

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Marta Elena Machado Alves

**INFECÇÃO POR *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*  
EM AVES: OCORRÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR**

Santa Maria, RS  
2022

**Marta Elena Machado Alves**

**INFECCÃO POR *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* EM AVES:  
OCORRÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS  
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Alves, Marta Elena Machado  
Infecção por Sarcocystis spp., Toxoplasma gondii e  
Neospora caninum em aves: ocorrência e detecção molecular  
/ Marta Elena Machado Alves.- 2022.  
77 p.; 30 cm

Orientadora: Fernanda Silveira Flores Vogel  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2022

1. Apicomplexa 2. PCR 3. Aves 4. Naturalmente  
infetada I. Vogel, Fernanda Silveira Flores II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MARTA ELENA MACHADO ALVES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Marta Elena Machado Alves

**INFECÇÃO POR *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*  
EM AVES: OCORRÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**.

**Aprovado em 18 de fevereiro de 2022:**



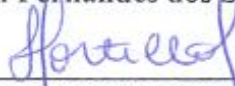
Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra.  
(Presidente/Orientadora)



Giovana Camillo, Dra.



Helton Fernandes dos Santos, Dr.



Luiza Pires Portella, Dra.



Patrícia Braüning, Dra.

Santa Maria, RS  
2022

*A minha amada filha, Luiza.*

## AGRADECIMENTOS

Em tempos de pandemia causada pelo Covid-19 agradeço a Deus pela vida e saúde.

Aos meus pais, Maria e Ademar, agradeço por todo o amor, apoio, força e compreensão que me permitiram chegar neste dia.

Aos meus irmãos Eder, Marion, Eloi e Everson agradeço por todo carinho e apoio.

Ao meu namorado, Rodrigo, agradeço pela paciência, amor, compreensão e apoio. À sua família também agradeço pelo acolhimento e carinho para comigo.

A minha filha, Luiza, sua chegada mudou minha vida, mas me fez sentir o maior amor do mundo, o amor de mãe, e me motivou a seguir em busca dos meus objetivos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR/UFSM), que foram minha segunda casa, auxiliaram no meu desenvolvimento profissional e pessoal, sou grata pelas oportunidades, pela estrutura e qualidade.

À todos os professores que me acompanharam até o momento, agradeço por cada ensinamento, em especial à minha orientadora, professora Fernanda Silveira Flores Vogel, pelas oportunidades, confiança, amizade e por todos os ensinamentos e orientação durante a graduação, especialização, mestrado e doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e a CAPES pela possibilidade de uma formação de qualidade e pelo apoio financeiro, em especial à técnica administrativa Maria Moro da Rosa, por todo auxílio prestado.

Ao Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA/UFSM) pela confiança, disponibilidade e auxílio para coleta das amostras para o desenvolvimento desta pesquisa. Em especial, agradeço a Laurete Murer pelo carinho e por me incentivar a trabalhar com aves silvestres e ao professor Helton Fernandes dos Santos pela amizade e auxílio na interpretação das análises moleculares.

Aos colegas que convivi durante os 10 anos de LADOPAR, agradeço pela amizade, companheirismo, ajuda e por compartilhar comigo os momentos alegres e aqueles nem tanto. Agradeço, em especial a Patrícia Braüning que me acompanhou durante toda minha caminhada na pesquisa pelo carinho, confiança e ensinamentos e ao Fagner D'ambroso Fernandes pela amizade e por me ajudar sempre que precisei.

A todos aqueles que de alguma forma fizeram parte da minha jornada.

Muito obrigada, serei sempre grata!

*A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando de que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.*

*Chico Xavier*

## RESUMO

### INFEÇÃO POR *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* EM AVES: OCORRÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR

