445400, JN185368)	382 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445420, KR107220)	282 (Inédita)	6
407 -Corujinha-de-mato Tropical Screech-owl (<i>Megascops choliba</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445400, JN185368)	412 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445403, KR107221)	282 100% Infecção natural e esporocistos (KX265019, JN185394)	7
210 -Periquito-verde Plain Parakeet (<i>Brotogeris tirica</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (JN185364, KR107212)	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	8
387 -Pica-pau-de-cabeça- amarela Blond-crested Woodpecker (<i>Celeus flavescens</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (JN185364, KR107212)	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	
238 -Periquito-verde Plain Parakeet (<i>Brotogeris tirica</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (JN185364, KR107212)	412 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445420, KR107220)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	9
208 -Pica-pau-de-banda-branca Lineated Woodpecker (<i>Dryocopus lineatus</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (JN185364, KR107212)	412 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445420, KR107220)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	
283 -Pitiguari Rufous-browed Peppershrike (<i>Cyclarhis gujanensis</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (JN185364, KR107212)	410 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445420, KR107220)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	
174 -Gavião-asa-de-telha Harris's Hawk (<i>Parabuteo unicinctus</i>)	261 77% Infecção experimental e esporocistos (JN185364, KR107212)	412 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445420, KR107220)	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	
258 -Tucano-de-bico-verde	338	410	282	10

Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	100% Infecção experimental e esporocistos (JN185364, KR107212)	100% Infecção experimental e esporocistos (KY445420, KR107220)	Inédita	
181 -Asa-branca Picazuro Pigeon (<i>Patagioenas picazuro</i>)	338 100% Infecção experimental e esporocistos (JN185364, KR107212)	424 Inédita	282 Inédita	11
103 -Pica-pau-de-cabeça- amarela Blond-crested Woodpecker (<i>Celeus flavescens</i>)	338 Inédita	410 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445410, KR107219)	281 100% Infecção natural e esporocistos (KX265019, JN185394)	12
231 -Periquito verde Plain Parakeet (<i>Brotogeris tirica</i>)	388 Inédita	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 Mista	
504 -Papagaio-verdadeiro Turquoise-fronted Amazon (<i>Amazona aestiva</i>)	338 Mista	469 100% Infecção experimental e esporocistos (JN185390)	281 100% Infecção natural e esporocistos (KX265019, JN185394)	
519 -Papagaio-verdadeiro Turquoise-fronted Amazon (<i>Amazona aestiva</i>)	338 Mista	412 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445403, KR107221)	281 100% Infecção natural e esporocistos (KX265019, JN185394)	
227 -Pica-pau-de-cabeça- amarela Blond-crested Woodpecker (<i>Celeus flavescens</i>)	338 Mista	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	282 Inédita	
197 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	338 Mista	410 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445410, KR107219)	282 Inédita	
244 -Tucano-de-bico-verde Red-breasted Toucan (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	338 Mista	469 Inédita	282 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445429, JN185399)	
264 -Juriti-gemedeira Grey-fronted Dove	338 100% Infecção experimental e	354 Mista	282 100% Infecção natural e	

<i>(Leptotila rufaxilla)</i>	esporocistos (JN185364, KR107212)		esporocistos (KX265019, JN185394)	
149- Gavião-carijó Roadside Hawk <i>(Rupornis magnirostris)</i>	338 Inédita	NA	282 Inédita	
425- Ganso Gander (<i>Anas</i> sp.)	388 Inédita	469 100% Infecção experimental e esporocistos (KY445413, JN185390)	NA	
282- Guaxe Red-rumped Cacique (<i>Cacicus haemorrhous</i>)	335 100% esporocistos (JN185349)	464 100% esporocistos (JN185379)	282 100% esporocistos (JN185410)	1
138- Araçari-banana Saffron Toucanet (<i>Pteroglossus bailloni</i>)	335 100% esporocistos (JN185349)	464 100% esporocistos (JN185379)	282 100% esporocistos (JN185410)	
431- Guaxe Red-rumped Cacique (<i>Cacicus haemorrhous</i>)	385 100% esporocistos (JN185349)	464 100% esporocistos (KR107218)	282 100% esporocistos (JN185410)	2
453- Guaxe Red-rumped Cacique (<i>Cacicus haemorrhous</i>)	335 100% esporocistos (JN185349)	464 100% esporocistos (KR107218)	282 100% esporocistos (JN185410)	
137- Tiê-preto Ruby-crowned Tanager (<i>Tachyphonus coronatus</i>)	335 100% esporocistos (JN185349)	464 100% esporocistos (KR107224)	282 100% esporocistos (JN185410)	3
444- Guaxe Red-rumped Cacique (<i>Cacicus haemorrhous</i>)	335 100% esporocistos (JN185349)	464 Mista	282 100% esporocistos (JN185410)	
452- Tiê-sangue Brazilian Tanager (<i>Ramphocelus bresilius</i>)	335 100% esporocistos (JN185349)	464 100% esporocistos (JN185379)	282 Mista	
163- Anu-branco Guira Cuckoo (<i>Guira guira</i>)	335 Inédita	NA	282 Inédita	

Fonte: Llano (2019)

Legenda: NA: Não amplificado. As cores diferentes indicam espécies diferentes de *Sarcocystis*. Verde: *Sarcocystis* sp. ex *Cacicus haemorrhous*; Laranja: *Sarcocystis* sp. ex *Guira guira*

Como é possível inferir, não parece existir desequilíbrio de ligação entre os 3 loci SAG. Para exemplificar, as aves # (210, 222, 230, 231, 262, 330, 349, 387, 425) que estão relacionadas filogeneticamente no clado marcado com ramos vermelhos na árvore de SAG2 (Figura 8A), não estão todas em um mesmo clado na filogenia de SAG3 (Figura 9A). Esta condição, também verificada em estudos com *S. falcatula* isolados em periquitos no Brasil (GONDIM et al., 2017; CESAR et al., 2018), permitem supor a ocorrência de troca gênica entre isolados classificados como *S. falcatula*.

A partir da análise dos três SAGs estudados, as diferentes combinações de alelos foram identificadas como genótipos (G). Para as amostras classificadas como *S. falcatula*, 12 genótipos SAGs foram detectados em 19 aves: G1 (amostras #222, 230), G2 (amostra# 233), G3 (amostra# 262), G4 (amostras# 326,349,330), G5 (amostra# 189), G6 (amostra# 206), G7 (amostra# 407), G8 (amostras# 210, 387), G9 (amostras# 174,208,238,283), G10 (amostra# 258), G11 (amostra# 181), G12 (amostra# 103). Para as amostras classificadas como *Sarcocystis* sp. ex *Cacicus haemorrhous*, 3 genótipos em 5 aves: G1 (amostras# 138,282), G2 (amostras# 431,453) e G3 (amostra# 137).

Como pode ser verificado, aves de diferentes espécies podem infectar-se pelo o mesmo genótipo assim como uma mesma espécie de ave pode infectar-se por mais de um genótipo. No primeiro caso, as espécies de Ordens diferentes como pica-pau-de-banda-branca, gavião-asa-de-telha, pitiguari e periquito-verde compartilham o mesmo genótipo (G9) indicando que genótipos de *S. falcatula* não parecem ser exclusivos para um dado hospedeiro. No segundo caso, em cinco aves da espécie tucano-de-bico-verde foram identificados três genótipos (G1, G2, G10). Isto contrasta com as observações de Acosta et al., (2018) que descreveram apenas um genótipo em 16 indivíduos da espécie pinguim-de-magalhães.

Das 36 amostras positivas para *Sarcocystis* spp., 13 (35%) apresentaram evidência de infecções mistas ou heterozigose alélica, pois nestas amostras há evidências de mais de um alelo em pelo menos um locus SAG. Infecções mistas com *Sarcocystis* spp. no mesmo indivíduo, já foi

reportado por Dubey et al. (2004), na espécie de tucano (*Ramphastos sulfuratus*) com *Sarcocystis ramphastosi* e *Sarcocystis sulfuratusi*.

Os nossos resultados também provem evidência de que não existe uma dominância de um genótipo a nível geográfico. O raio da coleta das amostras é inferior a 200 km², sendo necessários mais estudos em outras regiões de Brasil e América do Sul para corroborar essa observação.

Infelizmente, não é possível comparar os estudos de diversidade de SAGs das amostras de *S. falcatula* do hemisfério Sul com as do hemisfério Norte, porque os autores norte americanos não pesquisam genes SAG em amostras destes parasitos.

Outro achado a salientar é que nenhuma ave positiva para *S. falcatula* tinha a mesma combinação de alelos SAG que as descritas para o caso clínico com manifestações neurológicas em maçarico-de-cabeça-pelada (*P. infuscatus*), em que *S. falcatula* foi incriminado como agente causal. Não é possível determinar se esse genótipo particular de *S. falcatula* seja patogênico para aves, porém é sabido que certas variantes em *S. neurona*, por exemplo genótipo I e XIII, estão associados a uma alta mortalidade em mamíferos aquáticos (WENDTE et al., 2010; BARBOSA et al., 2015).

A alta diversidade gênica em espécies de *S. falcatula* poderia ser explicada por processos de gametogônia no hospedeiro definitivo, onde ocorreria a “troca” de vários alelos gerando novas combinações que são infectantes ou não para hospedeiros intermediários. Como foi verificado por Porter et al. (2001), gambás infectados experimentalmente com *S. falcatula*, a partir de uma exposição limitada de tecidos do pássaro chupim-cabeça-castanha (*Molothrus ater*), eliminaram esporocistos por até duzentos dias após infecção. Durante todo este tempo, haveria grande oportunidade para a ocorrência de intercambio gênico entre vários genótipos no hospedeiro definitivo.

Reforçando essa hipótese, a expectativa de vida de um gambá sul-americano é de aproximadamente dois anos (SMITH, 2007), nos quais ele seria exposto a múltiplas doses infecciosas a partir de tecidos infectados com diferentes genótipos de *S. falcatula*. Pelos nossos resultados, infere-se serem

elevadas as chances de encontrar aves infectadas com genótipos diferentes: entre 19 aves infectadas que tiveram a genotipagem SAG completa, há 12 genótipos diferentes. De fato, quando quantificamos o Índice de Simpson, utilizado em estudos de diversidade genética (SOARES et al., 2011b; MONTEIRO et al., 2013), o valor encontrado para 19 espécies e 12 genótipos foi de 0,886, indicando que as probabilidades de duas espécies selecionadas ao acaso pertencer a genótipos diferentes foi 88,6%.

Também é forte a evidência que as amostras de 1000 bp sejam todas transmitidas por didelfídeos, pois seus alelos SAG já foram encontrados em gambás no Brasil.

Figura 8. Análise filogenética de *Sarcocystis* spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (SAG-2)

Fonte: Llano (2019)

Legenda: A. A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeo de Kimura de 2 parâmetros. (●): Sequências obtidas neste estudo. (*): Novos genótipos. Esta análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Houve um total de 225 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X. B. Network. Os círculos representam diferentes Tipos de *Sarcocystis* e cada cor as Ordens que originaram as amostras. O tamanho de cada círculo equivale ao número de amostras. O número ao lado de cada círculo corresponde à identificação das amostras. Traços nas linhas indicam as diferenças (mutações) entre as amostras.

Figura 9. Análise filogenética de *Sarcocystis* spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (SAG-3)

Fonte: Llano (2019)

Legenda: A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeo de Kimura de 2 parâmetros. (●): Sequências obtidas neste estudo. (*): Novos genótipos. Esta análise envolveu 14 sequências nucleotídicas. Houve um total de 316 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X. B. Network. Os círculos representam diferentes Tipos de *Sarcocystis* e cada cor as Ordens que originaram as amostras. O tamanho de cada círculo equivale ao número de amostras. O número ao lado de cada círculo corresponde a uma amostra que representa as demais nesse grupo. Traços nas linhas indicam as diferenças (mutações) entre as amostras.

Figura 10. Análise filogenética de *Sarcocystis* spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (SAG-4)

Fonte: Llano (2019)

Legenda: A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeo de Kimura de 2 parâmetros. (●): Sequências obtidas neste estudo. (*): Novos genótipos. Esta análise envolveu 9 sequências nucleotídicas. Houve um total de 220 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X. **B.** Network. Os círculos representam diferentes Tipos de *Sarcocystis* e cada cor as Ordens que originaram as amostras. O tamanho de cada círculo equivale ao número de amostras. O número ao lado de cada círculo corresponde a uma amostra que representa as demais nesse grupo. Traços nas linhas indicam as diferenças (mutações) entre as amostras.

5.2.2. Aspectos epidemiológicos e morfológicos de *S. falcatula*

As amostras de 28 aves positivas para *S. falcatula* pertencem a 14 espécies de aves das Ordens Accipitriformes, Anseriformes, Columbiformes, Passeriformes, Piciformes, Psittaciformes e Strigiformes. O número de aves positivas em relação à Ordem é apresentado na figura 11.

Figura 11. Número de aves positivas para *S. falcatula* em relação à Ordem

Fonte: Llano (2019)

A lista de Ordens avaliadas que não apresentaram indivíduos positivos a *S. falcatula* inclui: Apodiformes (n=13), Cathartiformes (n=11), Cuculiformes (n=12), Falconiformes (n=16), Caprimulgiformes (n=8), Charadriiformes (n=2), Coraciiformes (n=1), Galliformes (n=4), Gruiformes (n=5), Pelecaniformes (n=8), Suliformes (n=5) e Tinamiformes (n=1).

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro relato de infecção natural por *S. falcatula*-like em 14 espécies de aves representadas em 28 indivíduos. Esse alto número de espécies inéditas pode ser explicado porque aves do novo mundo convivem com infecção subclínica sem apresentar sintomatologia, enquanto que aves do velho mundo são suscetíveis à infecção muitas vezes causando surtos com alta mortalidade onde o agente etiológico é pesquisado.

Exceto uma espécie de ganso, todas as aves neste estudo têm distribuição entre América Central e América do Sul, onde provavelmente têm sido expostas às formas infectantes do parasito, por conseguinte, os achados nessas aves frequentemente são incidentais.

A lista de espécies com detecção molecular de *S. falcatula* agrupadas pela Ordem, encontram-se detalhadas a seguir:

Accipitriformes

Em duas espécies de gaviões foi detectado molecularmente a espécie *S. falcatula*. O gavião-carijó (*R. magnirostris*, amostra #149) e gavião-asa-de-telha (*P. unicinctus*, amostra #174) têm distribuição entre América Central e América do Sul.

O papel dessa Ordem como hospedeiros intermediários de espécies de *S. falcatula* foi documentado pela primeira vez nos Estados Unidos (WUNSCHMANN et al., 2010). Em três águias-de cabeça-branca (*Haliaeetus leucocephalus*) e uma águia-real (*Aquila chrysaetos*) foram constatados cistos maduros principalmente em músculo esquelético. Também foi verificado por imuno-histoquímica e histopatologia esquizontes e merozoítos em pulmão em duas aves e em cérebro nas outras duas.

A detecção do parasito em músculo em essas duas espécies de gaviões provavelmente seja devido à formação de sarcocistos, confirmando assim seu papel como hospedeiros intermediários. A diferença do caso clínico reportado nos Estados Unidos de *S. falcatula* como agente causal da morte das aves, as espécies aqui relatadas não apresentaram sintomas e morreram por causas diferentes.

Anseriformes

Estudos iniciais, demonstraram certa resistência à infecção por *Sarcocystis* em Anseriformes. O gambá americano (*D. virginianus*) alimentado com tecido de pássaros icterídeos (*M. ater*, *Cassidix mexicanus*) contendo macrocistos, conseguiu liberar esporocistos que foram inoculados em outras espécies de aves. A infecção foi transmitida com sucesso para canários e pardais, enquanto que para a espécie de pato (*Anas platyrhynchos*) não foram achadas lesões nem estágios assexuados do parasito em órgãos ou musculatura (BOX; DUSZYNSKI, 1978).

Recentemente, um estudo avaliando a presença de anticorpos contra vários protozoários em gansos (*Anser* sp.) de parques públicos e cativeiro em

Curitiba-PR, revelou que 28% (42/149) das aves apresentaram títulos maiores de 1:25 na RIFI para *Sarcocystis* sp. Noventa por cento dos gansos eram clinicamente saudáveis exceto 4 aves que manifestaram sinais clínicos inespecíficos ao exame físico como diarreia, prolapso cloacal, e presença de estertores no peito (KONELL et al., 2019). A confirmação molecular da espécie de *Sarcocystis* não foi realizada.

Neste estudo, confirmamos infecção natural por *S. falcatula* em uma espécie de ganso. Apenas quatro aves representando duas espécies foram pesquisadas sendo difícil estabelecer se há algum tipo de resistência à sarcocistose nessas aves. A via de transmissão em aves aquáticas e presença de gambás nesses ambientes não é clara. Alguns autores comprovaram para outros Apicomplexos, como *T. gondii*, que uma vez oocistos entram no ambiente marinho eles podem ser filtrados e concentrados por ostras e mexilhões tornando-se infecciosos para hospedeiros intermediários (LINDSAY et al., 2001; ARKUSH et al., 2003). Outros estudos aferindo a viabilidade de oocistos de *T. gondii* em águas marinhas, comprovou que podem esporular e serem infecciosos até por vários meses nessas condições. Os gansos principalmente são herbívoros, mas também se alimentam de insetos, moluscos e crustáceos pequenos de águas doces. Estudos encaminhados a estabelecer as vias de transmissão em aves aquáticas e viabilidade de esporocistos nesse ambiente são necessários.

Columbiformes

Em três espécies de Columbiformes representadas em cinco aves foi detectado molecularmente a espécie *S. falcatula*. Asa-branca (*P. picazuro*), juritigemeadeira (*L. rufaxilla*) e avoante (*Z. auriculata*) são pombos exclusivos da América do Sul.

Na literatura, vários estudos citando *S. falcatula* como agente causal de sarcocistose pulmonar aguda em pombos do velho mundo têm sido relatados. Suedmeyer et al. (2001) reportaram a morte de três pombos de Nova Guiné (*Goura victoria*) devido a achados histopatológicos em pulmão de merozoítos compatíveis com *S. falcatula*-like. No Brasil, Ecco et al. (2008) descreveram esquizontes em pulmão compatíveis com *S. falcatula* em uma espécie de pombo-asiático (*Gallicolumba luzonica*). Nos Estados Unidos, técnicas de digestão de tecidos com pepsina para detecção de zoítos em músculo foram utilizadas numa espécie de rola-

carpideira (*Zenaida macroura*), resultados da frequência de infecção por *Sarcocystis* sp. variaram entre 6,8 a 10,4% nessas aves (CONTI; FORRESTER, 1981).

No entanto, muitos desses estudos estão sendo hoje revisados devido à recente descrição de uma espécie altamente patógena em pombos e psittacídeos: *S. calchasi* que causa a mesma sintomatologia respiratória e nervosa que *S. falcatula*. Diferenças morfológicas na parede do cisto e moleculares revelaram que são espécies diferentes. No marcador ITS1 a porcentagem de identidade entre ambas as espécies é apenas 51% (OLIAS et al., 2010a). Surtos na Europa e Estados Unidos vêm sendo cada vez mais frequentes (OLIAS et al., 2009b, 2014; RIMOLDI et al., 2013; HODO et al., 2016; TRUPKIEWICZ et al., 2016), no entanto, em neste estudo entre as 34 aves pertencentes à Ordem Columbiformes e 52 aves Psittaciformes, não foi detectado *S. calchasi* na musculatura dessas aves.

É difícil conhecer como essas aves se infectam, mas seus hábitos alimentícios e permanente contato com o solo facilitariam o contato com esporocistos liberados pelo gambá.

Passeriformes

Observações frequentes de macrocistos de *Sarcocystis* spp. em várias espécies de pássaros Icterídeos como pássaro-vaqueiro-de-cabeça-marrom (*M. ater*) e zanate-comum (*Quiscalus quiscula*) foram frequentes nos Estados Unidos e deram início à experimentação com aves e carnívoros tentando elucidar o ciclo biológico da sarcocistose aviária (DUSZYNSKI; BOX, 1978). No entanto, relatos de infecção natural nos últimos anos por *S. falcatula* são escassos nessa Ordem. Dubey et al. (2001c) descreveram o caso clínico na ave abelharuco-carmim (*Merops nubicus*), em um zoológico nos Estados Unidos. O pássaro apresentou sintomatologia respiratória e na necropsia foi verificada presença de esquizontes em pulmão e coração. A morfologia da parede do cisto mais análise imuno-histoquímica demonstraram uma espécie diferente de *S. falcatula* e *S. neurona*, descrevendo-a como *S. falcatula*-like. Mansfield et al. (2008) confirmaram que o pássaro-vaqueiro-de-cabeça-marrom (*M. ater*) também atua como hospedeiro intermediário natural de *S. neurona*.

Neste estudo, de 149 pássaros analisados, apenas um indivíduo da família Vireonidae: o pitiguari (*C. gujanensis*), estava infectado com *S. falcatula*. Essa

espécie está distribuída desde América Central até o Sul, se alimenta de insetos, pequenos vertebrados, larvas e frutos (WIKIAVES, 2019), porém é difícil estabelecer a fonte de infecção para esse tipo de aves.

Piciformes

Em uma espécie de tucano e duas de pica-pau foi detectado molecularmente a espécie *S. falcatula*. Este é o primeiro relato de infecção por esse agente ao nível Ordem.

O tucano-de-bico-verde (*R. dicolorus*) foi a espécie mais frequentemente infectada, de 8 animais seis foram positivos (75%). A visualização de cistos microscópicos na musculatura peitoral desta espécie (Figura 10) mais a caracterização molecular com vários marcadores moleculares permite confirmar a sua participação como hospedeiro intermediário no ciclo biológico de *S. falcatula*. Esta ave é encontrada exclusivamente em toda a região Sul e Sudeste do Brasil, no Paraguai e até nordeste da Argentina e vem diminuindo pela perda de seu habitat natural (WIKIAVES, 2019), embora na classificação da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) seja uma população de “baixo risco” (IUCN, 2019).

Até o presente momento, duas espécies de *Sarcocystis* foram descritas na família Ramphastidae. Em um tucano-de-bico-arco-íris (*R. sulfuratus*), endêmico da América Central, foram observados cistos macroscópicos (3 x 1 mm) na musculatura cervical. Ao análise microscópico dois tipos de cistos com tamanhos diferentes (750 µm vs. 200 µm) foram visualizados, diferenças ultraestruturais permitiram a classificação em dois tipos de *Sarcocystis* nomeados como *S. ramphastosi* e *S. sulfuratusi* (DUBEY; LANE; WILPE, 2004). Anos mais tarde, os autores analisaram molecularmente a espécie classificada como *S. ramphastosi* relacionando-a com *S. neurona* e *S. falcatula* no locus 18S (EU263366, 1208 pb) (DUBEY et al., 2008). Outras sequências para ambas as espécies não estão disponíveis no GenBank ainda.

Em relação à família Picidae que tem uma distribuição mundial exceto na Austrália, Nova Guiné, Nova Zelândia e Madagascar, relatos de infecção por *Sarcocystis* spp. são desconhecidos. Neste estudo três de nove pica-paus-de-cabeça-amarela (33%) (*C. flavescens*) foram positivos para *S. falcatula*. A localização geográfica desta ave é exclusiva de América do Sul, encontrando-se

desde o baixo Amazonas até o Rio Grande do Sul no Brasil, e parte de Paraguai e Argentina (WIKIAVES, 2019). Em outra espécie, apenas um pica-pau-de-cabeça-branca (*D. lineatus*) de seis pesquisados, resultou positivo para *S. falcatula*. Essa espécie tem uma distribuição menos restrita encontrando-se desde México até Argentina. São espécies de “baixo risco” segundo a classificação pela IUCN, embora a população esteja em declínio (IUCN, 2019).

Recentemente em duas espécies de pica-pau na Alemanha (*Dendrocopos major*, *Picus viridis*) com sintomatologia nervosa, foi detectado DNA de *S. calchasi* na musculatura e cérebro dessas aves (ZIEGLER et al., 2018), no entanto, descrições de infecção por *S. falcatula* não têm sido reportadas.

Nesta Ordem foi achado o maior número de animais infectados com *S. falcatula* (Figura 11), especulamos que a característica comum às duas Famílias de nidificar em ocos de árvores pode favorecer ao contato com fezes de didelfídeos. Os gambás frequentam ninhos em procura de ovos ou filhotes e também usam buracos das árvores como abrigo durante o dia (SMITH, 2007).

Psittaciformes

Na Ordem Psittacídeos três espécies representadas em 8 indivíduos foram positivas à detecção molecular de *S. falcatula*. As aves maritaca-verde (*P. maximiliani*), papagaio-verdadeiro (*A. aestiva*) e periquito-verde (*B. tirica*) são exclusivas de América do Sul, sendo a última espécie endêmica da Mata Atlântica.

São numerosos os estudos confirmando a suscetibilidade de Psittacídeos do velho mundo à infecção por *S. falcatula*. Siegal-Willott et al. (2005) reportaram lesões cerebrais e musculares em uma cacatua-branca (*Cacatua alba*) como consequência de infecção por *S. falcatula*-like. Dubey et al. (2006) descreveram macrocistos na musculatura de um papagaio-cinzentos-africano (*Psittacus erithacus*), a identificação por microscopia eletrônica e detecção molecular (18S rDNA) confirmaram *S. falcatula* como agente etiológico. Villar et al. (2008) descreveram três diferentes formas clínicas fatais em 11 espécies de Psittaciformes, apresentando lesões cerebrais, pulmonares e musculares. O diagnóstico foi atribuído a *S. falcatula* devido à presença de esquizontes e merozoítos na vasculatura pulmonar, cérebro e cerebelo, combinado com provas sorológicas indiretas.

Surtos em zoológicos também são comuns. Hillyer et al. (1991) descreveram a morte de 37 psittacídeos em um zoológico nos Estados Unidos, a metade deles morreram sem apresentar sintomatologia clínica, os demais manifestaram dificuldade para respirar, debilidade, anorexia e anormalidades neurológicas. À necropsia foram confirmados esquizontes no endotélio pulmonar e sarcocistos na musculatura. Recentemente Verma et al. (2018) constataram a morte de três papagaios-arco-íris (*T. moluccanus*) em um zoológico de Filadélfia. Os animais apresentaram sintomatologia respiratória principalmente. Análise multilocus dos genes 18S, 28S, COX1 e ITS mais a caracterização morfológica de esquizontes no endotélio vascular pulmonar confirmaram *S. falcatula* como o agente etiológico.

No Brasil, o primeiro reporte de infecção por *S. falcatula* foi documentado em um zoológico em Belo Horizonte (ECCO et al., 2008). Espécies de periquitos de origem asiático (*Psittacula krameri*), morreram subitamente sem apresentar sintomatologia. À necropsia, foram visualizados esquizontes e merozoítos em pulmões e fígado atribuídos a *S. falcatula*. Outro surto, desta vez em um zoológico no Parque das Aves Foz de Iguaçu, no sul do país, ocasionou a morte de 38 aves psitacídeas pertencendo a 16 espécies, em sua maioria do velho mundo, as que conseguiram sobreviver mais tempo apresentaram lesões pulmonares. O diagnóstico foi confirmado através de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica (GODOY et al., 2009).

Relatos de infecção por *S. falcatula* em aves do novo mundo não são frequentes devido à co-evolução com o parasito gerando resistência à infecção no hospedeiro. Neste estudo, identificamos pela primeira vez infecção natural com *S. falcatula* em três espécies endêmicas da América do Sul. Conhecer hábitos de alimentação e aninhamento são importantes para estabelecer a possível via de transmissão. Alguns autores propõem que hospedeiros paratênicos como baratas e outros insetos servem de veículo para *Sarcocystis* spp. em Psittacídeos (HILLYER et al., 1991; CLUBB et al., 1992; DONELEY, 2009), no entanto, outros autores consideram que é improvável que esses hospedeiros transportem esporocistos suficientes para infectar uma ave (SUEDMEYER et al., 2001).

Strigiformes

O primeiro diagnóstico de infecção natural por *S. falcatula* em Strigiformes foi realizado nos Estados Unidos por Wünschmann et al. (2009). Um corulhão-orelhudo (*Bubo virginianus*) de vida livre com sintomatologia neurológica que afetava a sua capacidade de voar, foi atendido no hospital universitário. Após tratamento falido, o animal veio a óbito e na necropsia foi confirmada a presença de numerosos esquizontes imaturos e merozoítos no tecido cerebral, compatíveis com encefalite causada por protozoários. A imuno-histoquímica e diagnóstico molecular com PCR-ITS1 identificou o agente causal como *S. falcatula*. Ao comparar a sequência (EU937517,683 pb) com as cepas clássicas norte-americanas *S. falcatula* is. Florida I e *S. falcatula* is. Cornell I (AF098242 e AF098244), a porcentagem de identidade foi de mais de 99%. Ao comparar as 683 pb com a sequência produzida neste estudo a partir da corujinha-de-mato (amostra #407, 1013 pb), a similaridade foi de 96%, confirmando mais uma vez diferenças entre *S. falcatula* da América do Sul com variantes norte americanas.

Os autores propõem que esta ave pode ter sido infectada diretamente ou através da predação de um gambá contendo esporocistos esporulados. No entanto, a formação de cistos na musculatura da ave não foi detectada, descartando seu papel como hospedeiro intermediário, neste caso. Outra teoria é a infecção através do consumo de outras aves infectadas com *S. falcatula*, como Passeriformes e Columbiformes que fazem parte da dieta destes animais. A via de transmissão seria a mesma proposta por Sibley (2003) para *T. gondii*, onde a infecção passa de um hospedeiro intermediário ao outro pelo carnivorismo, ocorrendo transmissão assexual direta, sem precisar da fase sexuada no hospedeiro definitivo. Este estudo seria o segundo relato de infecção por *S. falcatula* em Strigiformes.

Em relação análise morfológico, amostra de músculo esquelético no tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*, amostra #222), caracterizada molecularmente como *Sarcocystis falcatula*, foi submetida a processos histopatológicos de coloração com hematoxilina e eosina (HE) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Apesar de não ser fixada nem conservada adequadamente e permanecer por longo período congelada, foi possível observar

características externas do formato dos cistos, porém, ultraestruturas internas estavam degradadas dificultando a observação.

Ao exame histológico vários sarcocistos paralelos às fibras musculares, de aparência fusiforme e com septos internos foram observados ao interior de miócitos. O tamanho destas estruturas variou entre 30-100 μm de largura x 10-20 μm de comprimento (Figura 12. A-C).

Ao exame ultra estrutural a espessura da parede cística variou entre 0,8-1,2 μm , da qual projetavam-se protusões delgadas e largas contendo microtúbulos (Figura 10. D, E). A parede cística estava composta por uma substância granulosa que atravessava o cisto integralmente, formando compartimentos dentre os quais foi possível observar zoítos sem conseguir diferenciar entre badizoítos ou metrócitos pela deterioração da amostra (Figura 12.F). O tamanho aproximado destes zoítos foi de 6 x 1 μm de comprimento, contendo no complexo apical três roptrias, e núcleo localizado na metade posterior do parasito. Tais descrições são semelhantes àsquelas observadas por Box; Smith, (1982) e Box; Meier; Smith (1984) para *S. falcatula*, onde o comprimento de bradizoítos em sarcocistos maduros de quatro espécies de pássaros variou entre 4.8-9.3 x 1.2-2.9 μm .

Figura 12. *Sarcocystis falcatula* em músculo peitoral de Tucano de bico verde (*Ramphastos dicolorus*).

Fonte: Llano (2019)

Legenda: **A-B.** Cistos paralelos às fibras musculares (setas), fusiformes, septados e aproximadamente com tamanho 80-100 x 10-20 µm. Célula hospedeira (Ch). Hematoxilina e eosina (HE). **D,E.** Parede do cisto (cabeça de setas). Espessura da parede variando entre 0,8-1,2 µm, protusões (P) delgadas e largas contendo microtúbulos (Mt) que saem da substância granulosa (Sg). **F.** Metrículo ou Bradizoito (Z), Conoide (Co), Núcleo (Nu). Septos dividindo o cisto em vários compartimentos (S). Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

5.2.3 Aspectos epidemiológicos e morfológicos de *Sarcocystis* sp. ex *Cacicus haemorrhous*

Em sete aves pertencentes às espécies guaxe, tiê-sangue, tiê-preto e araçari-banana foi detectada a espécie *Sarcocystis* sp. ex *Cacicus haemorrhous* pela amplificação molecular da região ITS1 (Tabela 2).

Todas as amostras eram oriundas do município Eldorado/SP, localizado no sul do estado a 140 Km da capital. Cinco aves foram produto de uma apreensão de 175 aves e as duas restantes vieram do Parque Estadual Caverna do diabo. Essa região é considerada como uma das mais biodiversas do planeta, devido ao fato de possuir a maior proporção de Mata Atlântica do Brasil. Várias espécies são endêmicas e muitas delas se encontram ameaçadas de extinção pela perda do habitat ou pelo tráfico de fauna silvestre (WIKIAVES, 2019).

Neste caso, as quatro espécies são endêmicas de América do Sul, com distribuição quase limitada ao Brasil. A distribuição do tiê-sangue vai desde Paraíba até Santa Catarina, exclusivamente, o tiê-preto desde Espírito Santo até Rio Grande do Sul, estendendo-se até Paraguai e Argentina. O guaxe está mais amplamente distribuído nos países amazônicos e todo o leste do país. A espécie de tucano araçari-banana limita-se ao sul do país e norte de Argentina e Paraguai, pela perda de habitat encontra-se na categoria “quase ameaçada”, segundo a lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2019).

Destas sete aves foi possível conhecer a história clínica e laudo necroscópico da amostra #282, correspondente ao Guaxe (*Cacicus haemorrhous*) realizado pela Médica veterinária da Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Gestão da Fauna Selvagem (DEPAVE-3).

O animal chegou ao centro médico com estado nutricional ruim, pele ressecada e espessada, sugestivo de desidratação intensa. Quatro dias após do tratamento sem sucesso a ave veio a óbito. Os achados de necropsia mais importantes foram no sistema digestório: fígado moderadamente pálido, consistência macia ao corte; vesícula biliar: moderadamente preenchida; pró-ventrículo e ventrículo: ausência de conteúdo alimentar. Helmintos presentes. O sistema musculoesquelético apresentava atrofia moderada e presença de cistos em musculatura peitoral, abdominal, craniana e cervical (Figura 13).

Os demais sistemas não apresentaram alterações macroscópicas. A causa de morte mais provável foi caquexia e desidratação. O laudo necroscópico completo consta no anexo A.