AUTORA: Marta Elena Machado Alves  
ORIENTADORA: Fernanda Silveira Flores Vogel

As aves podem ser infectadas por parasitas dos gêneros *Sarcocystis*, *Toxoplasma* e *Neospora*, pertencentes ao filo Apicomplexa. O hábito de alimentarem-se diretamente do solo aumenta a probabilidade de ingestão de oocistos, sendo importantes sinalizadores dos parasitas que estão contaminando o ambiente. No ciclo biológico podem ser consideradas hospedeiras intermediárias e quando predadas tornam-se fonte de infecção para os hospedeiros definitivos. Embora estudos demonstrem que as aves podem ser infectadas por estes parasitas inúmeras espécies continuam sem diagnóstico e a participação no ciclo biológico desses parasitas não está totalmente esclarecido. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência e detectar a presença de DNA de *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em amostras de tecido de aves naturalmente infectadas. Para isso, as aves recebidas no Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA-UFSM) foram necropsiadas e realizada a coleta de amostra de tecido (cérebro, coração e músculo do peito). Os animais eram de cativeiro, vida livre e domésticas e morreram por causas variadas. Posteriormente, no Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR-UFSM) foi realizada a extração de DNA das amostras de tecido, amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene 18S rRNA para *Sarcocystis* spp., gene NC5 para *N. caninum* e gene repetitivo 529 pares de bases para *T. gondii*. As amostras positivas foram purificadas, sequenciadas e comparadas com as sequências depositadas no GenBank. Esta tese foi organizada em dois capítulos conforme a disponibilidade de amostras de tecido de aves para pesquisa dos parasitas. No capítulo 1, foram coletadas amostras de tecido de 65 aves (65 cérebros e 65 corações) de cativeiro, vida livre e domésticas e analisadas para *Sarcocystis* spp., *T. gondii* e *N. caninum*. DNA de *Sarcocystis* spp. foi detectada em três aves (03/65 - 4,62%), em cérebro de *Nymphicus hollandicus*, cérebros e corações de *Amazona aestiva* e *Paroaria coronata*. O DNA de *T. gondii* não foi detectado em nenhum tecido. O DNA de *N. caninum* foi detectado em duas aves (02/65 - 3,07%), em amostra de cérebro de *Rupornis magnirostris* e em amostras de cérebro e coração de *Dendrocygna bicolor*. Não foram observadas infecções mistas. No capítulo 2, foram coletadas amostras de músculo do peito de 89 aves de cativeiro para pesquisa de membros do gênero *Sarcocystis*. Do total, em cinco (5,61%) as sequências amplificadas exibiram 100% de identidade com DNA de *Sarcocystis* spp., detectadas no músculo do peito de *Cyanoliseus patagonus* (1), *Psittacula krameri* (1), *Pyrrhura frontalis* (2) e *Ramphastos dicolorus* (1). A expansão da diversidade de espécies hospedeiras naturalmente infectadas analisadas através do desenvolvimento de métodos moleculares levou à detecção de membros dos gêneros *Sarcocystis* e *Neospora* em diferentes espécies de aves, demonstrando que provavelmente elas estão envolvidas na epidemiologia destes parasitas.

**Palavras-chave:** Apicomplexa. PCR. Aves. Naturalmente infectada.



## ABSTRACT

### ***Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* AND *Neospora caninum* INFECTION IN BIRDS: OCCURRENCE AND MOLECULAR DETECTION**

AUTHOR: Marta Elena Machado Alves  
ADVISER: Fernanda Silveira flores Vogel

Parasites from the genus *Sarcocystis*, *Toxoplasma* and *Neospora* which belong to the Apicomplexa phylum cause infection in birds. Birds feeding habits as consumption of food touching the soil enhances the probability of cysts ingestion and because of that they indirectly demonstrate the parasites that are contaminating the environment. Birds are intermediate hosts and when they are killed and ingested they became infection sources to definitive hosts. Studies have showed that these parasites infect birds but the role of birds in protozoa life cycles remains unclear. Therefore, the objective of this study was to check the occurrence and the molecular detection of *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in tissues from naturally infected birds. Tissue samples (brains, hearts and chest muscle) were collected from birds destined to necropsy at the Avian Pathologies Diagnosis Central Laboratory (LCDPA) of the Federal University of Santa Maria (UFSM). Birds were free-living, domestic or originating from conservatories or maintainers and died from different causes. Samples were submitted to DNA extraction, PCR amplification of the 18S rRNA gene to *Sarcocystis* spp., NC5 gene to *N. caninum* and repetitive gene 529 base pairs for *T. gondii*. Positive samples were sequenced and compared with sequences in GenBank. This thesis was organized in two chapters based on birds' tissue samples availability to parasites analyses. In chapter one, samples were collected from 65 birds (65 brains and 65 hearts) and analyzed for *Sarcocystis* spp., *T. gondii* and *N. caninum*. *N. caninum* DNA was detected in two birds (02/65 – 3.07%), in brain sample of a *Rupornis magnirostris* and in brain and heart samples of a *Dendrocygna bicolor*. DNA from *Sarcocystis* spp. was detected in three birds (03/65 – 4.62%), in brain of a *Nymphicus hollandicus*, brains and hearts of a *Amazona aestiva* and a *Paroaria coronata*. *T. gondii* DNA was not detected in any tissues. No mixed infections were observed. In chapter two, chest muscles were collected from 89 birds which were held in captivity aiming *Sarcocystis* detection. Five amplified sequences (5.61%) detected in *Cyanoliseus patagonus* (1), *Psittacula krameri* (1), *Pyrrhura frontalis* (2) e *Ramphastos dicolorus* (1) showed 100% identity with *Sarcocystis* spp. The diversity of hosts species naturally infected analyzed by molecular methods showed *Sarcocystis* and *Neospora* infecting different birds' species and probably these birds are involved in protozoa epidemiology.