Figura 13. Macrocistos de *Sarcocystis* sp. em Guaxe (*Cacicus haemorrhous*)

Fonte: DEPAVE-3

Legenda: **A.** Cistos de *Sarcocystis* sp. em músculo peitoral com tamanho aproximado entre 2-4 mm de comprimento, brancos e ondulados, orientados no eixo longitudinal. **B.** Setas indicando cistos em cavidade abdominal.

Ao exame histológico cistos ovalados com tamanhos variando entre 80-100 x 300-400 μ m, foram detectados no músculo peitoral (Figura 14 A, B). A coloração com HE permitiu distinguir uma zona interna com material claro degenerado e outra externa mais escura. O interior do sarcocisto estava dividido em compartimentos por septos. A parede do sarcocisto era de aparência fina e com finíssimas protusões (Figura 14 A-C).

Estas observações coincidem com estudos experimentais conduzidos em periquitos australianos infectados com *S. falcatula*, depois de 42 dias p.i., cistos degenerados apareciam na musculatura peitoral, apresentando uma parede cística primária com protrusões minúsculas, abundante material amorfo e numerosos zoítas centrais degenerados (NEILL; SMITH; BOX, 1989).

Ao exame ultra estrutural a espessura da parede cística variou entre 0,8-1,2 μ m com protusões delgadas e largas contendo microtúbulos. A substância granulosa era aproximadamente duas vezes mais espessa que as protrusões, aproximadamente 4 μ m. A morfologia de outras estruturas internas como bradizoítos e metrócitos não foi possível diferenciar pela deterioração da amostra.

Figura 14. *Sarcocystis* sp. em músculo peitoral do Guaxe (*Cacicus haemorrhous*)

Fonte: Llano (2019)

Legenda: **A, B.** Cistos ovalados (setas), septados e aproximadamente com tamanho 80-100 x 300-400 µm. **C.** Setas indicando protusões (P). Hematoxilina e eosina (HE). **D-F.** Parede do cisto (cabeça de setas). Espessura da parede variando entre 0,8-1,2 µm, protusões (P) delgadas e largas contendo microtúbulos (Mt) que saem da substância granulosa (Sg). Septos dividindo o cisto em vários compartimentos (S). Microscopia eletrônica de transmissão (MET).

5.3 Caracterização molecular das amostras positivas para fragmentos de nPCR-ITS1 entre 500 e 1000 pb

Em duas espécies de aves carnívoras foram detectados fragmentos de nPCR-ITS1 entre 800 e 900 pb, aproximadamente. Em gavião-miúdo (*Accipiter striatus*), resultados do sequenciamento deste fragmento confirmaram 99,2% de identidade com *Sarcocystis halioti*. Para a amostra de urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*), a espécie com maior identidade foi *Sarcocystis lari* (90,0% de identidade) (tabela 1).

Estudos confirmando o papel de aves carnívoras (rapinantes, necrófagas) como hospedeiros intermediários de *Sarcocystis* spp. são frequentes. Em águia europeia (*Buteo buteo*) e coruja-pequena (*Asio otus*), foram visualizados três tipos morfológicamente diferentes de sarcocistos em músculo peitoral (KRONE; RUDOLPH; JAKOB, 2000). Nos Estados Unidos Crawley et al. (1982) identificaram dois tipos de cistos no músculo esquelético e coração da águia-de-cabeça-branca (*Haliaeetus leucocephalus*). Nessa mesma espécie de ave, Olson et al. (2007) descreveram cistos no miocárdio e músculo ocular, além de merozoítos e esquizontes no cérebro, possivelmente de outra espécie de *Sarcocystis*, causando lesões compatíveis com meningoencefalite. Outra pesquisa, desta vez utilizando a técnica de digestão de tecido por pepsina, foi realizada em 114 amostras de músculo e coração de 11 espécies de rapinantes, bradizoítos *Sarcocystis-like* foram identificados em 45,6% das amostras (LINDSAY; BLAGBURN, 1999). Recentemente, um estudo realizado nos Estados Unidos revelou presença de cistos no músculo peitoral e cardíaco de aves de rapina, 39 de 204 aves estavam infectadas (19,1%) e as aves com mais de dois anos de idade apresentaram maior risco de infecção (DOHLEN et al., 2019).

Com o advento de técnicas moleculares, tornou-se possível determinar se espécies de *Sarcocystis* caracterizadas em oocistos/espocistos a partir de fezes ou mucosa intestinal no hospedeiros definitivos, correspondem às descritas em hospedeiro intermediário ou pertencem a espécies inéditas, excluindo a necessidade de infecções experimentais (GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018).

Yabsley et al. (2009) examinaram intestino de 238 rapinantes, encontrando 159 (66,8%) positivas no marcador 18S para *Sarcocystis* spp. As aves infectadas eram três espécies de falcões (*Accipiter cooperi*, *Buteo jamaicensis*, *Buteo lineatus*) e uma águia (*Accipiter striatus*). A identificação ao nível espécie não foi possível utilizando apenas esse marcador.

Esporocistos em uma espécie de águia europeia (*Haliaeetus albicilla*) foram caracterizados utilizando os marcadores 18S, 28S, COX1 e ITS1. O sequenciamento revelou três espécies de *Sarcocystis*: *S. halioti*, *S. lari* e *S. truncata* nessa ave (GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018).

No Brasil esporocistos de *Sarcocystis* sp, foram encontradas em 7 de 9 (77%) corujas-de-igreja (*Tyto alba*) (ANDERY et al., 2013), mas nesse trabalho os autores não realizaram identificação molecular dos parasitos.

Usando um modelo de divergência evolutiva baseado em distância *p* para comparar as sequências gênicas das amostras #213 e #471 com sequências disponíveis de *Sarcocystis* spp. que usam aves como hospedeiros intermediários, foi construída uma matriz de similaridade para duas regiões nucleares (18S, ITS1) e uma mitocondrial (COX1) (tabela 3). No caso da amostra #213 pertencente à espécie *Accipiter striatus* as porcentagens de identidade variaram entre 99-100%; 94,5-100% e 39,0-94,4% para os marcadores 18S, COX1 e ITS1, respectivamente. A maior porcentagem de identidade para essa amostra no marcador ITS1 foi com *S. halioti*. Já para amostra # 471 pertencente à espécie *Coragyps atratus* as porcentagens de identidade variaram entre 98,3-99,0%; 94,5-99,0% e 41,7-90,7% para os marcadores 18S, COX1 e ITS1, respectivamente. A maior porcentagem de identidade para essa amostra no marcador ITS1 foi com *Sarcocystis lari*.

Análises filogenéticas foram conduzidas separadamente para as duas espécies de *Sarcocystis* e utilizando três marcadores moleculares (18S, COX1 e ITS1) e estão descritas nos itens seguintes.

Tabela 3. Distância *p* das regiões 18S, COX1 e ITS1 entre sequências *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter striatus*, *Sarcocystis* sp. ex *Coragyps atratus* e espécies de *Sarcocystis* em aves

<i>Sarcocystis</i> spp.	<i>S. sp. ex Accipiter striatus</i>			<i>S. sp. ex. Coragyps atratus</i>		
	18S	COX1	ITS1	18S	COX1	ITS1
1. <i>S. sp. ex Accipiter striatus</i>						
2. <i>S. sp. ex. Coragyps atratus</i>	99,0	99,6	77,2			
3. <i>S. sp. ex. Accipiter</i> sp.	100	99,8	93,7	99,0	99,8	75,8
4. <i>S. albifrons</i>	99,1	94,9	45,1	98,3	94,9	44,4
5. <i>S. anasi</i>	99,1	94,5	45,0	98,5	94,5	44,2
6. <i>S. calchasi</i>	100	sd	83,8	99,0	sd	75,1
7. <i>S. columbae</i>	99,9	100	92,9	98,9	99,6	75,7
8. <i>S. cornixi</i>	99,5	99,8	78,8	98,6	99,5	72,9
9. <i>S. corvusi</i>	99,9	100	93,1	98,9	99,6	75,3
10. <i>S. falcatula</i> is. <i>Lorikeet</i>	99,3	98,0	39,0	98,7	98,4	41,7
11. <i>S. halioti</i>	100	100	99,4	99,0	99,6	76,9
12. <i>S. lari</i>	99,6	99,6	75,9	98,9	100	90,7
13. <i>S. rileyi</i>	99,2	96,0	44,0	98,5	96,0	44,6
14. <i>S. turdusi</i>	99,7	99,6	80,4	99,0	99,3	75,2
15. <i>S. wobeseri</i>	100	99,8	84,4	99,0	99,5	75,6

Fonte: Llano (2019)

Legenda: Números em vermelho correspondem a porcentagem máxima de identidade; sd: sem dados

5.3.1 *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter striatus* (#213)

Análise das 745 pb efetivamente sequenciadas no locus 18S, demonstrou 100% de identidade com dois isolados de *S. halioti* detectados em músculo de um corvo-marinho (*Phalacrocorax carbo*) (MH130211) e em esporocistos de águia-rabalva (*Haliaeetus albicilla*) (MF946587). Outros gêneros de *Sarcocystis* de espécies não conhecidas detectadas em falcão-do-tanoeiro (*Accipiter cooperi*) (KY348753), pombo-doméstico (*Columba livia*) (GQ245670) e ganso-europeio (*Anser albifrons*) (EU502869), também foram idênticas à amostra #213.

Em COX1, as 547 pb coincidiam 100% com as espécies de *S. halioti* referidas acima, além de *Sarcocystis corvusi* e *S. columbae* oriundas de aves europeias gralha (*Corvus monedula*) (MH138314) e pombo (*Columba palumbus*) (MH138312). Outras espécies de *Sarcocystis* similares por este marcador foram *Sarcocystis fulicae*, *S. wobeseri*, *Sarcocystis cornixi* e *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter cooperii*, todas com 99,8% de identidade.

Em relação à região ITS1, 842 pb efetivamente sequenciadas correspondiam com isolados de *S. halioti* em 99,2%, diferindo apenas em 7 nucleotídeos e dois gaps (MF946589). Em Lituânia, sequências 18S (JQ733511), 28S (JQ733512) e ITS1 (JQ733512), correspondentes à uma espécie de *Sarcocystis* achada na musculatura do corvo-marinho, foram depositadas no GenBank sob o nome *Sarcocystis* sp. ex *Phalacrocorax carbo*. Anos mais tarde, Gjerde et al. (2018) propuseram o nome *Sarcocystis halioti* para espécie *Sarcocystis* sp. ex *Phalacrocorax carbo* ao ser caracterizados esporocistos em uma águia europeia (*Haliaeetus leucocephalus*) com idênticas sequências em ITS1 (MF946589) e 28S (MF946610).

5.3.2 *Sarcocystis* sp. ex *Coragyps atratus* (#471)

No locus 18S, apesar de ser um gene muito conservado nenhuma sequência foi 100% idêntica à amostra #471. As 717 pb efetivamente sequenciadas revelaram 98,9% de identidade com *Sarcocystis* spp. isolados a partir de esporocistos das espécies gavião-miúdo (*Accipiter striatus*) e falcão-do-tanoeiro (*Accipiter cooperi*) (EU810402) (YABSLEY et al., 2009). Na mesma proporção de identidade foram encontradas as espécies *S. fulicae*, *S. halioti* e as espécies sem nomear *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter cooperi*, *Sarcocystis* sp. ex *Columba livia* e *Sarcocystis* sp. ex *Anser albifrons*.

A sequência COX1, com 547 pb efetivamente sequenciadas compartilha 100% de identidade com *S. lutrae* caracterizado em pequenos mamíferos carnívoros como doninhas (*Mustela putorius*), lontras (*Lutra lutra*), fuinhas (*Martes foina*), texugos (*Meles meles*) e vison-americano (*Neovison vison*) (MG273661), e com *S. lari* is. bainkr1 (MF596283).

As 800 pb efetivamente sequenciadas de fragmento ITS1 de #471, mostraram apenas 90% de similaridade com *S. lari* (MF946599). *S. lari* foi descrita em musculatura de uma espécie de gaivota denominada alcatraz-comum (*Larus marinus*) por Prakas et al. (2014). Sequência parcial do gene 28S (JQ733509) e sequências completas de 18S (JQ733508) e ITS1 (JQ733510) deste agente foram depositadas no GenBank. Anos mais tarde, a

caracterização em esporocistos de águia europeia (*Haliaeetus leucocephalus*) nos marcadores 18S (MF946588), 28S (MF946611) e ITS1 (MF946609) foram idênticos com *S. lari* comprovando seu papel como hospedeiro definitivo (GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018).

Com uso de sequências ITS1 para espécies de *Sarcocystis* onde aves atuam como hospedeiros intermediários, foi possível gerar uma árvore filogenética envolvendo 15 sequências. Dois cladogramas bem suportados foram formados, um contendo *Sarcocystis* spp. onde a maioria dos hospedeiros definitivos conhecidos são aves de rapina, e um segundo clado onde hospedeiros definitivos são pequenos mamíferos carnívoros (Figura 15).

Figura 15. Análise filogenética de *Sarcocystis* spp. de aves silvestres de Brasil com sequências (ITS1)

Fonte: Llano (2019)

Legenda: A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeo de Tamura-3. (●): Sequências obtidas neste estudo. Esta análise envolveu 15 sequências nucleotídicas. Houve um total de 627 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X.

No primeiro grupo conformado por 12 espécies, quase todas têm como hospedeiro definitivo espécies de aves rapinantes europeias (*Accipiter gentilis*, *Accipiter nisus*, *Haliaeetus albicila*), exceto pelas espécies *S. fulicae*, *S.*

corvusi e *S. wobeseri* nas quais ainda não é conhecida essa informação (CERNA; KVASNOVSKA, 1986; OLIAS et al., 2011; MAYR et al., 2016; GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018). No segundo grupo, os hospedeiros definitivos são doninha, raposas e guaxinim (*Mephitis mephitis*, *Vulpes vulpes*, *Alopex lagopus*, *Nyctereutes procyonides*) (CAWTHORN; RAINNIE; WOBESER, 1981; WICHT, 1981; KUTKIENE et al., 2012; PRAKAS et al., 2015; MOREÉ et al., 2016).

As sequências *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter striatus* (#213) e *Sarcocystis* sp. ex *Coragyps atratus* (#471) estão localizadas no primeiro grupo, provavelmente o hospedeiro definitivo dessas espécies seja também aves carnívoras.

Para amostra *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter striatus* (#213) baseado nas análises do modelo evolutivo onde a porcentagem de identidade com 18S e COX1 foi 100% e 99,4% com ITS1, podemos concluir que o gavião-miúdo é um novo hospedeiro intermediário para *S. halioti* e provavelmente o hospedeiro definitivo seja uma ave carnívora.

Para amostra *Sarcocystis* sp. ex *Coragyps atratus* (#471) baseado nas análises do modelo evolutivo onde a porcentagem de identidade com o marcador ITS1 foi apenas 90,7% com *S. lari*, podemos inferir que é uma espécie inédita. Possivelmente estas aves devem adquirir esporocistos diretamente de intestinos de cadáveres e passar a infecção a outras aves pela necrofagia.

No que se refere ao possível hospedeiro definitivo, pouco é conhecido em relação à predação dessas aves por outras.

5.4 Caracterização molecular das amostras positivas para fragmentos de nPCR-ITS1 de 500bp

Duas espécies de coccídeos pertencentes à família Sarcocystidae foram detectados na triagem com nPCR-ITS1 (Tabela 1) para esta dimensão de fragmento.

5.4.1 *Toxoplasma gondii*

Em seis aves, representadas pelas espécies asa-branca (*Patagioenas picazuro*), quiriquirei (*Falco sparverius*), garça-branca (*Egretta thula*) e savacu (*Nycticorax nycticorax*), foi detectado DNA do *Toxoplasma gondii* em 400 aves (1,5%). Os primers utilizados para amplificar a região ITS1 não são exclusivos para o gênero *Sarcocystis* sendo possível detectar outros Sarcocistídeos (SOARES et al., 2011a; ACOSTA et al., 2018). A análise das 411 pb efetivamente sequenciadas dos fragmentos de nPCR-ITS1 em quatro aves revelou 100% de identidade com *T. gondii* (EU025025). Para as outras duas aves, apenas uma substituição do nucleotídeo C-T foi detectada na posição 62 nas amostras #426 e #433, atingindo uma semelhança de 99,76% com *T. gondii*.

Infecções pelo protozoário *Toxoplasma gondii* são cosmopolitas, afetando o maior número de espécies de aves e mamíferos domésticos e selvagens, incluindo ao homem. A principal forma de infecção nas aves é através do consumo de água, alimento ou solo contaminado com oocistos esporulados, eliminados pelos felídeos (GONDIM et al., 2010). Outra forma de infecção, no caso de aves de rapina, é o consumo de bradizoítos ou taquizoítos de *T. gondii* em tecidos das presas (SIBLEY, 2003).

Vários estudos comprovando a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em aves de vida selvagem têm sido realizados em diferentes regiões do Brasil. Em sete estados, foram avaliadas 27 aves, das quais cinco (18,5%) foram positivas ao teste de soro aglutinação (MAT). A lista de espécies positivas inclui: asa-branca (*Patagioenas picazuro*), coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*), curicaca (*Theristicus caudatus*) e seriema (*Cariama cristata*) (VITALIANO, 2012). No nordeste do país, usando a mesma técnica sorológica, 222 aves foram testadas, verificando títulos de anticorpos em apenas três aves, pipira-preta (*Tachyponus rufus*), juriti-gemedeira, (*Leptotila rufaxilla*) e caneleiro-enxofre (*Casiornis fuscus*) (ANDRADE et al., 2016). Também nessa região, três pardais (*P. domesticus*) de 293 analisados por um teste comercial de hemaglutinação indireta, resultaram reagentes para *T. gondii* (GONDIM et al., 2010). Em São Paulo e Pernambuco, foi notificada sorologia positiva nas

aves de rapina, gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), chimango (*Milvago chimango*) e murucututu (*Pulsatrix perspicillata*) (GONÇALVES et al., 2013; SILVA et al., 2018). Um recente estudo no pinguim-de-magalhães (*S. magellanicus*) foi conduzido no litoral do Espírito Santo, de 145 animais avaliados pelo MAT, 18 pinguins (12,4%) resultaram positivos, mas tentativas de isolamento foram malsucedidas (ACOSTA et al., 2018).

No entanto, em aves como avoante (*Zenaida ariculata*), carcará (*Caracara plancus*), corujinha-do-mato (*Magascops choliba*), gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), pica-pau-de-banda-branca (*Dryocopus lineatus*), pica-pau-do-campo (*Colaptes campestris*), quiriquirei (*Falco sparverius*) e tucanuçu (*Ramphastos toco*), foi possível realizar isolados e caracterização genética de *T. gondii*, comprovando a diversidade de genótipos que circulam no Brasil (BARROS et al., 2014; VITALIANO et al., 2014; RÊGO et al., 2018; SILVA et al., 2018).

Neste estudo, uma de treze amostras pertencentes à espécie asa-branca (*Patagioenas picazuro*) foi positiva para *T. gondii*. Excetuando o inquérito sorológico levado a cabo por Vitaliano et al. (2012), nenhum outro estudo tem sido realizado nessa espécie, devido possivelmente ao fato de ser uma ave endêmica do sul do continente e pouco estudada. No entanto, pesquisas de anticorpos em outras Columbiformes de vida livre como pombo-doméstico (*Columba livia*) e avoante (*Zenaida auriculata*) são frequentes no país, com prevalências variando entre 0 a 5% (GODOI et al., 2010; DE LIMA et al., 2011; BARROS et al., 2014).

Segundo Dubey (2002), algumas aves Columbiformes são suscetíveis à infecção podendo ser letal. Mineo et al. (2009) infectaram quatro pombos com diferentes dose de taquizoítos, aquela que recebeu a maior dose morreu 15 dias p.i. Outro estudo, desta vez utilizando doze pombos, apenas um sucumbiu à toxoplasmose 23 dias p.i. (GODOI et al., 2010). A suscetibilidade à infecção por *T. gondii* na espécie asa-branca é desconhecida e conforme seus hábitos alimentares, possivelmente a fonte de infecção seja o contato com alimentos, água ou solo contaminado por oocistos visto esta ser uma espécie que se alimenta de pequenos frutos e sementes.

Ao parecer, não é raro encontrar quiriquiris (*F. sparverius*) infectados com *T. gondii* no Brasil. Neste estudo, em 33% das aves analisadas dessa espécie (2/6), conseguimos amplificar DNA do parasito a partir de músculo peitoral. Silva et al. (2018) detectaram também uma amostra positiva no músculo e coração em um exemplar de vida livre. Alguns autores relatam certa resistência à infecção por *T. gondii* em espécies de Falconiformes. Vitaliano et al. (2010), alimentaram carcarás (*C. plancus*) com camundongos infectados, sem conseguir passar infecção às aves, as quais não apresentaram sinais clínicos e os títulos de anticorpos se mantiveram baixos. Outro experimento com resultados similares, foi realizado no búteo-de-cauda-vermelha (*Buteo jamaicensis*) nos Estados Unidos (LINDSAY; DUBEY; BLAGBURN, 1991). A infecção por *T. gondii* neste tipo de aves deve ser muito facilitada por seus hábitos alimentares. Além de insetos, que podem ser hospedeiros paratênicos, sua dieta é constituída por pequenos roedores e pássaros, que podem ser hospedeiros intermediários do parasito. Além disso servem de presa para corujas e águias, contribuindo assim ao ciclo epidemiológico. O papel de felídeos na predação destas aves é desconhecido.

Em espécies de aves aquáticas pertencentes à Ordem Pelecaniformes, foi detectado DNA de *T. gondii* em garça-branca (*Egretta thula*) (2/2) e em socó-dorminhoco (*Nycticorax nycticorax*) (1/2). Outro estudo no arquipélago Fernando do Noronha, no estado de Pernambuco, constatou-se uma alta porcentagem de anticorpos anti-*T. gondii* na garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*), 79,7% (157/197) apresentaram títulos 1:5 no MAT (COSTA et al., 2012). Infecções neste tipo de aves podem ser um indicativo de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*.

Este estudo confirma que em grandes áreas urbanas como São Paulo e Grande São Paulo, há circulação de *T. gondii* entre aves silvestres. A maior parte dessas espécies de aves são sinantrópicas e estão em contato próximo com animais domésticos e o homem. Determinar qual é a sua participação na cadeia epidemiológica da toxoplasmose, assim como definir a função como bioindicador de contaminação ambiental por oocistos nos diferentes ecossistemas são aspectos que devem continuar sendo estudados.

Este é o primeiro relato de confirmação molecular de *T. gondii* para as espécies de aves garça-branca, socó-dorminhoco e asa-branca no país, indicando sua possível participação como hospedeiros intermediários.

5.4.2 *Atoxoplasma* sp. ex *Icterus jamacaii*

Em uma espécie de Passeriforme, corrução (*Icterus jamacaii*), uma banda de 500 pb aproximadamente, semelhante com *T. gondii*, foi detectada na eletroforese usando o marcador ITS1. Resultados do sequenciamento demonstraram identidade menor de 80% com uma espécie de *Atoxoplasma* isolada no pardal-doméstico norte-americano (AY331573).

Atoxoplasmose tem sido relatada em diversos Passeriformes, porém a taxonomia do agente ainda não é clara. Para alguns autores essa espécie é sinônima com espécies de *Isospora* que realizam parte de seu ciclo a nível extra intestinal (BARTA et al., 2005). Para outros são espécies que devem ser classificadas em gêneros diferentes (ADKESSON; ZDZIARSKI; LITTLE, 2005; SCHRENZEL et al., 2005b). Neste trabalho, decidiu-se adotar *Atoxoplasma* sp. ex *Icterus jamacaii* pelo fato de DNA do parasito ter sido encontrado em estágio extraintestinal (músculo) e porque as maiores identidades encontradas em busca BLAST a partir de sequências ITS1 e 18S (ver abaixo) foram obtidas com comparações com agentes anotados como *Atoxoplasma*.

O corrução (*Icterus jamacaii*) é um Passeriforme da família Icteridae, predominantemente insetívora e frugívora. A sua distribuição é exclusiva do Brasil, desde os estados do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (WIKIAVES, 2019). É das espécies mais apreendidas pelo CETAS/IBAMA no Brasil, seu canto e plumagem colorida torna-las vítimas do tráfico ilegal. A ocorrência de coccidiose pelo gênero *Isospora* tem sido reportada em 14 espécies de Icterídeos (MARQUES et al., 2011), sendo descritas cinco espécies de *Isosporas* morfologicamente diferentes: *I. belicosa*, *I. cacici*, *I. divitis*, *I. graceannae* e *I. icterus* (BERTO et al., 2011). Sequências dessas espécies não foram encontradas no GenBank.

No Centro de Triagem de Animais Silvestres de Belo Horizonte, Brasil, um surto atribuído à espécie *I. icterus* ocasionou a morte de 5 corruções, demonstrando a patogenicidade desse agente em animais resgatados e em reabilitação (MARQUES et al., 2011).

Até o presente momento, sequências ITS1 para *Atoxoplasma* spp. não estão disponíveis no GenBank, exceto aquela produzida em um estudo realizado em pardal-doméstico da América do Norte (*Passer domesticus domesticus*) em que a região 18S-28S foi completamente sequenciada (AY331573) (SCHRENZEL et al., 2005). Ao comparar as 411 pb produzidas com a amostra #498 deste estudo com a região homóloga da sequência acima referida, uma porcentagem de identidade de apenas de 78,5% foi verificada.

Entretanto, foi possível amplificar fragmentos gerados pela nPCR-18S e sequenciar 471 pb deste fragmento. Com a submissão desta sequência à busca BLAST, foram encontradas sequências de organismos anotados como *Isospora* e *Atoxoplasma*. A árvore filogenética obtida por esta busca com as 11 sequências de maior identidade não permitiu identificar a amostra #498 com precisão, pois os ramos internos da reconstrução obtida têm baixos valores de bootstrap, embora o gênero *Eimeria* tenha sido claramente diferenciado dos organismos identificados como *Atoxoplasma* / *isospora* (Figura 16).

A matriz de identidade calculada com o conjunto de dados da árvore da figura 16 mostra que a sequência #498 tem maior similaridade com *Atoxoplasma* sp MS-2003 (AY331571) e *Isospora* sp ex *Myodes glareolus* (MH698574). A análise das 751 pb do locus 18S, demonstrou 99,87% de semelhança com uma espécie de *Isospora* isolado a partir de fezes de uma ratazana amplamente distribuída na Europa (*Myodes glareolus*), diferindo apenas por um nucleotídeo (C-T, na posição 526) usando como referência a sequência MH698574. Entretanto, os autores desse trabalho confirmaram que este teria sido um caso de pseudoparasitismo originado pelo consumo de uma ave infectada com essa espécie de Sarcocystídeo. Roedores foram infectados experimentalmente com oocistos esporulados de *Isospora* sem obter sucesso na infecção (TREFANCOVÁ; MÁCOVÁ; KVIČEROVÁ, 2019). A amostra #498 também difere em um nucleotídeo apenas da amostra AY331571.

Não foi possível obter uma inferência filogenética mais consistente, devido à falta de informação genética de outros loci que permitiriam construir uma história evolutiva com mais acurácia. Outros genes como o gene mitocondrial citocromo oxidase I (COX1) e o locus ITS1 são essenciais para o melhor posicionamento filogenético desta amostra e por isso são muito empregados em filogenias de coccídeos.

Esse é o relato de uma provável nova espécie de *Atoxoplasma*/*Isospora* em aves. Futuros estudos utilizando metodologias que combinem análises morfológicas, morfométricas, epidemiológicas e moleculares são necessários para melhor caracterizar estes organismos.

Figura 16. Análise filogenética de *Atoxoplasma* sp. ex *Icterus jamacaii* de um corrução de Brasil com sequências (18S rDNA)

Fonte: Llano (2019)

Legenda: A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeos Jukes-Cantor (●): Sequências obtidas neste estudo. Esta análise envolveu 14 sequências nucleotídicas. Houve um total de 739 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitem concluir:

- Pela primeira vez na literatura foi detectado molecularmente a espécie *S. falcatula* em asa-branca, avoante, corujinha-de-mato, gavião-asa-de-telha, gavião-carijó, juriti-gemeadeira, maritaca-verde, papagaio-verdadeiro, periquito-verde, pica-pau-de-cabeça-amarela, pica-pau-de-cabeça-branca, tucano-de-bico-verde e pitiguari.
- Foi comprovada uma ampla diversidade genética de *S. falcatula* em aves silvestres de Brasil, em 19 amostras 12 haplótipos foram identificados. Essa alta diversidade genética poderia estar associada à disponibilidade de múltiplas variantes genéticas produzidas por eventos de recombinação sexual no hospedeiro definitivo.
- Genótipos de *S. falcatula* não são exclusivos de uma espécie de ave.
- Antes deste estudo, hospedeiros intermediários para *S. falcatula* estavam limitados a aves pertencentes às Ordens: Psittaciformes, Passeriformes, Columbiformes, Strigiformes e Accipitriformes. A detecção molecular em pica-paus e tucanos, e visualização de cistos na última espécie, confirma que aves pertencentes à Ordem Piciformes podem ser hospedeiros intermediários de *S. falcatula*.
- Baseado na visualização macro e microscópica de cistos na musculatura de aves e a sua respectiva caracterização molecular usando os marcadores 18S rDNA, COX1, ITS1, SAG2, SAG3 e SAG4, uma nova espécie de *Sarcocystis* relacionada às já conhecidas espécies cujo hospedeiro definitivo são didelfídeos, foi descrita parasitando as aves guaxe, tié-preto, tié-sangue e araçari-banana. Futuros estudos ultraestruturais e epidemiológicos são necessários para descrever o ciclo de vida completo de *Sarcocystis* sp. ex *Cacicus haemorrhous*.
- Uma espécie inédita nomeada neste estudo como *Sarcocystis* sp. ex *Guira guira* foi detectada em anu-branco.

- A comparação das sequências produzidas neste estudo com espécies de *Sarcocystis* que utilizam aves como hospedeiros intermediários, demonstraram que variações nos loci 18S e COX1 são insuficientes para detectar diferenças entre espécies. Divergências notáveis que permitem essa distinção interespecies foram verificadas no marcador ITS1.
- Pela primeira vez em América foi reportada *Sarcocystis halioti* na espécie gavião-miúdo.
- Uma espécie inédita nomeada neste estudo como *Sarcocystis* sp. ex *Coragyps atratus* foi detectada em urubu-de-cabeça-preta.
- Pela primeira vez na literatura foi detectado molecularmente *Toxoplasma gondii* em garça-branca, socó-dorminhoco e asa-branca.
- Uma espécie inédita nomeada neste estudo como *Atoxoplasma* sp. ex *Icterus jamacaii* foi detectada em corrupção.
- Nossos dados mostraram o potencial dos primers 18S e ITS1 para detectar Sarcocystídeos diferentes a *S. falcatula* e *S. neurona*, abrindo possibilidades para que novas pesquisas sejam realizadas em outras espécies de coccídios em aves.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. C. L. et al. Occurrence of tissue cyst forming coccidia in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) rescued on the coast of Brazil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0209007, 18 dez. 2018. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0209007>>.
- ADKESSON, M. J.; ZDZIARSKI, J. M.; LITTLE, S. E. Atoxoplasmosis in Tanagers. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 2, p. 265–272, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1638/03-091.1>>.
- ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 3, p. 417–434, 2003.
- ANDERY, D. de A. et al. Health assessment of raptors in triage in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 15, n. 3, p. 247–256, set. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2013000300012&lng=en&tlng=en>.
- ANDRADE, L. H. M. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em aves silvestres de três Unidades de Conservação Federais da Paraíba e da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 103–107, fev. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2016000200103&lng=pt&tlng=pt>.
- ARKUSH, K. D. et al. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1087–1097, set. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751903001814>>.
- BARBOSA, L. et al. A novel *Sarcocystis neurona* genotype XIII is associated

with severe encephalitis in an unexpectedly broad range of marine mammals from the northeastern Pacific Ocean. **International Journal for Parasitology**, 2015.

BARROS, L. D. de et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaida auriculata*) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 443–448, dez. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612014000400443&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 15 jul. 2019.

BARTA, J. R. et al. The Genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a Junior Objective Synonym of the Genus *Isospora* (Schneider 1881) Species Infecting Birds and Resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the Correct Genus for *Isospora* Species Infecting Mammals. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 726–727, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-3341.1>>.

BERTO, B. P. et al. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 159–204, 15 nov. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11230-011-9317-8>>.

BOX, E. D. *Atoxoplasma* Associated with an Isosporan Oocyst in Canaries. **The Journal of Protozoology**, v. 17, n. 3, p. 391–396, ago. 1970. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.1970.tb04700.x>>.

BOX, E. D. *Isospora* as an Extraintestinal Parasite of Passerine Birds¹. **The Journal of Protozoology**, v. 28, n. 2, p. 244–246, maio 1981. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.1981.tb02842.x>>.

BOX, E. D.; DUSZYNSKI, D. W. Experimental transmission of *Sarcocystis* from icterid birds to sparrows and canaries by sporocysts from the opossum. **J Parasitol**, v. 64, n. 4, p. 682–688, 1978. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=98622>.

BOX, E. D.; SMITH, J. H. The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis*

species of birds. **The Journal of parasitology**, v. 68, n. 4, p. 668–673, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6811715>>.

BOX, E.; MEIER, J.; SMITH, J. Description of *Sarcocystis falcatula* Stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 521–524, 1984. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.1984.tb05495.x/full>>. Acesso em: 9 jul. 2017.

CAWTHORN, R. J.; RAINNIE, D.; WOBESER, G. Experimental transmission of *Sarcocystis* sp. (Protozoa: Sarcocystidae) between the shoveler (*Anas clypeata*) duck and the striped skunk (*Mephitis mephitis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, n. 3, p. 389–394, jul. 1981. Disponível em: <<http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-17.3.389>>.

CERNA, Z.; KVASNOVSKA, Z. Life-cycle involving bird-bird relation in *Sarcocystis*-coccidia with the description of *Sarcocystis accipitris* sp. n. **Folia Parasitologica**, v. 33, p. 305–309, 1986. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/LIFE-CYCLE-INVOLVING-BIRD-BIRD-RELATION-IN-WITH-THE-Kvasnovska/98240ffcb2cc813569031026e861154474c577b5>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

CESAR, M. O. et al. Multilocus characterization of *Sarcocystis falcatula* - related organisms isolated in Brazil supports genetic admixture of high diverse SAG alleles among the isolates. **Experimental Parasitology**, v. 188, p. 42–49, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489417305295>>.