**Keywords:** Apicomplexa. PCR. Birds. Naturally infected.

## LISTA DE FIGURAS

### APRESENTAÇÃO

Figura 1 – Classificação taxonômica dos parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, subordem Eimeriorina .....	13
Figura 2 – Ciclo biológico do <i>Sarcocystis</i> .....	17
Figura 3 – Ciclo biológico do <i>T. gondii</i> .....	18
Figura 4 – Ciclo biológico do <i>N. Caninum</i> .....	19
Figura 5 – Patogenia e formas apresentadas pelo <i>Sarcocystis</i> durante suas fases de desenvolvimento nos hospedeiros definitivos e intermediários .....	22
Figura 6 – Patogenia e formas apresentadas pelo <i>T. gondii</i> durante as fases de desenvolvimento nos hospedeiros definitivos e intermediários .....	23
Figura 7 – Patogenia e formas apresentadas pelo <i>N. caninum</i> durante as fases de desenvolvimento nos hospedeiros definitivos e intermediários .....	24

### CAPÍTULO I

Figure 1. Phylogenetic analysis of 18S rRNA sequences obtained from various hosts compared to representative members of Sarcocystidae family. The values between the branches represent the percent bootstrap value per 1000 replicates, and values below 70% are not shown.....	35
--	----

### CAPÍTULO II

Figure 1. Number of birds positive for <i>Sarcocystis</i> spp. (Family-based analysis). .....	44
Figure 2. Correlation between eating habits and the presence of <i>Sarcocystis</i> spp. in the breast muscle of captive birds in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. ....	45

## LISTA DE TABELAS

### APRESENTAÇÃO

Tabela 1 – Relação de estudos com detecção molecular de <i>Sarcocystis</i> em aves.....	14
---	----

### CAPÍTULO I

Table 1. Classification of the 65 birds in families, species and housing in the municipality of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.....	32
Table 2. <i>T. gondii</i> , <i>N. caninum</i> and <i>Sarcocystis spp.</i> nucleic acid detection in brain and heart of naturally infected birds.....	34

### CAPÍTULO II

Table 1. List of birds tested according to their classification, i.e., family, scientific name and common name*.....	43
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
2.1	ETIOLOGIA .....	13
2.2	CICLO DE VIDA .....	16
2.3	EPIDEMIOLOGIA E INFECÇÃO POR <i>Sarcocystis</i> spp., <i>T. gondii</i> e <i>N. Caninum</i> EM AVES .....	19
2.4	PATOGENIA.....	21
2.5	SINAIS CLÍNICOS .....	24
2.6	DIAGNÓSTICO .....	26
2.7	PREVENÇÃO E CONTROLE.....	28
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I – <i>Toxoplasma gondii</i>, <i>Neospora caninum</i> AND <i>Sarcocystis</i> spp. IN SPECIES OF NATURALLY INFECTED BIRDS .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II – SARCOCYSTIDAE DETECTION IN THE BREAST MUSCLE OF CAPTIVE BIRDS BELONGING TO FAMILIES, PSITTACIDAE, PSITTACULIDAE, AND RAMPHASTIDAE.....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
	<b>APÊNDICE A – LISTA DE AVES AMOSTRADAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO A – AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA SISBIO/ICMBIO.....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFSM) .....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil serve de abrigo para uma das mais abundantes e diversificadas avifaunas do mundo, sendo descritos 3.051 taxons, considerando o número de espécies e subespécies. *Sarcocystis* spp., *T. gondii* e *N. caninum* são parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa e família Sarcocystidae que podem causar mortalidade em diversas espécies de animais domésticos e silvestres, incluindo as aves.

O gênero *Sarcocystis* spp. acomete várias espécies animais, como mamíferos, aves e reptéis. *T. gondii* acomete diversas espécies de aves, podendo causar mortalidade, entretanto, na maioria das vezes, a infecção é subclínica. As aves podem servir de alimento para os gatos, hospedeiro definitivos do *T. gondii*. Isolados deste parasita tem sido descrito tanto em aves domésticas como silvestres, porém inúmeras espécies de aves continuam sem diagnóstico. As aves podem ser consideradas hospedeiras intermediárias naturais do *N. caninum* e fonte de infecção para os canídeos (hospedeiros definitivos).

Embora o papel das aves no ciclo epidemiológico das parasitoses pesquisadas seja desconhecido, as aves podem ser expostas à infecção pois consomem alimentos e água em contato com o solo e, além disso, as aves carnívoras e onívoras se alimentam de carcaças aumentando a probabilidade de ingestão de cistos e oocistos de parasitas. Outra característica das aves é que a maioria tem comportamento migratório que pode contribuir com a disseminação de *Sarcocystis* spp., *T. gondii* e *N. caninum* em todo o mundo. Considerando o exposto acima, esta tese une os estudos realizados na forma de dois capítulos, os quais visam à pesquisa de material genético de protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa em diferentes tecidos de aves naturalmente infectadas.