CLUBB, S. L. et al. **An acute fatal illness in old world psittacine birds associated with *Sarcocystis falcatula* of opossums** *Ann. Proc. Assoc. Avian Vet*, 1986. . Disponível em: <<https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&q=An+acute+fatal+illness+in+old+world+Pssitacine+birds+associated+with+Sarcocystis+falcatula+of+opossums&btnG=&lr=>>>. Acesso em: 6 ago. 2017.

CLUBB, S. L. et al. *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease in psittacine birds. **J Parasitol**, v. 78, n. 1, p. 116–124, fev. 1992. Disponível em:

<<http://www.jstor.org/stable/3283697?origin=crossref>>. Acesso em: 4 jun. 2017.

CONTI, J. A.; FORRESTER, D. J. Interrelationships of parasites of white-winged doves and mourning doves in Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, n. 4, p. 529–536, out. 1981. Disponível em:

<<http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-17.4.529>>.

COSTA, D. G. C. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Domestic and Wild Animals From the Fernando de Noronha, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 679–680, jun. 2012. Disponível em:

<<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-2910.1>>.

CRAWLEY, R. R.; ERNST, J. V.; MILTON, J. L. *Sarcocystis* in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 18, n. 2, p. 253–255, 1982. Disponível em:

<<https://www.jwildlifedis.org/doi/pdf/10.7589/0090-3558-18.2.253>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

CROWDUS, C. A. et al. SnSAG5 is an alternative surface antigen of *Sarcocystis neurona* strains that is mutually exclusive to SnSAG1.

Veterinary Parasitology, 2008.

CUSHING, T. L. L. et al. Characterization of the host response in systemic isosporosis (atoxoplasmosis) in a colony of captive american goldfinches (*Spinus tristis*) and house sparrows (*Passer domesticus*). **Veterinary Pathology**, 2011.

DAME, J. B. et al. *Sarcocystis falcatula* from Passerine and Psittacine Birds: Synonymy with *Sarcocystis neurona*, Agent of Equine Protozoal Myeloencephalitis. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 930, 2006.

DOHLEN, A. R. von et al. Prevalence of *Sarcocysts* in the Muscles of Raptors from a Rehabilitation Center in North Carolina. **Journal of Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 11, 22 jan. 2019. Disponível em:

<<https://bioone.org/journals/journal-of-parasitology/volume-105/issue-1/18-139/Prevalence-of-Sarcocysts-in-the-Muscles-of-Raptors-from-a/10.1645/18-139.full>>.

DONELEY, R. J. T. **Bacterial and Parasitic Diseases of Parrots** *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 2009.

DUBEY, J. et al. Morphologic and genetic characterization of *Sarcocystis* sp. from the African grey parrot, *Psittacus erithacus*, from Costa Rica. **Acta Parasitologica**, v. 51, n. 3, 1 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/ap.2006.51.issue-3/s11686-006-0026-4/s11686-006-0026-4.xml>>.

DUBEY, J. et al. **Sarcocystosis of animals and humans**. Second Edition. CRC Press; 2015. 491 p. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781498710152>

DUBEY, J.; LINDSAY, D.; REZENDE, P. Characterization of an Unidentified *Sarcocystis falcatula*-like Parasite from the South American Opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 538–544, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00087.x/full>>. Acesso em: 4 jun. 2017.

DUBEY, J. P. et al. Isolation of *Sarcocystis falcatula* from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 239–244, out. 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401799001454>>. Acesso em: 9 jul. 2017.

DUBEY, J. P. et al. The South American opossum, *Didelphis marsupialis*, from Brazil as another definitive host for *Sarcocystis speerii*. **Parasitology**, v. 121 Pt 6, p. 589–594, 2000a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11155929>>.

DUBEY, J. P. et al. Characterization of *Sarcocystis falcatula* Isolates from the Argentinian Opossum, *Didelphis albiventris*. **The Journal of Eukaryotic**

Microbiology, v. 47, n. 3, p. 260–263, 2 maio 2000b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00045.x>>. Acesso em: 9 jul. 2017.

DUBEY, J. P. et al. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2–4, p. 295–304, 2001a.

DUBEY, J. P. et al. Isolates of *Sarcocystis falcatula*-Like Organisms From South American Opossums *Didelphis Marsupialis* and *Didelphis Albiventris* From São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1449–1453, 2001b. Disponível em: <[http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1449:IOSFLO\]2.0.CO;2](http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/0022-3395(2001)087[1449:IOSFLO]2.0.CO;2)>.

DUBEY, J. P. et al. Acute *Sarcocystis falcatula*-like Infection in a Carmine Bee-Eater (*Merops nubicus*) and Immunohistochemical Cross Reactivity between *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 824–832, ago. 2001c. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/3285142?origin=crossref>>.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121–53, 3 jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031816>>.

DUBEY, J. P. et al. Molecular Phylogeny implicates new world opossums (Didelphidae) as the definitive hosts of *Sarcocystis ramphastosi*, a parasite of the keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*). **Acta Protozoologica**, v. 47, p. 55–61, 2008.

DUBEY, J. P. et al. **Sarcocystosis of Animals and Humans**. Second Edition. CRC Press, 2015b. p. 491. ISBN 9780429183188

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. Second Edition. CRC Press; 2010. p. 313. ISBN 978-1-4200-9236-3 (Hardback)

DUBEY, J. P.; FELIX, T. A.; KWOK, O. C. H. Serological and Parasitological Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Wild Birds From Colorado. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 5, p. 937–939, out. 2010. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-2501.1>>.

DUBEY, J. P.; LANE, E.; WILPE, E. V. *Sarcocystis ramphastosi* sp.nov. and *sarcocystis sulfuratusi* sp.nov. (Apicomplexa, sarcocystidae) from the keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*). **Acta Parasitologica**, v. 49, n. 2, p. 93–101, 2004.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. *Sarcocystis speeri* n.sp. (Protozoa : Sarcocystidae) from the opossum (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 903–909, 1999.

DUBEY, J. P.; ROSENTHAL, B. M.; FELIX, T. A. Morphologic and Molecular Characterization of the *Sarcocysts* of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the Mallard Duck (*Anas platyrhynchos*). **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 765–770, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-2413.1>>.

DUBEY, J. P.; ROSENTHAL, B. M.; SPEER, C. a. *Sarcocystis lindsayii* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 48, n. 5, p. 595–603, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11596925>>.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1989.

DUSZYNSKI, D. W.; BOX, E. The Opossum (*Didelphis virginiana*) as a Host for *Sarcocystis debonei* from Cowbirds (*Molothrus ater*) and Grackles (*Cassidix mexicanus* , *Quiscalus quiscula*). Published by : Allen Press on behalf of T. **Journal of Parasitology**, v. 64, n. 2, p. 326–329, 1978.

DYOMIN, A. et al. Evolution of ribosomal internal transcribed spacers in Deuterostomia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 116, p. 87–96, nov. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790317306371>>.

ECCO, R. et al. An Outbreak of Sarcocystosis in Psittacines and a Pigeon in a Zoological Collection in Brazil. **Avian Diseases**, v. 52, n. 4, p. 706–710, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1637/8303-040408-Case.1>>.

EL-MORSEY, A. et al. *Sarcocystis chloropusae* (protozoa: Sarcocystidae) n. sp. from the common moorhen (*Gallinula chloropus*) from Egypt.

Parasitology, v. 142, n. 8, p. 1063–1065, 31 jul. 2015. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182015000293/type/journal_article>. Acesso em: 3 set. 2019.

FENGER, C. K. et al. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 916–919, 1995.

FERROGLIO, E.; TRISCIUOGLIO, A. Neosporosis in wild animals.

Parassitologia, v. 46, p. 269, 2004.

FLAMMER, K.; HURLBERT, S. A. B.; WHITT, D. A. Atoxoplasmosis in canaries. **AFA Watchbird**, v. August/Sep, p. 24–26, 1989.

GALLO, S. S. M. et al. Identification of opossums *Didelphis aurita* (Wied-Neuweid, 1826) as a definitive host of *Sarcocystis falcatula*-like sporocysts.

Parasitology Research, v. 117, n. 1, p. 213–223, 1 jan. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-017-5695-4>>.

GARNHAM, P. C. C. Blood parasites of East African vertebrates, with a brief description of exo-erythrocytic schizogony in *Plasmodium pitmani*.

Parasitology, v. 40, n. 3–4, p. 328–337, 6 out. 1950. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182000018205/type/journal_article>.

GJERDE, B. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 7, p. 579–591, jun. 2013. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751913000878>>.

GJERDE, B. Molecular characterisation of *Sarcocystis rileyi* from a common eider (*Somateria mollissima*) in Norway. **Parasitology research**, v. 113, n. 9, p. 3501–3509, 2014.

GJERDE, B.; VIKØREN, T.; HAMNES, I. S. Molecular identification of *Sarcocystis halioti* n. sp., *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the

intestine of a white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Norway.

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2018.

GODOI, F. S. L. de et al. *Toxoplasma gondii*: diagnosis of experimental and natural infection in pigeons (*Columba livia*) by serological, biological and molecular techniques. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 237–243, dez. 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612010000400009&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 16 jul. 2019.

GODOY, S. N. et al. Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in Captive Psittacine Birds in Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 1, p. 18–23, 6 maio 2009. Disponível em:

<<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1647/2008-006R.1>>. Acesso em: 6 ago. 2017.

GONÇALVES, G. A. et al. Avaliação sorológica de Parainfluenzavirus Tipo 1, *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp. e *Toxoplasma gondii* em aves silvestres. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 473–480, 17 dez. 2013. Disponível em:

<<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/16576>>.

GONDIM, L. S. Q. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 168, n. 1–2, p. 121–4, 26 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709006232>>. Acesso em: 3 dez. 2014.

GONDIM, L. S. Q. et al. *Sarcocystis neurona* and *Neospora caninum* in Brazilian opossums (*Didelphis* spp.): Molecular investigation and in vitro isolation of *Sarcocystis* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 192–198, 2017. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401717303011>>. Acesso em: 9 jul. 2017.

GREINER, E. C. *Isospora*, *Atoxoplasma*, and *Sarcocystis*. In: **Parasitic**

Diseases of Wild Birds. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009. p. 108–119.

GRIMWOOD, J.; SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: The role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 169–173, fev. 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0020751995001034>>.

HILLYER, E. V. E. et al. An Outbreak of Sarcocystis in a Collection of Psittacines. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 4, p. 434–445, 1991. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/20095186?casa_token=Sjft1JjYp6UAAAAA:jui8mA1eZjPKOP9Z12DWG5llpRBIBUsmXzAlhfTc1D6UPUU2slxR_4RM99UAT32EUtHyzoEnEU4HPEnuyBc_ykL8aRJdAqP9abD8XBgZCUvSO-pePC_35w>. Acesso em: 6 ago. 2017.

HOANE, J. S. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Equine Antibodies Specific to *Sarcocystis neurona* Surface Antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, n. 9, p. 1050–1056, 2005.

HODO, C. L. et al. Histopathologic and Molecular Characterization of *Sarcocystis calchasi* Encephalitis in White-winged Doves (*Zenaida asiatica*) and Eurasian Collared Doves (*Streptopelia decaocto*), East-central Texas, USA, 2010–13. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, n. 2, p. 395–399, 28 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/10.7589/2015-10-292>>.

HOWE, D. K. et al. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5322–5328, 1998.

HOWE, D. K. et al. Sarcocystis neurona merozoites express a family of immunogenic surface antigens that are orthologues of the *Toxoplasma gondii* surface antigens (SAGs) and SAG-related sequences. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1023–1033, 2005.

IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019.2.** Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>.

- JUNG, C.; LEE, C. Y. F.; GRIGG, M. E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 285–296, mar. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751903003667>>.
- KHAN, R. A.; DESSER, S. S. Avian *Lankesterella* infections in Algonquin Park, Ontario. **Canadian Journal of Zoology**, v. 49, n. 8, p. 1105–1110, ago. 1971. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/z71-171>>.
- KIM, S.-K.; BOOTHROYD, J. C. Stage-Specific Expression of Surface Antigens by *Toxoplasma gondii* as a Mechanism to Facilitate Parasite Persistence. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 8038–8048, 15 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.174.12.8038>>.
- KONELL, A. L. et al. Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 2, p. 221–228, abr. 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612019000200221&tlng=en>.
- KONRADT, G. et al. Necrotizing meningoencephalitis caused by *Sarcocystis falcatula* in bare-faced ibis (*Phimosus infuscatus*). **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 809–812, 3 fev. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-016-5341-6>>. Acesso em: 6 ago. 2017.
- KRONE, O.; RUDOLPH, M.; JAKOB, W. Protozoa in the Breast Muscle of Raptors in Germany. **Acta Protozoologica**, v. 39, p. 35–42, 2000. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/232725092>>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547–1549, 2018.

KUTKIENE, L. et al. The mallard duck (*Anas platyrhynchos*) as intermediate host for *Sarcocystis wobeseri* sp. nov. from the barnacle goose (*Branta leucopsis*). **Parasitology Research**, v. 107, n. 4, p. 879–888, 2010.

KUTKIENE, L. et al. Description of *Sarcocystis anasi* sp. nov. and *Sarcocystis albifronsi* sp. nov. in birds of the order Anseriformes. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 1043–1046, 2012a.

KUTKIENE, L. et al. Description of *Sarcocystis turdusi* sp. nov. from the common blackbird (*Turdus merula*). **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1438–1443, 20 set. 2012b. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182012000819/type/journal_article.

KUTKIENĖ, L. et al. *Sarcocystis* in the birds family Corvidae with description of *Sarcocystis cornixi* sp. nov. from the hooded crow (*Corvus cornix*). **Parasitology Research**, v. 104, n. 2, p. 329–336, 15 jan. 2009. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-008-1196-9>.

LAINSON, R. *Atoxoplasma* Garnham, 1950, as a synonym for *Lankesterella* Labbé, 1899. Its life cycle in the English sparrow (*Passer domesticus domesticus*, Linn.). **The Journal of Protozoology**, v. 6, n. 4, p. 360–371, nov. 1959. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.1959.tb04385.x>.

LANKESTER, E. Memoirs: On Drepanidium Ranarum, the Cell-Parasite of the Frog's Blood and Spleen (Gaule's Würmschen). **Journal of Cell Science**, v. 2, n. 85, p. 53–65, 1882. Disponível em: <http://jcs.biologists.org/content/s2-22/85/53.abstract>. Acesso em: 2 jul. 2017.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. PopART : full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, set. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/2041-210X.12410>.

LEKUTIS, C. et al. **Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: Variations on a theme** **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1285–

1292, out. 2001. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751901002612>>.

LEVINE, N. D. The Genus *Atoxoplasma* (Protozoa, Apicomplexa). **The Journal of Parasitology**, v. 68, n. 4, p. 719, ago. 1982. Disponível em:

<<https://www.jstor.org/stable/3280933?origin=crossref>>.

LI, Q.-Q. et al. A PCR-Based RFLP Analysis of *Sarcocystis cruzi* (Protozoa: Sarcocystidae) in Yunnan Province, PR China, Reveals the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) as a Natural Intermediate Host. **The Journal of**

Parasitology, v. 88, n. 6, p. 1259–1261, 2002. Disponível em:

<[http://www.journalofparasitology.org/doi/abs/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1259:APBRAO\]2.0.CO;2](http://www.journalofparasitology.org/doi/abs/10.1645/0022-3395(2002)088[1259:APBRAO]2.0.CO;2)>. Acesso em: 29 maio. 2019.

LIMA, V. Y. et al. *Chlamydophila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo State, Brazil. **Veterinary**

Parasitology, v. 175, n. 1–2, p. 9–14, jan. 2011. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401710005534>>.

LINDSAY, D. S. et al. Removal of *Toxoplasma gondii* Oocysts from Sea Water by Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, p. 197s–198s, jun. 2001. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00517.x>>. Acesso em: 16 ago. 2019.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of encysted apicomplexans in muscles of raptors. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 4, p. 341–344, jan. 1999. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401798002283>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. *Toxoplasma gondii* Infections in Red-Tailed Hawks Inoculated Orally with Tissue Cysts. **The Journal of Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 322, abr. 1991. Disponível em:

<<https://www.jstor.org/stable/3283107?origin=crossref>>.

MANSFIELD, L. S. et al. Brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. **Veterinary**

Parasitology, v. 153, n. 1–2, p. 24–43, 2008.

MARQUES, M. V. R. et al. Fatal Coccidiosis by *Isospora icterus* (Upton & Whitaker, 2000) in Captive Campo Troupial (*Icterus jamaicae*) in Brazil . **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, , v. 42, n. 4, p. 735–737, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1638/2010-0229.1>>.

MARSH, a E. et al. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS-1, from *Sarcocystis falcatula* isolates and *Sarcocystis neurona*. **The Journal of parasitology**, v. 85, n. 4, p. 750–7, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461964>>.

MAYR, S. L. et al. Accipiter hawks (Accipitridae) confirmed as definitive hosts of *Sarcocystis turdusi*, *Sarcocystis cornixi* and *Sarcocystis* sp. ex *Phalacrocorax carbo*. **Parasitology Research**, v. 115, n. 8, p. 3041–3047, 2016.

MCCORMICK-RANTZE, M.; LATIMER, K.; WILSON, G. Sarcocystosis in Psittacine birds. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 27, p. 1–7, 2003.