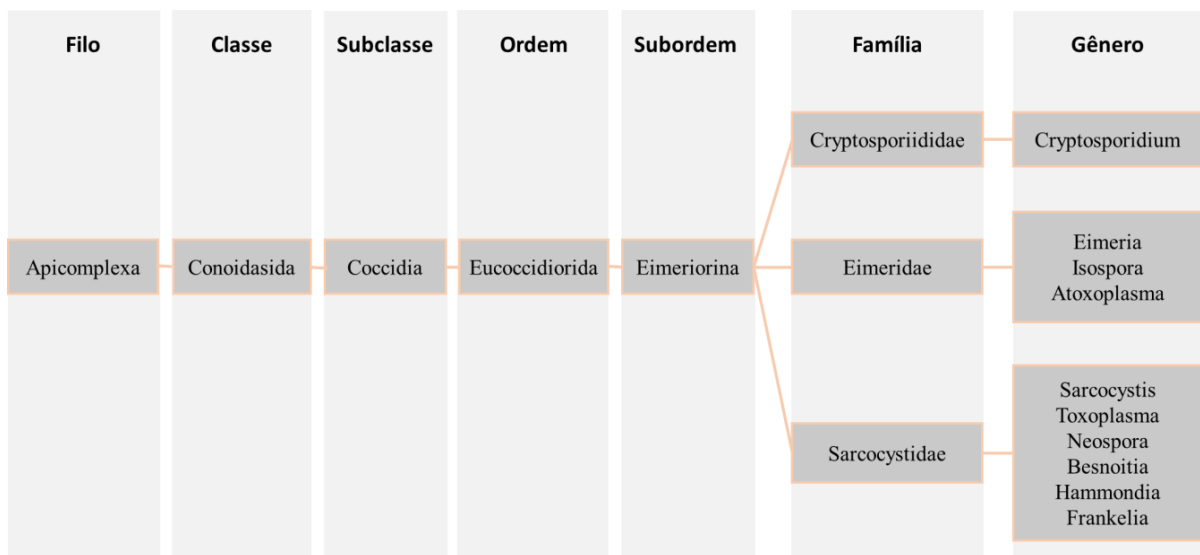
A tese está construída por uma revisão de literatura sobre os protozoários *Sarcocystis* spp., *T. gondii* e *N. caninum* versando sobre os principais aspectos da etiologia, ciclo de vida, epidemiologia, patogenia, sinais clínicos, prevenção e controle encontrados em aves silvestres e domésticas, bem como as formas de diagnóstico. Na sequência são apresentados dois artigos científicos com os objetivos de i. detecção molecular de *Sarcocystis* spp., *T. gondii* e *N. caninum* em cérebro e coração de diversas espécies de aves silvestres e domésticas e, ii. detecção molecular de *Sarcocystis* spp. em músculo do peito de aves silvestres. No final da tese estão as considerações gerais apresentando as conclusões sobre os estudos realizados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ETIOLOGIA

*Sarcocystis* spp., *T. gondii* e *N. caninum* são protozoários intracelulares obrigatórios, pertencente ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina, Família Sarcocystidae (FIGURA 1).

Figura 1 – Classificação taxonômica dos parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, subordem Eimeriorina



Fonte: adaptado de Taylor, Coop e Wall (2017).

A doença causada pelo protozoário *Sarcocystis* foi inicialmente descrita por Miescher (1843 apud LEVINE, 1977, p. 38-51) na musculatura esquelética de camundongos *Mus musculus*, sendo nomeado como túbulos de Miescher por 20 anos, entretanto, o gênero *Sarcocystis* foi discutido pela primeira vez por Lankester (1882) em rãs (LATIF, 2016; RUAS; CUNHA; SILVA, 2001). Algumas espécies puderam ser diagnosticadas a partir da visualização dos cistos, com base na sua morfologia e hospedeiro parasitado (GUÇLU; ALDEM-R; GÜLER, 2004; LOPES et al., 2004).

*Sarcocystis* pertencente a subfamília Sarcocystinae (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989; ROMMEL, 1989; TENTER, 1995), este gênero possui grande variedade de espécies, podendo apresentar especificidade aos hospedeiros e características morfológicas distintas (DOMENIS et al., 2011; TENTER; HECKEROTH, 1999). As espécies de *Sarcocystis* podem acometer várias espécies animais, como mamíferos, aves e reptéis (LATIF; AZDAYANTI, 2016).

Estudos em aves vem sendo relatados nos últimos anos. Na tabela 1, estão descritas as diferentes espécies de *Sarcocystis* descritas em aves, bem como os marcadores moleculares utilizados.

Tabela 1 – Relação de estudos com detecção molecular de *Sarcocystis* em aves

(continua)

<i>Sarcocystis</i>	Aves	Dados moleculares	Referências
<i>S. albifrons</i>	<i>Anser albifrons</i>	18S, 28S, ITS1	Kutkiené et al. (2012a)
<i>S. anasi</i>	<i>Anas platyrhynchos</i>	18S, 28S, ITS1	Kutkiené et al. (2012a)
<i>S. arctica</i>	<i>Haliaeetus albicilla</i> <i>Corvus</i>	18S, 28S, ITS1 e cox1	Máca e González-Solís (2022); Juozaitytė-Ngugu et al. (2021)
<i>S. atraii</i>	<i>Fulica atra</i>	18S, 28S, ITS1	El-Morseý et al. (2015a)
<i>S. calchasi</i>	<i>Columba livia f. domestica</i> <i>Nymphicus hollandicus</i> <i>Zenaida asiática</i> <i>Streptopelia decaocto</i> <i>Phalacrocorax penicillatus</i> <i>Accipiter</i>	18S, 28S, ITS1	Olias et al. (2010a); Olias et al. (2014); Hodo et al. (2016); Parmentier et al. (2019); Bamac et al. (2020); Rogers et al. (2021)
<i>S. chloropusae</i>	<i>Gallinula chloropus</i>	18S, 28S, ITS1	El-Morseý et al. (2015b)
<i>S. columbae</i>	<i>Columba palumbus</i> <i>Accipiter cooperii</i>	18S, 28S, ITS1	Olias et al. (2010b); Rogers et al. (2021)
<i>S. cornixi</i>	<i>Corvus cornix</i> <i>Accipiter</i>	18S, 28S, ITS1	Kutkiené et al. (2009); Mayr et al. (2016)
<i>S. corvusi</i>	<i>Corvus monedula</i>	18S, 28S, ITS1	Prakas et al. (2013)
<i>S. cristata</i>	<i>Corythaeola cristata</i>	18S, 28S, ITS1, cox1	Máca; González-Solís (2021)
<i>S. falcatula</i>	<i>Bubo virginianus</i> <i>Aquila chrysaetos</i> <i>Haliaeetus leucocephalus</i> <i>Phimosus infuscatus</i> <i>Spheniscus magellanicus</i> <i>Phalacrocorax penicillatus</i>	18S, 28S, ITS1, CYTB, ROPB,	Wünschmann et al. (2009); Wünschmann et al. (2010); Konradt et al. (2017); Acosta et al. (2018); Bamac et al. (2020)
<i>S. falcatula-like</i>	<i>Melopsittacus undulatus</i>	18S, ITS1	Dubey et al. (2000a); Gallo et al. (2017)
<i>S. fulicae</i>	<i>Fulica atra</i>	18S, 28S, ITS1	Prakas et al. (2018a)
<i>S. halioti</i>	<i>Haliaeetus albicilla</i> <i>Phalacrocorax carbo</i> <i>Athene noctua</i> <i>Milvus migrans</i> <i>Circus aeruginosus</i>	18S, 28S, COX1, ITS1	Gjerde, Vikøren e Hamnes, (2018); Prakas et al. (2018b); Maier-Sam et al. (2021); Prakas et al. (2021)

Tabela 1 – Relação de estudos com detecção molecular de *Sarcocystis* em aves

(conclusão)

<i>Sarcocystis</i>	Aves	Dados moleculares	Referências
<i>S. jamaicensis</i>	<i>Buteo jamaicensis</i>	18S, 28S, ITS1, cox1	Verma et al. (2017)
<i>S. kutkienae</i>	<i>Corvus corax</i>	18S, 28S, ITS1	Prakas, Butkauskas e Juozaitytė-Ngugu (2020)
<i>S. lari</i>	<i>Larus marinus</i> <i>Haliaeetus albicilla</i>	18S, 28S, ITS1	Prakas et al. (2014a); Gjerde, Vikøren e Hammes, (2018)
<i>S. lindsayi</i>	<i>Melopsittacus undulatus</i>	ITS1	Dubey, Rosenthal e Speer, (2001)
<i>S. ovalis</i>	<i>Corvus macrorhynchos</i>	18S	Irie et al., (2017)
<i>S. ramphastosi</i>	<i>Ramphastos</i> <i>sulfuratus</i>	18S	Dubey et al. (2008)
<i>S. rileyi</i>	<i>Anas platyrhynchos</i> <i>Anas</i> spp. <i>Somateria mollissima</i>	18S, 28S, ITS1, COX1	Kutkienė et al. (2011); Prakas et al. (2014b); Gjerde (2014)
<i>S. turdusi</i>	<i>Turdus merula</i> <i>Accipiter</i>	18S, 28S, ITS1	Kutkienė et al. (2012b); Mayr et al. (2016)
<i>S. wobeseri</i>	<i>Larus argentatus</i> <i>Haliaeetus albicilla</i>	18S, 28S, ITS1, RNA polymerase B (rpoB)	Prakas et al. (2011); Shadbolt et al. (2021)

Fonte: elaborado pela autora.