MCNAMEE, P.; PENNYCOTT, T.; MCCONNELL, S. Clinical and pathological changes associated with *Atoxoplasma* in a captive bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*). **Veterinary Record**, v. 136, n. 9, p. 221–222, 4 mar. 1995. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.136.9.221>>.

MIESCHER, F. Über eigenthümliche Schläuche in den Muskeln einer Hausmaus. **Bericht Verhandl Naturforsch Gesell Basel**, v. 5, p. 198–202, 1843. Disponível em: <<https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&q=Miescher%2C+F.%2C+1843.+Über+eigenthümliche+Schläuche+in+den+Muskeln+einer+Hausmaus.+Bericht+der+Verhandlungen+der+Naturforschenden+Gesellschaft+5%2C+198–202.&btnG=&lr=>>>. Acesso em: 2 jul. 2017.

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to Host Cells Involves Major Surface Protein, SAG-1 (P-30). **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 1, p. 11–20, ago. 1994. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001448948471054X>>.

MINEO, T. W. P. et al. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2, p. 149–153, fev. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401708005499>>.

MONTEIRO, R. M. et al. Extensively variable surface antigens of *Sarcocystis* spp. infecting Brazilian marsupials in the genus *Didelphis* occur in myriad allelic combinations, suggesting sexual recombination has aided their diversification. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 1–2, p. 64–70, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401713000447>>. Acesso em: 4 jun. 2017.

MORÉ, G. et al. Molecular identification of *Sarcocystis* spp. in foxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Germany. **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 9–14, abr. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401716300292>>.

NEILL, P. J.; SMITH, J. H.; BOX, E. D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). IV. Ultrastructure of developing, mature and degenerating sarcocysts. **The Journal of protozoology**, v. 36, n. 4, p. 430–7, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2504912>>. Acesso em: 6 ago. 2017.

ODENING, K. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). **Systematic Parasitology**, v. 41, n. 3, p. 209–233, 1998.

OLIAS, P. et al. A novel *Sarcocystis*-associated encephalitis and myositis in racing pigeons. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 38, n. 2, p. 121–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322710>>.

OLIAS, P. et al. *Sarcocystis calchasi* sp. nov. of the domestic pigeon (*Columba livia f. domestica*) and the Northern goshawk (*Accipiter gentilis*): Light and electron microscopical characteristics. **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 577–585, 2010a.

OLIAS, P. et al. *Sarcocystis calchasi* is distinct to *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis* sp. from the sparrowhawk (*Accipiter nisus*). **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 1–2, p. 7–14, jul. 2010b. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401710001780>>.

OLIAS, P. et al. High prevalence of *Sarcocystis calchasi* sporocysts in European Accipiter hawks. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 230–236, 2011.

OLIAS, P. et al. *Sarcocystis calchasi* has an expanded host range and induces neurological disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and North American rock pigeons (*Columbia livia f. dom.*). **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1–2, p. 59–65, 2014.

OLSON, E. J.; WU, A.; DUBEY, J. P. *Sarcocystis* sp.-associated meningoencephalitis in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) Erik J. Olson, 1 Arno Wu " nschmann, J. P. Dubey. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 568, n. 5, p. 564–568, 2007. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870701900519>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

PAGE, C. D. et al. Antemortem Diagnosis and Treatment of Sarcocystosis in 2 Species of Psittacines. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, n. 1, p. 77–85, 1992. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/20460272?seq=1#page_scan_tab_contents>.

PARMENTIER, S. L. et al. High prevalence of *Sarcocystis calchasi* in racing pigeon flocks in Germany. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215241, 15 abr. 2019. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0215241>>.

PARTINGTON, C. J. et al. Atoxoplasmosis in Bali Mynahs (*Leucopsar rothschildi*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 20, p. 328–335, 1989.

PORTER, R. A. et al. Evaluation of the shedding of *Sarcocystis falcatula* sporocysts in experimentally infected Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2–4, p. 313–319, fev. 2001.

Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401700003976>>.

PRAKAS, P. et al. *Sarcocystis* sp. from the herring gull (*Larus argentatus*) identity to *Sarcocystis wobeseri* based on cyst morphology and DNA results. **Parasitology research**, v. 109, n. 6, p. 1603–1608, 2011a. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/FR0L3181221T2531.pdf>>. Acesso em: 6 jul. 2017.

PRAKAS, P. et al. Identification of *Sarcocystis columbae* in wood pigeons (*Columba palumbus*) in Lithuania. **Veterinarija ir Zootechnika**, v. 55, n. 77, p. 33–39, 2011b. Disponível em: <<https://vetzoo.lsmuni.lt/data/vols/2011/55/pdf/prakas.pdf>>. Acesso em: 3 set. 2019.

PRAKAS, P. et al. Molecular and morphological investigations of *Sarcocystis corvusi* sp. nov. from the jackdaw (*Corvus monedula*). **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1163–1167, 28 mar. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-012-3247-5>>.

PRAKAS, P. et al. Description of *Sarcocystis lari* sp. n. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the great black-backed gull, *Larus marinus* (Charadriiformes: Laridae), on the basis of cyst morphology and molecular data. **Folia Parasitologica**, v. 61, n. 1, p. 11–17, 11 jan. 2014. Disponível em: <<http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2014.001.html>>.

PRAKAS, P. et al. Molecular identification of *Sarcocystis rileyi* sporocysts in red foxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Lithuania. **Parasitology Research**, v. 114, n. 5, p. 1671–1676, 7 maio 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4348-8>>.

PRAKAS, P. et al. Morphological and genetic characterisation of *Sarcocystis halioti* from the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*). **Parasitology Research**, v. 117, n. 11, p. 3663–3667, 18 nov. 2018a. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-018-6083-4>>

PRAKAS, P. et al. Morphologic and genetic identification of *Sarcocystis fulicae* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the eurasian coot (*Fulica*

atra). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 4, p. 765–771, out. 2018b.

Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/10.7589/2017-11-279>>.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **EKOLOGIJA**, v. 58, n. 1, p. 45–58, 2012.

PRASAD, P. K. et al. PCR-based determination of internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA of giant intestinal fluke, *Fasciolopsis buski* (Lankester, 1857) Looss, 1899. **Parasitology Research**, v. 101, n. 6, p. 1581–1587, 2 out. 2007. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s00436-007-0680-y>>.

QUIROGA, M. I. et al. Diagnosis of Atoxoplasmosis in a Canary (*Serinus canarius*) by Histopathologic and Ultrastructural Examination. **Avian Diseases**, v. 44, n. 2, p. 465, abr. 2000. Disponível em:

<<https://www.jstor.org/stable/1592564?origin=crossref>>.

RÊGO, W. M. F. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates obtained from free-living wild birds rescued in Southeastern Brazil.

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v. 7, n. 3, p. 432–438, dez. 2018. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221322441830083X>>.

RIMOLDI, G. et al. An outbreak of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in multiple psittacine species within an enclosed zoological aviary. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 6, p. 775–781, 30 nov. 2013.

Disponível em:

<<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638713502981>>.

RÖHL, A.; BANDELT, H. J.; FORSTER, P. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.

SAEIJ, J. P. J.; ARRIZABALAGA, G.; BOOTHROYD, J. C. A cluster of four surface antigen genes specifically expressed in bradyzoites, SAG2CDXY, plays an important role in *Toxoplasma gondii* persistence. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2402–2410, 1 jun. 2008. Disponível em:

<<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01494-07>>.

SCHRENZEL, M. D. et al. Molecular characterization of Isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. **The Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 635–647, 2005. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-3310>>.

SIBLEY, L. D. Recent origins among ancient parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 185–198, jul. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401703002061>>. Acesso em: 13 jul. 2019.

SIEGAL-WILLOTT, J. L. et al. Encephalitis Caused by *Sarcocystis falcatula*-like Organisms in a White Cockatoo (*Cacatua alba*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 19, n. 1, p. 19–24, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1647/2004-005>>.

SILVA, M. A. et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from free-ranging and captive birds and mammals in Pernambuco state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 481–487, 30 ago. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612018000400481&lng=en&tIng=en>.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688–688, abr. 1949. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/163688a0>>.

ŠLAPETA, J. R. et al. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: Differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **Veterinary Journal**, v. 163, n. 2, p. 147–154, 2002. Disponível em: <doi:10.1053/tvjl.2001.0599>.

SMITH, J. H. et al. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* in the budgerigar. II. Pulmonary pathology. **Lab Invest**, v. 56, n. 1, p. 72–84, jan. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3099084>>. Acesso em: 6 ago. 2017.

SMITH, P. White-eared opossum *Didelphis albiventris*. **Fauna Paraguay Handbook of the Mammals of Paraguay**, p. 1–19, 2007.

SOARES, R. M. et al. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1–2, p. 168–172, 2011a.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710005200>>.

Acesso em: 15 maio. 2017.

SOARES, R. M. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1–2, p. 29–34, maio 2011b. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401711000069>>.

STABENOW, C. da S. et al. *Didelphis aurita* (Marsupialia: Didelphidae): a new host for *Sarcocystis lindsayi* (Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of parasitology**, v. 98, n. 6, p. 1262–5, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-3140.1>>. Acesso em: 16 jul. 2017.

SUEDMEYER, W. K. et al. Acute pulmonary *Sarcocystis falcatula*-like infection in three Victoria crowned pigeons (*Goura victoria*) housed indoors. **Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, v. 32, n. 2, p. 252–6, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12790430>>.

TREFANCOVÁ, A.; MÁCOVÁ, A.; KVIČEROVÁ, J. Isosporan Oocysts in the Faeces of Bank Voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): Real Parasites, or Pseudoparasites? *Protist*, v. 170, n. 1, p. 104–120, fev. 2019. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1434461018301093>>.

Acesso em: 21 jul. 2019.

TRUPKIEWICZ, J. G. et al. Acute, fatal *Sarcocystis calchasi* -associated hepatitis in Roller pigeons (*Columba livia f. dom.*) at Philadelphia Zoo. **Veterinary Parasitology**, v. 216, p. 52–58, jan. 2016. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401715300753>>.

VALADAS, S. Y. O. B. et al. Diversity of *Sarcocystis* spp shed by opossums

in Brazil inferred with phylogenetic analysis of DNA coding ITS1, cytochrome B, and surface antigens. **Experimental Parasitology**, v. 164, p. 71–78, 2016. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489416300224>>.

Acesso em: 4 jun. 2017.

VERMA, S. K. et al. Molecularly Confirmed Acute, Fatal *Sarcocystis falcatula* Infection in the Rainbow Lorikeets (*Trichoglossus moluccanus*) at the Philadelphia Zoo. **Journal of Parasitology**, v. 104, n. 6, p. 710–712, dez. 2018. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/10.1645/18-78>>.

VIENNE, D. M. Lifemap: Exploring the Entire Tree of Life. **PLoS biology**, v. 14, n. 12, p. e2001624, 22 dez. 2016. Disponível em:

<<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.2001624>>.

VILLAR, D. et al. Clinical Presentation and Pathology of Sarcocystosis in Psittaciform Birds: 11 Cases. **Avian Diseases**, v. 52, n. 1, p. 187–194, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1637/8104-090207-Case>>.

VITALIANO, S. N. et al. Experimental infection of Crested Caracara (*Caracara plancus*) with *Toxoplasma gondii* simulating natural conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 1–2, p. 71–75, ago. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401710002293>>.

VITALIANO, S. N. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil**. 2012. Universidade de São Paulo, 2012. Disponível em:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-04102012-182312/en.php>>. Acesso em: 14 jul. 2019.

VITALIANO, S. N. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 276–283, dez. 2014. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213224414000303>>.

WASMUTH, J. D. et al. Integrated bioinformatic and targeted deletion

analyses of the SRS gene superfamily identify SRS29C as a negative regulator of *Toxoplasma* virulence. **mBio**, v. 3, n. 6, 13 nov. 2012. Disponível em: <<https://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00321-12>>.

WENDTE, J. M. et al. Limited genetic diversity among *Sarcocystis neurona* strains infecting southern sea otters precludes distinction between marine and terrestrial isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 37–44, 2010.

WICHT, R. J. Transmission of *Sarcocystis rileyi* to the striped skunk (*Mephitis mephitis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, n. 3, p. 387–388, jul. 1981. Disponível em: <<http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-17.3.387>>.

WIKIAVES. **WikiAves, a Enciclopédia das Aves do Brasil**.

WUNSCHMANN, A. et al. Natural Fatal *Sarcocystis falcatula* Infections in Free-Ranging Eagles in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 282–289, 2010. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063871002200222>>.

WÜNSCHMANN, A. et al. *Sarcocystis falcatula*-associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 2, p. 283–287, 1 mar. 2009. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/104063870902100223>>. Acesso em: 13 jul. 2019.

YABSLEY, M. J. et al. Characterization of *Sarcocystis* from four species of hawks from Georgia, USA. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 256–259, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-1567.1>>.

ZIEGLER, L. et al. Investigations into causes of neurologic signs and mortality and the first identification of *Sarcocystis calchasi* in free-ranging woodpeckers in Germany. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 49, n. 1, p. 247–251, mar. 2018. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/10.1638/2017-0087R.1>>

Apêndice A Lista de aves amostradas

	Identificação	Código	Nome científico	Nome comum	Ordem	Família	Distribuição	Sexo	Data de colheita
1	92	64771	<i>Turdus sp.</i>	S.d	Passeriformes	S.d	S.d	I	06/07/2016
2	94	64911	<i>Coragyps atratus</i>	urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	M	14/07/2016
3	95	64695	<i>Hydropsalis torquata</i>	Bacurau-tesoura	Caprimulgiformes	Caprimulgidae	America do Sul	M	11/07/2016
4	96	64603	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	11/07/2016
5	99	64789	<i>Serinus serinus</i>	Chamariz	Passeriformes	Fringillidae	Europa	F	11/07/2016
6	100	64879	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	Passeriformes	Passerellidae	America do Sul	F	15/07/2016
7	103	64916	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasil	M	18/07/2016
8	104	64781	<i>Piaya cayana</i>	Alma-de-gato	Cuculiformes	Cuculidae	America do Sul	F	28/06/2016
9	105	64885	<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	Strigiformes	Strigidae	Américas	F	07/07/2016
10	106	64430	<i>Sporophila caerulescens</i>	Coleirinho	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	27/06/2016
11	107	64934	<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	F	18/07/2016
12	110	64779	<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	M	28/06/2016
13	112	64533	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	F	09/06/2016
14	113	64936	<i>Penelope obscura</i>	Jacuguaçu	Galliforme	Cracidae	Brasil	M	18/07/2016
15	114	64683	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	20/06/2016
16	115	64815	<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	Strigiformes	Strigidae	Américas	M	06/06/2016
17	116	64898	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	11/07/2016
18	117	64888	<i>Asio stygius</i>	Coruja-diabo	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	F	11/07/2016
19	118	64772	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	M	27/06/2016
20	119	64767	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	M	23/06/2016

21	120	64731	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-de-mato	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	20/06/2016
22	121	64394	<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	Apodiformes	Trochilidae	Brasil	I	15/06/2016
23	122	64638	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	23/06/2016
24	123	64653	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	30/06/2016
25	124	64756	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-de-mato	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	22/06/2016
26	125	63888	<i>Psittacara leucophthalmus</i>	Periquitão-maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	M	24/06/2016
27	126	64729	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	17/06/2016
28	127	64765	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	F	23/06/2016
29	128	64532	<i>Nomonyx dominicus</i>	Marreca-bico-roxo	Anseriformes	Anatidae	Américas	F	15/06/2016
30	129	64354	<i>Gallinula chloropus</i>	Galinha-d'água	Gruiformes	Rallidae	Europa	F	20/06/2016
31	130	64696	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Centro e Sul América	M	15/06/2016
32	131	64565	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	13/06/2016
33	132	64554	<i>Pteroglossus bailloni</i>	Araçari-banana	Piciformes	Ramphastidae *****Ameaçada	Brasil	M	10/06/2016
34	133	64563	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	15/06/2016
35	134	64553	<i>Tangara cyanoptera</i>	Sanhaço-de-encontro-azul	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	10/06/2016
36	135	64684	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	17/06/2016
37	136	64579	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	13/06/2016
38	137	64552	<i>Tachyphonus coronatus</i>	tiê-preto	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	M	10/06/2016
39	138	64554	<i>Pteroglossus bailloni</i>	Araçari-banana	Piciformes	Ramphastidae *****Ameaçada	Brasil	M	10/06/2016

40	139	64551	<i>Trichothraupis melanops</i>	Tiê-de-topete	Passeriformes	Thraupidae	Brasil-bolivia	M	10/06/2016
41	140	64528	<i>Turdus flavipes</i>	Sabiaúna	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	09/06/2016
42	141	64306	<i>Porphyrio martinicus</i>	Frango-d'água-azu	Gruiformes	Rallidae	Américas	M	13/06/2016
43	142	64531	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	10/06/2016
44	143	64938	<i>Aramus guarauna</i>	Carão	Gruiformes	Aramidae	Centro e Sul América	M	19/07/2016
45	144	65180	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	17/08/2016
46	145	64929	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	M	25/07/2016
47	146	65051	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	F	05/08/2016
48	147	65065	<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	Strigiformes	Strigidae	Américas	M	05/08/2016
49	148	65117	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	F	11/08/2016
50	149	65163	<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	F	15/08/2016
51	150	65179	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	17/08/2016
52	151	65156	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	15/08/2016
53	152	65072	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	M	08/08/2016
54	153	64981	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	25/07/2016
55	154	65067	<i>Turdus amaurochalinus</i>	Sabiá-poca	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	05/06/2016
56	156	64502	<i>Coragyps atratus</i>	urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	F	11/08/2016
57	157	65093	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	M	10/08/2016
58	158	65183	<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	M	17/08/2016
59	159	64945	<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã nobre	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	25/07/2016
60	160	65144	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	M	12/08/2016
61	161	64064	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul	F	19/08/2016