*T. gondii* foi identificado pela primeira vez em um roedor norte-africano (*Ctenodactylus gondi*) no Instituto Paster da Tunísia (NICOLLE; MANCEAUX, 1908) e, no mesmo ano em coelhos no Instituto Biológico de São Paulo (SPLENDORE, 1908). A nomenclatura foi proposta por Nicolle e Manceaux (1909) com base na forma do estágio infeccioso (toxon: arco - plasma: vida – gondii: pode ter resultado de um erro de grafia do hospedeiro original, o gundi). *T. gondii* pertence a Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 2002). Acomete espécies de aves silvestres, como gaio-comum (*Garrulus glandarius*), grifo-eurasiático (*Gyps fulvus*), milhano-preto (*Milvus migrans*) e pega-rabilonga (*Pica pica*) (DARWICH et al., 2012).

O protozoário *N. caninum* foi descrito pela primeira vez por Bjerckås, Mohn e Presthus (1984) associado a lesões em regiões do sistema nervoso central e musculatura esquelética de cães. Considerando sua semelhança morfológica com *T. gondii* foi identificado erroneamente até que Bjerckås e Presthus (1988) pesquisaram as características ultraestruturais dos cistos e mostraram que esses dois organismos eram diferentes. Dubey et al. (1988) reconheceu *N.*



*caninum* como uma nova espécie. O *N. caninum* pertence a Sub-família Toxoplasmatinae e Gênero *Neospora*, acomete mamíferos domésticos e selvagens (GONDIM, 2006).

Em estudo experimental, espécies de aves carnívoras com potencial para ser hospedeiras definitivas de *N. caninum* foram avaliadas, onde verificou-se que gaviões (*Buteo jamaicensis*), urubus (*Cathartes aura*), corujas-das-torres (*Tyto alba*) e corvos americanos (*Corvus brachyrhynchus*) provavelmente não são hospedeiras definitivas (BAKER et al., 1995). Pombos (*Columba livia*) foram experimentalmente infectados e demonstraram que *N. caninum* pode se replicar nos tecidos e induzir a soroconversão de IgG específica do parasita neste hospedeiro, com este estudo os autores concluíram que aves podem ser consideradas hospedeiras intermediárias (MINEO et al., 2009; 2011).

Costa et al. (2008) relatou pela primeira vez a infecção em aves (galinha caipira) naturalmente infectadas com *N. caninum*. Além disso, um total de 40 pardais (*Passer domesticus*) foram testados para presença de DNA, sendo detectado *N. caninum* em 3 aves (7.5%) (GONDIM et al., 2010). Utilizando a técnica de PCR foi detectado ácidos nucleicos de *N. caninum* em cérebro de uma águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo*) e duas pega-rabilonga (*Pica pica*) (DARWICH et al., 2012). Testes sorológicos (IFAT e MAT) e moleculares (Nested-PCR) confirmaram a infecção de corvos (*Corvus cornix*, *C. monedula* e *C. splendens*) com *N. caninum* em Israel (SALANT et al., 2015) e DNA deste parasita foi encontrado no cérebro de pombos na China (DU et al., 2015).