							América		
62	162	65007	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	F	28/07/2016
63	163	65209	<i>Guira guira</i>	Anu-branco	Cuculiformes	Cuculidae	Brasil	M	19/08/2016
64	164	65146	<i>Pardirallus maculatus</i>	Saracura-pintada	Gruiformes	Rallidae	Centro e Sul América	M	17/08/2016
65	165	64914	<i>Piaya cayana</i>	Alma-de-gato	Cuculiformes	Cuculidae	America do Sul	M	14/07/2016
66	166	64728	<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	Apodiformes	Trochilidae	Brasil	F	25/07/2016
67	167	65019	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	F	01/08/2016
68	168	65043	<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	Apodiformes	Trochilidae	Brasil	M	03/08/2016
69	169	64577	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	13/06/2016
70	170	64961	<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	Apodiformes	Trochilidae	Brasil	M	22/07/2016
71	171	64730	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-de-mato	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	13/06/2016
72	172	65150	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	F	12/08/2016
73	173	64940	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	F	20/07/2016
74	174	64766	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Gavião-asa-de-telha	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	F	23/06/2016
75	175	64491	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	S.d	S.d
76	176	65683	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-de-mato	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	F	16/09/2016
77	177	65233	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	18/09/2016
78	178	65217	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	columbiformes	columbidae	America do Sul	M	24/08/2016
79	179	62247	<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	M	14/09/2016
80	180	65644	<i>Dryocopus lineatus</i>	Pica-pau-de-banda-branca	Piciformes	Picidae	Centro e Sul América	F	14/09/2016
81	181	65664	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	14/09/2016

82	182	65711	<i>Tyto furcata</i>	coruja-da-igreja	Strigiformes	Tytonidae	Mundo	F	16/09/2016
83	183	65645	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	12/09/2016
84	184	65224	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	12/09/2016
85	185	65579	<i>Caracara plancus</i>	Carará	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	M	12/09/2016
86	186	61731	<i>Eupsittula cactorum</i>	Periquito-da-Caatinga	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	02/09/2016
87	187	65578	<i>Falco sparverius</i>	Quiriquiri	Falconiformes	Falconidae	Américas	M	09/09/2016
88	188	65626	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	F	12/09/2016
89	189	65431	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	31/08/2016
90	190	65570	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	08/09/2016
91	191	65340	<i>Accipiter striatus</i>	Gavião-miúdo	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	M	30/09/2016
92	192	64882	<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	08/09/2016
93	193	65502	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	08/09/2016
94	194	65577	<i>Hydropsalis parvula</i>	Bacurau-chintã	Caprimulgiformes	Caprimulgidae	America do Sul	F	08/09/2016
95	195	65574	<i>Accipiter striatus</i>	Gavião-miúdo	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	F	06/09/2016
96	196	67219	<i>Coragyps atratus</i>	urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	I	11/11/2016
97	197	67082	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-de-bico-verde	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	M	08/11/2016
98	198	67010	<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	F	04/11/2016
99	199	67085	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	08/11/2016
100	200	67165	<i>Megaceryle torquata</i>	Martim-pescador-grande	Coraciiformes	Alcedinidae	Centro e Sul América	F	16/11/2016
101	201	66997	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasil	F	04/11/2016
102	202	67008	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	04/11/2016
103	203	66940	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	03/11/2016
104	204	67042	<i>Colaptes</i>	Pica-pau-carijó	Piciformes	Picidae	Brasil	M	07/11/2016

			<i>melanochloros</i>						
105	205	67376	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	23/11/2016
106	206	67274	<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca-verde	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	M	21/11/2016
107	207	66942	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	S.d	S.d
108	208	67268	<i>Dryocopus lineatus</i>	Pica-pau-de-banda-branca	Piciformes	Picidae	Centro e Sul América	F	16/11/2016
109	209	67363	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-de-mato	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	F	23/11/2016
110	210	67014	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	07/11/2016
111	211	67051	<i>Colaptes campestris</i>	Pica-pau-do-campo	Piciformes	Picidae	Brasil	F	07/11/2016
112	212	67335	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	F	23/11/2016
113	213	67049	<i>Accipiter striatus</i>	Gavião-miúdo	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	F	07/11/2016
114	214	67059	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	08/11/2016
115	215	67168	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasi	M	17/11/2016
116	216	66893	<i>Dryocopus lineatus</i>	Pica-pau-de-banda-branca	Piciformes	Picidae	Centro e Sul América	M	31/10/2016
117	217	66743	<i>Colaptes melanochloros</i>	Pica-pau-carijó	Piciformes	Picidae	Brasil	I	31/10/2016
118	218	66798	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	M	28/10/2016
119	219	67419	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	24/11/2016
120	220	67474	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	28/11/2016
121	221	67499	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	30/11/2016
123	222	66688	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-de-bico-verde	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	M	25/10/2016
124	223	65274	<i>Sporophila angolensis</i>	Curió	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	27/10/2016
125	224	64850	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Graúna	Passeriformes	Icteridae	Brasil	M	25/10/2016
126	225	66689	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	25/10/2016

127	226	66542	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	19/10/2016
128	227	67422	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasil	F	28/11/2016
129	228	67438	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	28/11/2016
130	229	67524	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	30/11/2016
131	230	67413	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-de-bico-verde	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	F	24/11/2016
132	231	66264	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	11/10/2016
133	232	67408	<i>Nannopterum brasilianus</i>	Biguá	Suliformes	Phalacrocoracidae	Centro e Sul América	F	25/11/2016
134	233	67519	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-de-bico-verde	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	M	29/11/2016
135	234	66607	<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	Apodiformes	Trochilidae	Brasil	M	19/10/2016
136	235	66153	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	06/10/2016
137	236	66183	<i>Leptotila sp.</i>	Juriti	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	F	10/10/2016
138	237	66140	<i>Coragyps atratus</i>	urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	F	05/10/2016
139	238	66126	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	07/10/2016
140	239	66127	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	07/10/2016
141	240	66323	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasil	M	13/10/2016
142	241	66257	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	M	10/10/2016
143	242	66174	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	F	07/10/2016
144	243	65956	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	28/09/2016
145	244	66021	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-de-bico-verde	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	M	29/09/2016
146	245	65657	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	03/10/2016
147	246	65266	<i>Saltator similis</i>	Pixarro	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	F	26/09/2016

148	247	65876	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	F	26/09/2016
149	248	65939	<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	27/09/2016
150	249	65835	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	23/09/2016
151	250	65841	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	Columbiformes	columbidae	America do Sul	M	26/09/2016
152	251	65877	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	26/09/2016
153	252	65942	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	27/09/2016
154	253	65837	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	23/09/2016
155	254	65765	<i>Hydropsalis torquata</i>	Bacurau-tesoura	Caprimulgiformes	Caprimulgidae	America do Sul	F	19/09/2016
156	255	65234	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	19/09/2016
157	256	65817	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	26/09/2016
158	257	65944	<i>Dryocopus lineatus</i>	Pica-pau-de-banda-branca	Piciformes	Picidae	Centro e Sul América	F	27/09/2016
159	258	65884	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-de-bico-verde	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	F	26/09/2016
160	259	65836	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	23/09/2016
161	260	65878	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	26/09/2016
162	261	65882	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	Columbiformes	Passerellidae	America do Sul	F	26/09/2016
163	262	65879	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	26/09/2016
164	263	65801	<i>Penelope obscura</i>	Jacuguaçu	Galliforme	Cracidae	Brasil	M	22/09/2016
165	264	65880	<i>Leptotila rufaxilla</i>	Juriti-gemeadeira	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	26/09/2016
166	265	65955	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	28/09/2016
167	266	65090	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	14/10/2016
168	267	65246	<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal-do-nordeste	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	F	01/11/2016
169	268	67218	<i>Coragyps atratus</i>	urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	I	11/11/2016
170	269	67316	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	18/11/2016
171	270	69126	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-de-mato	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	01/03/2017

172	271	69134	<i>Nannopterum brasilianus</i>	Biguá	Suliformes	Phalacrocoracidae	Centro e Sul América	M	13/03/2017
173	272	69177	<i>Accipiter striatus</i>	Gavião-miúdo	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	F	20/03/2017
174	273	67937	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-de-mato	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	19/12/2016
175	274	67797	<i>Lurocalis semitorquatus</i>	Bacurau-de-cauda-curta	Caprimulgiformes	Caprimulgidae	Centro e Sul América	F	19/12/2016
176	275	65469	<i>Synallaxis ruficapilla</i>	Garibaldi	Passeriformes	Furnaridae	Brasil	F	12/01/2017
177	276	67984	<i>Piaya cayana</i>	Alma-de-gato	Cuculiformes	Cuculidae	America do Sul	M	26/12/2016
178	277	67402	<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	Andorinha pequena	Passeriformes	Hirundinidae	America do Sul	F	19/12/2016
179	278	68069	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	F	28/12/2016
180	279	66552	<i>Coragyps atratus</i>	urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	S.d	S.d
181	280	67955	<i>Vanellus chilensis</i>	Quero-quero	Charadriiformes	Charadriidae	Centro e Sul América	F	23/01/2017
182	281	68347	<i>Falco sparverius</i>	Quiriquiri	Falconiformes	Falconidae	Américas	M	16/01/2017
183	282	70311	<i>Cacicus haemorrhous</i>	Guaxe	Passeriformes	Icteridae	America do Sul	M	26/06/2017
184	283	68443	<i>Cyclarhis gujanensis</i>	Pitiguari	Passeriformes	Vireonidae	Centro e Sul América	F	24/05/2017
185	284	69048	<i>Theristicus caudatus</i>	Curicaca	Pelicaniformes	Threskiornithidae	America do Sul	M	23/02/2017
186	285	68533	<i>Nannopterum brasilianus</i>	Biguá	Suliformes	Phalacrocoracidae	Centro e Sul América	M	08/03/2017
187	286	67515	<i>Chaetura meridionalis</i>	Andorinhão	Apodiformes	Apodidae	America do Sul	M	20/12/2016
188	287	67812	<i>Chaetura meridionalis</i>	Andorinhão	Apodiformes	Apodidae	America do Sul	M	26/12/2016
189	288	68463	<i>Accipiter striatus</i>	Gavião-miúdo	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	M	12/01/2017
190	289	69338	<i>Tersina viridis</i>	Saí-andorinha	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	20/03/2017
191	290	66812	<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	Andorinha pequena	Passeriformes	Hirundinidae	America do Sul	M	16/12/2016

192	291	67702	<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	Andorinha pequena	Passeriformes	Hirundinidae	America do Sul	M	12/12/2016
193	292	68100	<i>Chaetura meridionalis</i>	Andorinhão	Apodiformes	Apodidae	America do Sul	M	24/01/2017
194	293	70065	<i>Egretta thula</i>	Garça-branca	Pelecaniforme	Ardeidae	Américas	M	31/05/2017
195	294	70090	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	M	02/06/2017
196	295	69699	<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	M	25/04/2017
197	296	70177	<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal-do-nordeste	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	M	03/07/2017
198	297	70096	<i>Falco femoralis</i>	Falcão-de-coleira	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	M	06/06/2016
199	300	70074	<i>Butorides striata</i>	Socozinho	Pelecaniforme	Ardeidae	Mundo	M	31/05/2017
200	301	70524	<i>Sula sula</i>	Atobá-de-pé-vermelho	Suliformes	Sulidae	Centro e Sul América	F	03/07/2017
201	302	70037	<i>Asio clamator</i>	corulha-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	06/06/2017
202	303	69315	<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	Passeriformes	Icteridae	Brasil	F	25/05/2017
203	304	67838	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-de-mato	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	10/04/2017
204	305	66069	<i>Coragyps atratus</i>	urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	I	07/12/2016
205	306	67704	<i>Hydropsalis torquata</i>	Bacurau-tesoura	Caprimulgiformes	Caprimulgidae	America do Sul	F	12/12/2016
206	307	67714	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Socó-dorminhoco	Pelecaniforme	Ardeidae	Américas	F	08/12/2016
207	308	67693	<i>Hydropsalis torquata</i>	Bacurau-tesoura	Caprimulgiformes	Caprimulgidae	America do Sul	F	08/12/2016
208	309	68898	<i>Crotophaga ani</i>	Anu-preto	Cuculiformes	Cuculidae	Centro e Sul América	M	10/02/2017
209	310	67310	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Tiriba-de-testa-vermelha	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	09/01/2017
210	311	67763	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Graúna	Passeriformes	Icteridae	Brasil	M	16/02/2017
211	312	68814	<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã nobre	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	06/02/2017
212	313	69299	<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã nobre	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	28/03/2017
213	314	67724	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul	F	09/12/2016

							América		
214	315	66899	<i>Paroaria coronata</i>	cardeal-de-topete-vermelho	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	24/01/2017
215	316	67822	<i>Chaetura meridionalis</i>	Andorinhão	Apodiformes	Apodidae	America do Sul	F	26/01/2017
216	317	70005	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	F	25/05/2017
217	318	70018	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Tiriba-de-testa-vermelha	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	29/05/2017
218	319	70125	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	F	12/06/2017
219	320	70340	<i>Cacicus haemorrhous</i>	Guaxe	Passeriformes	Icteridae	America do Sul	F	27/06/2017
220	321	67742	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	12/12/2016
221	322	70205	<i>Penelope obscura</i>	Jacuguaçu	Galliforme	Cracidae	Brasil	F	20/06/2017
222	323	69759	<i>Coccyzus melacoryphus</i>	Papa-lagarta-acanelado	Cuculiformes	Cuculidae	America do Sul	M	05/05/2017
223	324	70492	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	M	26/06/2017
224	325	69590	<i>Nannopterum brasilianus</i>	Biguá	Suliformes	Phalacrocoracidae	Centro e Sul América	M	12/04/2017
225	326	69718	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	Columbiformes	columbidae	America do Sul	F	26/04/2017
226	327	69569	<i>Leptodon cayanensis</i>	Gavião-de-cabeça-cinza	Accipitriformes	Accipitridae	Centro e Sul América	F	11/04/2017
227	328	67880	<i>Falco sparverius</i>	quriquiri	Falconiformes	Falconidae	Américas	M	02/01/2017
228	329	69509	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	F	03/04/2017
229	330	69775	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	Columbiformes	columbidae	America do Sul	F	05/05/2017
230	331	66145	<i>Paroaria dominicana</i>	Galo de campina	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	I	29/12/2016
231	332	70525	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	M	03/07/2017
232	333	69742	<i>Falco sparverius</i>	Quiriquiri	Falconiformes	Falconidae	Américas	F	27/04/2017
233	334	68788	<i>Accipiter striatus</i>	Gavião-miúdo	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	M	06/02/2017

234	335	67271	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	F	03/01/2017
235	336	68893	<i>Saltator similis</i>	Pixarro	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	M	06/04/2017
236	337	69318	<i>Coryphospingus cucullatus</i>	Tico-tico rei	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	S.d.	S.d.
237	338	67782	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	09/01/2017
238	339	65350	<i>Sporophila nigricollis</i>	Coleirinha baiana	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	04/01/2017
239	340	67614	<i>Megarynchus pitangua</i>	Neinei	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	F	02/01/2017
240	341	68118	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	02/01/2017
241	342	68169	<i>Molothrus bonariensis</i>	Chupim	Passeriformes	Icteridae	Centro e Sul América	F	02/01/2017
242	343	70285	<i>Dacnis cayana</i>	Saí-azul	Passeriformes	Thraupidae	Centro e Sul América	F	23/06/2017
243	344	67911	<i>Troglodytes musculus</i>	Corruíra	Passeriformes	Troglodytidae	Américas	M	19/12/2016
244	345	67858	<i>Amazona vinacea</i>	Papagaio-de-peito-roxo	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	16/12/2016
245	346	69137	<i>Crypturellus obsoletus</i>	Inhambuguaçu	Tinamiforme	Tinamidae	America do Sul	M	03/03/2016
246	347	68236	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	09/01/2017
247	348	65486	<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	07/12/2016
248	349	60406	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	23/03/2017
249	350	68093	<i>Tangara palmarum</i>	Sanhaço-do-coqueiro	Passeriformes	Thraupidae	Centro e Sul América	M	28/12/2016
250	351	70286	<i>Tangara palmarum</i>	Sanhaço-do-coqueiro	Passeriformes	Thraupidae	Centro e Sul América	M	23/06/2016
251	352	68841	<i>Lurocalis semitorquatus</i>	Bacurau-de-cauda-curta	Caprimulgiformes	Caprimulgidae	Centro e Sul América	F	13/02/2017
252	353	j318	<i>preto</i>	S.d	S.d	S.d	S.d	S.d	S.d
253	354	68140	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	Columbiformes	columbidae	America do Sul	M	30/12/2016
254	355	70521	<i>Saltator similis</i>	Pixarro	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	M	29/06/2017