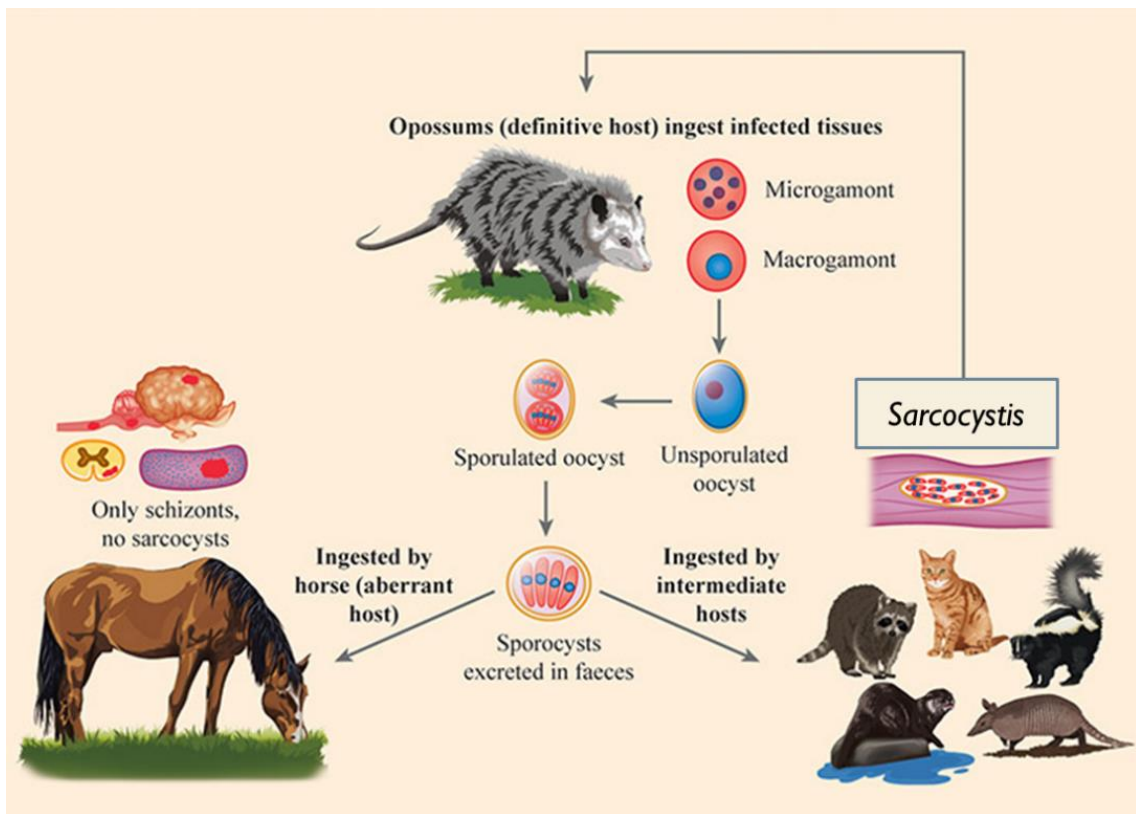
## 2.2 CICLO DE VIDA

O ciclo biológico dos parasitas *Sarcocystis* spp., *T. gondii* e *N. caninum* é heteróximo, sendo necessários pelo menos dois hospedeiros, dessa forma, no hospedeiro definitivo ocorre o desenvolvimento da fase sexuada e no hospedeiro intermediário a fase assexuada (DOMENIS et al., 2011; DUBEY, 2002; GONDIM et al., 2004).

O gênero *Sarcocystis* apresenta um ciclo biológico baseado na relação presa/predador, são descritos como hospedeiros definitivos os predadores carnívoros e onívoros, em especial o cão e o gato e como hospedeiros intermediários, herbívoros ou onívoros (DOMENIS et al., 2011; RUAS; CUNHA; SILVA, 2001). No hospedeiro definitivo a infecção ocorre através da ingestão de carne contendo sarcocistos e o parasito desenvolve seu ciclo sexuada no intestino culminando na eliminação de oocistos contendo em seu interior dois esporocistos similares, com quatro esporozoítos cada (RUAS; CUNHA; SILVA, 2001). Os oocistos ou esporocistos do *Sarcocystis* spp. eliminados pelas fezes do hospedeiro definitivo quando ingeridos pelo

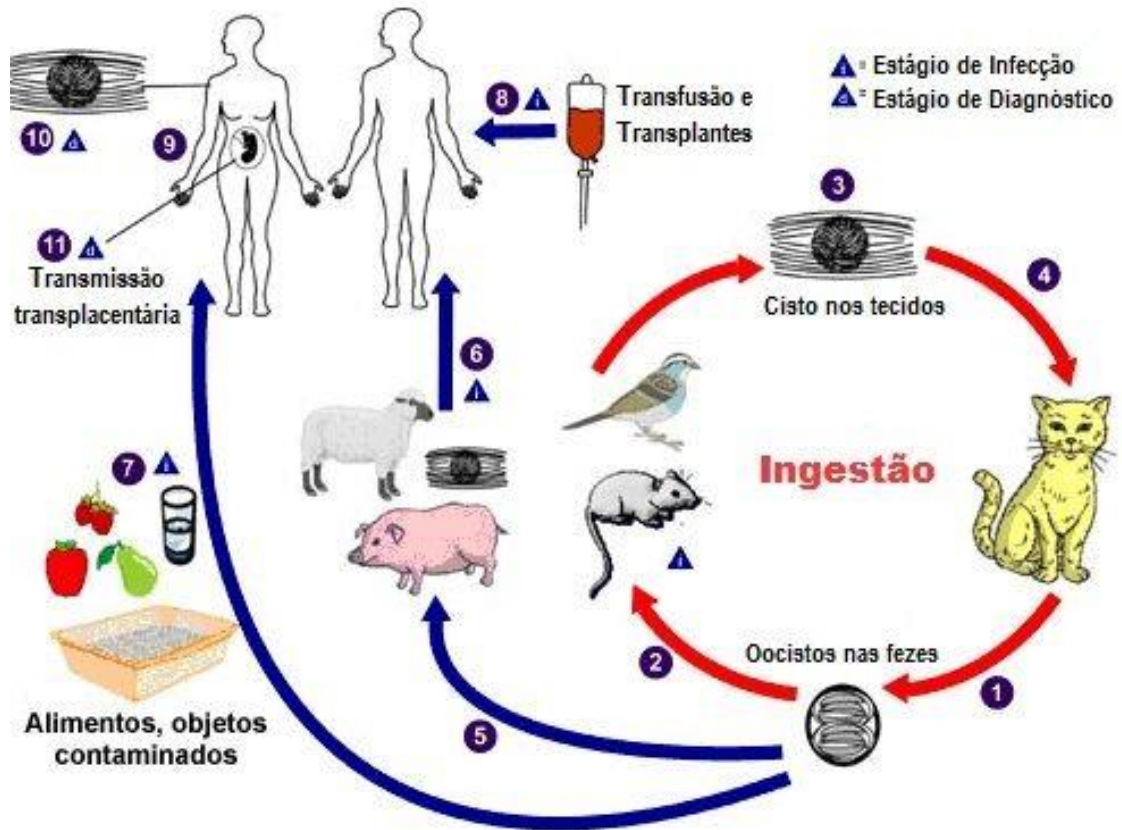
hospedeiro intermediário se rompem e liberam esporozoítos infectantes, estes penetram na mucosa intestinal, sendo disseminados pelo sistema vascular (REYS, 2008; STELMANN; AMORIM, 2010).