255	356	65212	<i>Piaya cayana</i>	Alma-de-gato	Cuculiformes	Cuculidae	America do Sul	F	22/08/2016
256	357	66086	<i>Saltator similis</i>	Pixarro	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	M	08/12/2016
257	358	67578	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	15/02/2017
258	359	67633	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	03/02/2017
259	360	69459	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	M	05/05/2017
260	361	69779	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	M	05/05/2017
261	362	68331	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	09/01/2017
262	363	64120	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	17/01/2017
263	364	67540	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	02/12/2016
264	365	67313	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	m	16/03/2017
265	366	69491	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	F	31/03/2017
266	367	68103	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	I	30/12/2017
267	368	67777	<i>Brotogeris chiriri</i>	Periquito-de- encontro-amarelo	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	M	16/12/2016
268	369	70526	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	29/06/2017
269	370	67541	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	01/12/2016
270	371	70070	<i>Thraupis sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	Centro e Sul América	M	31/05/2017
271	372	67996	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	Passeriformes	Passerellidae	America do Sul	M	18/01/2017
272	373	68679	<i>Psittacara leucophthalma</i>	Periquitão-maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	s.d	s.d
273	374	64866	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	26/12/2016
274	375	66675	<i>Colaptes campestris</i>	Pica-pau-do-campo	Piciformes	Picidae	Brasil	sd	sd
275	376	67673	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	23/03/2017
276	377	67156	<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	05/12/2016
277	378	66675	<i>Colaptes campestris</i>	Pica-pau-do-campo	Piciformes	Picidae	Brasil	sd	sd

278	379	69336	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	F	20/03/2017
279	380	68160	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	f	02/01/2017
280	381	67773	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	14/12/2017
281	383	69363	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	27/03/2017
282	384	68498	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-de-bico-verde	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	M	01/02/2017
283	385	67313	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	m	16/03/2017
284	386	68115	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasil	s.d	s.d
285	387	68598	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasil	F	23/01/2017
286	388	68358	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasil	F	03/02/2017
287	389	68654	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	26/01/2017
288	390	68170	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	02/01/2017
289	391	67575	<i>Furnarius rufus</i>	João-de-barro	Passeriformes	Furnaridae	América do Sul	F	02/12/2016
290	392	66434	<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	08/03/2017
291	393	70288	<i>Tangara ornata</i>	Sanhaço-de-encontro-amarelo	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	M	23/06/2017
292	394	70420	<i>Tangara ornata</i>	Sanhaço-de-encontro-amarelo	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	M	27/06/2017
293	395	68899	<i>Tangara palmarum</i>	Sanhaço-do-coqueiro	Passeriformes	Thraupidae	Centro e Sul América	M	10/02/2017
294	396	69112	<i>Psittacara leucophthalma</i>	Periquitão-maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	F	06/03/2017
295	397	69064	S.d.	Coruja	Strigiformes	Tytonidae	S.d	s.d	s.d

296	398	68107	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	Columbiformes	columbidae	America do Sul	s.d	s.d
297	399	67945	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasil	M	30/12/2016
298	400	68539	<i>Dryocopus lineatus</i>	Pica-pau-de-banda-branca	Piciformes	Picidae	Centro e Sul América	M	17/01/2017
299	401	68808	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	Falconiformes	Falconidae	America do Sul	M	06/02/2017
300	402	67779	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	12/12/2016
301	403	69982	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	F	22/05/2017
302	404	67405	<i>Chaetura meridionalis</i>	Andorinhão	Apodiformes	Apodidae	America do Sul	F	02/01/2017
303	405	67788	<i>Psittacara leucophthalma</i>	Periquitão-maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	M	12/12/2016
304	406	69592	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	Columbiformes	Columbidae	Américas	F	22/05/2017
305	407	69685	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-de-mato	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	24/04/2017
306	408	67626	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	F	02/01/2017
307	409	68791	<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca-verde	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	F	06/02/2017
308	410	68653	<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	F	26/01/2017
309	411	69415	<i>Turdus flavipes</i>	Sabiaúna	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	03/05/2017
310	412	68496	<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã nobre	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	17/01/2017
311	413	66667	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaço-cinzento	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	M	23/12/2016
312	414	68047	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	M	28/12/2016
313	416	69244	<i>Psittacara leucophthalma</i>	Periquitão-maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	M	06/04/2017
314	417	64319	<i>Psittacara leucophthalma</i>	Periquitão-maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	M	10/03/2017
315	418	69366	<i>Psittacara leucophthalma</i>	Periquitão-maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	F	31/03/2017

316	419	70453	<i>Turdus flavipes</i>	Sabiaúna	Passeriformes	Turdidae	America do Sul	M	26/06/2017
317	420	66036	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	F	27/03/2017
318	421	68072	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	M	29/12/2016
319	422	69304	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	M	15/03/2017
320	423	71199	<i>Patagioenas picazuro</i>	Asa-branca	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	31/08/2017
321	424	70906	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	Passeriformes	Passerellidae	America do Sul	M	28/08/2016
322	425	73101	<i>Anas sp.</i>	Ganso-africano	Anseriformes	Anatidae	Migratória	M	10/11/2017
323	426	72014	<i>Egretta thula</i>	Garça-branca	Pelecaniforme	Ardeidae	Américas	F	05/10/2017
324	427	71568	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Gavião-asa-de-telha	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	M	22/05/2017
325	428	71448	<i>Piaya cayana</i>	Alma-de-gato	Cuculiformes	Cuculidae	America do Sul	F	14/09/2017
326	429	71096	<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	Apodiformes	Trochilidae	Brasil	M	16/08/2017
327	430	69966	<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal-do-nordeste	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	M	01/11/2016
328	431	70343	<i>Cacicus haemorrhous</i>	Guaxe	Passeriformes	Icteridae	America do Sul	M	04/07/2017
329	432	70300	<i>Tangara palmarum</i>	Sanhaçu-do-coqueiro	Passeriformes	Thraupidae	Centro e Sul América	F	10/07/2016
330	433	70739	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Socó-dorminhoco	Pelecaniforme	Ardeidae	Américas	M	27/07/2017
331	434	69924	<i>Psittacara leucophthalma</i>	Periquitão-maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	F	31/07/2016
332	435	64850	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-de-bico-verde	Piciformes	Ramphastidae	Brasil	M	03/10/2017
333	436	71364	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Gavião-asa-de-telha	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	F	11/09/2017
334	437	70840	<i>Coragyps atratus</i>	Urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	M	04/08/2016
335	438	68220	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	04/09/2017
336	439	70810	<i>Crotophaga ani</i>	Anu-preto	Cuculiformes	Cuculidae	Centro e Sul	M	31/07/2017

							América		
337	440	68844	<i>Eupsittula aurea</i>	Periquito-rei	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	M	28/07/2017
338	441	70400	<i>Tangara seledon</i>	Saíra-sete-cores	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	F	10/07/2017
339	442	71202	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	04/09/2017
340	443	71075	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	21/08/2017
341	444	70341	<i>Cacicus haemorrhous</i>	Guaxe	Passeriformes	Icteridae	America do Sul	M	10/07/2017
342	445	70980	<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	Andorinha pequena	Passeriformes	Hirundinidae	America do Sul	F	17/08/2017
343	446	70714	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	Piciformes	Picidae	Brasil	F	20/07/2017
344	447	71119	<i>Buteo brachyurus</i>	Gavião-de-cauda-curta	Accipitriformes	Accipitridae	Americas	M	22/08/2017
345	448	71030	<i>Tyto furcata</i>	Coruja-da-igreja	Strigiformes	Tytonidae	Mundo	M	17/08/2017
346	449	70754	<i>Crotophaga ani</i>	Anu-preto	Cuculiformes	Cuculidae	Centro e Sul América	M	28/07/2017
347	450	71312	<i>Asio stygius</i>	Coruja-diabo	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	F	11/09/2017
348	451	71042	<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	Apodiformes	Trochilidae	Brasil	M	16/08/2017
349	452	70363	<i>Ramphocelus bresilius</i>	Tiê-sangue	Passeriformes	Thraupidae		F	19/07/2017
350	453	70843	<i>Cacicus haemorrhous</i>	Guaxe	Passeriformes	Icteridae	America do Sul	F	05/07/2017
351	454	71580	<i>Sporophila angolensis</i>	Curió	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	I	25/09/2017
352	455	71731	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Gavião-asa-de-telha	Accipitriformes	Accipitridae	Américas	M	26/09/2017
353	456	70196	<i>Sporophila caerulescens</i>	Coleirinho	Passeriformes	Thraupidae	America do Sul	F	08/08/2017
354	457	71023	<i>Aramides saracura</i>	Saracura-do-mato	Gruiformes	Rallidae	América do Sul	F	24/08/2017
355	458	70422	<i>Tangara ornata</i>	Sanhaçu-de-encontro-amarelo	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	M	12/07/2017
356	459	70117	<i>Saltator fuliginosus</i>	Bico-de-pimenta	Passeriformes	Thraupidae	América do Sul	M	05/07/2017

357	460	70887	<i>Leucochloris albicollis</i>	Beija-flor-de-papo-branco	Apodiformes	Trochilidae	America do Sul	M	07/08/2017
358	461	70342	<i>Cacicus haemorrhous</i>	Guaxe	Passeriformes	Icteridae	America do Sul		05/07/2017
359	462	71493	<i>Dryocopus lineatus</i>	Pica-pau-de-banda-branca	Piciformes	Picidae	Centro e Sul América	F	18/09/2017
360	463	72373	<i>Coragyps atratus</i>	Urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	F	16/10/2017
361	464	71834	<i>Mimus saturninus</i>	Sabiá-do-campo	Passeriformes	Mimidae	America do Sul	F	28/09/2017
362	465	70333	<i>Euphonia violacea</i>	Gaturamo-verdadeiro	Passeriformes	Fringillidae	America do Sul	M	14/07/2017
363	466	70907	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	Passeriformes	Passerellidae	America do Sul	F	16/08/2017
364	467	70662	<i>Coragyps atratus</i>	urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	F	14/07/2017
365	468	72260	<i>Syrigma sibilatrix</i>	Maria-faceira	Pelecaniforme	Ardeidae	America do Sul	F	11/10/2017
366	469	71572	<i>Anser cygnoides</i>	Ganso-africano	Anseriformes	Anatidae	Migratória	F	22/05/2017
367	470	70407	<i>Tangara seledon</i>	Saíra-sete-cores	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	F	19/07/2017
368	471	70814	<i>Coragyps atratus</i>	urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	M	02/08/2017
369	472	65003	<i>Leptotila rufaxilla</i>	Juriti-gemeadeira	Columbiformes	Columbidae	America do Sul	M	07/08/2017
370	473	70791	<i>Vanellus chilensis</i>	Quero-quero	Charadriiformes	Charadriidae	Centro e Sul América	F	31/07/2017
371	474	70391	<i>Dacnis cayana</i>	Saí-azul	Passeriformes	Thraupidae	Centro e Sul América	M	18/07/2017
372	475	74775	<i>Eupsittula cactorum</i>	Periquito-da-Catinga	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	15/02/2018
373	476	72998	<i>Eupsittula aurea</i>	Periquito-rei	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	F	08/01/2018
374	477	73551	<i>Falco sparverius</i>	Quiriquiri	Falconiformes	Falconidae	Américas	F	27/11/2018
375	478	75675	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	Passeriformes	Tyrannidae	Centro e Sul América	M	22/02/2018
376	479	71503	<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal-do-nordeste	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	F	22/02/2018
377	480	75703	<i>Psittacara leucophthalma</i>	Periquitão-maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	America do Sul	M	26/02/2018

378	481	75687	<i>Furnarius rufus</i>	João-de-barro	Passeriformes	Furnariidae	América do Sul	M	22/02/2018
379	482	69682	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	Strigiformes	Strigidae	Centro e Sul América	M	06/02/2018
380	483	75745	<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	Passeriformes	Turdidae	América do Sul	M	26/02/2018
381	484	75340	<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã nobre	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	I	02/02/2018
382	485	74980	<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã nobre	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	31/01/2018
383	486	75258	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Tiriba-de-testa-vermelha	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	M	15/02/2018
384	487	73720	<i>Eupsittula aurea</i>	Periquito-rei	Psittaciformes	Psittacidae	América do Sul	F	06/02/2018
385	488	74705	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	08/01/2017
386	489	73686	<i>Penelope obscura</i>	Jacuguaçu	Galliformes	Cracidae	Brasil	F	01/12/2017
387	490	71324	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	Passeriformes	Passerellidae	América do Sul	I	06/09/2017
388	491	70992	<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	Passeriformes	Icteridae	Brasil	I	27/11/2017
389	492	75184	<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	Strigiformes	Strigidae	Américas	M	08/02/2018
390	493	73305	<i>Falco sparverius</i>	Quiriquiri	Falconiformes	Falconidae	Américas	F	17/11/2017
391	494	73477	<i>Mesembrinibis cayennensis</i>	Coró-coró	Pelecaniformes	Threskiornithidae	Centro e Sul América	M	24/11/2017
392	495	73432	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	I	24/11/2017
393	163-3	65209	<i>Guira guira</i>	Anu-branco	Cuculiformes	Cuculidae	Brasil	M	19/08/2016
394	94H	64911	<i>Coragyps atratus</i>	Urubu-de-cabeça-preta	Cathartiformes	Cathartidae	Américas	M	14/07/2016
395	95B	64695	<i>Hydropsalis torquata</i>	Bacurau-tesoura	Caprimulgiformes	Caprimulgidae	América do Sul	M	11/07/2016
396	496	75701	<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã nobre	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	F	06/02/2028
397	497	75712	<i>Nomonyx dominicus</i>	Marreca-bico-roxo	Anseriformes	Anatidae	Américas	F	24/01/2018
398	498	72079	<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	Passeriformes	Icteridae	América do Sul	M	31/01/2018
399	499	74890	<i>Paroaria dominicana</i>	Galo-de-campina	Passeriformes	Thraupidae	Brasil	I	22/02/2018
400	504	70572	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	I	15/10/2018
401	519	63795	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	Brasil	I	22/10/2018

Anexo A Laudo necroscópico da espécie *Cacicus haemorrhous* (#282-Guaxe)

LAUDO NECROSCÓPICO

AVES

Guaxe (Cacicus haemorrhous)

Macho, Adulto

Marcação: Não possui

CADASTRO: 70311

Procedência: Eldorado, SP

Peso na chegada: não mensurado

Peso ao óbito: 52 g

Data de entrada: 22/06/17

Data de óbito: 26/06/17

Data de necropsia: 26/06/17

Condição de morte: Morte natural

Conservação do cadáver: Refrigerado

Histórico: Animal oriundo de uma apreensão de cerca de 175 aves.

Exame externo

Estado nutricional: Ruim.**Superfície corporal:** Empenamento: completo, em bom estado. Ausência de ectoparasitos. Pele intensamente ressecada e espessada, sugestivo de desidratação intensa.**Orifícios naturais:** Cavidade oral: presença de material alimentar. Cloaca: sem alterações.

Exame interno

Cavidades Corpóreas: Ausência de depósito de tecido adiposo em cavidade celomática.**Sistema respiratório:** Traqueia: mucosa normocorada. Sacos aéreos: translúcidos e brilhantes. Pulmão: superfície lisa, coloração rósea-avermelhada, com consistência macia, sangrante ao corte, docimasia positiva.**Sistema cardiovascular:** Coração: ausência de alterações macroscópicas.**Sistema digestório:** Fígado: superfície lisa, coloração marrom médio, moderadamente pálido, consistência macia ao corte, não sangrante. Vesícula biliar: Moderadamente preenchida. Pâncreas: superfície lisa, coloração rosada clara, consistência macia ao corte. Esôfago: Ausência de conteúdo alimentar. Mucosa e serosa normocoradas, sem alterações. Inglúvio: Não desenvolvido. Pró-ventrículo: Ausência de conteúdo alimentar. Mucosa e serosa normocoradas, sem alterações. Ventrículo: Ausência de alimento. Mucosa e serosa normocoradas, sem alterações. Intestinos: Discreto conteúdo fecal. Mucosa e serosa normocoradas, sem alterações. Helminhos: presentes. Discreta quantidade de cestódeos.**Sistema linfo-hematopoiético:** Baço: superfície lisa, formato alongado, medindo 0,9 x 0,15 cm, coloração avermelhada, consistência macia ao corte.**Sistema urinário:** Rins: superfície lisa, coloração marrom escura homogênea, consistência macia ao corte. Ureteres: discreta quantidade urato depositado.**Sistema reprodutivo:** Testículos ovalados, pouco desenvolvidos, medindo 0,1 x 0,15 cm.**Sistema endócrino:** Tireóides: ndn. Adrenais: ndn.**Sistema músculo-esquelético:** Músculo peitoral: Atrofia moderada a intensa. Presença de cistos em musculatura peitoral, abdominal, craniana e cervical.**Plexo braquial/sacral e nervos ciáticos:** Nervos ciáticos: ndn.**Sistema nervoso central e órgãos sensoriais:** Encéfalo: sem alterações. Olhos e ouvidos: ndn.

Causa Mortis: Caquexia e desidratação

Alterações principais: Presença de cistos em musculatura, sugestivos de Sarcocystis.☒ Exames complementares☒ Documentação fotográfica☐ Colhidos fragmentos para HP

- Parasitológico de conteúdo intestinal: negativo.
- Fígado colhido e armazenado em álcool para Banco Genômico
- Material colhido e congelado para Projeto Sarcocystis

Médica-veterinária: Dra. Ticiane Zwarg - CRMV-SP 23.220