Figura 2 – Ciclo biológico do *Sarcocystis*



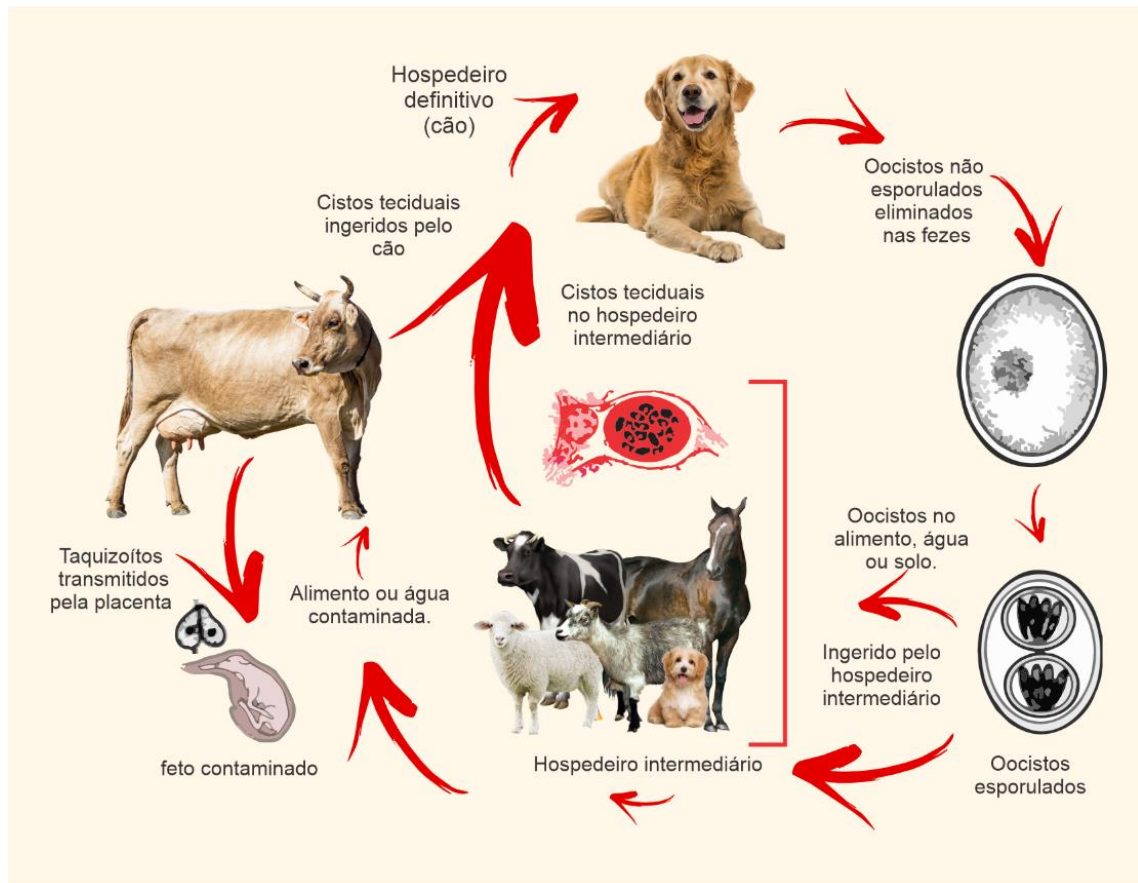
Fonte: Adaptado de Dubey et al. (2015).

O *T. gondii* tem como hospedeiro definitivo os felídeos domésticos e selvagens e como hospedeiros intermediários as aves, herbívoros, carnívoros e mamíferos marinhos (baleias e golfinhos) (DUBEY, 2002). A infecção nos hospedeiros definitivos pode ocorrer através da ingestão de tecidos de outras espécies animais contendo cistos (bradizoítos), pela ingestão de oocistos esporulados ou pode acontecer transmissão transplacentária (DUBEY, 2003). Os hospedeiros intermediários podem se infectar através da ingestão de oocistos esporulados no meio ambiente (solo, água) e/ou ingestão de cistos teciduais viáveis (DUBEY, 2002).

Figura 3 – Ciclo biológico do *T. gondii*

Fonte: Adaptado de cdc.gov (CDC – Toxoplasmosis).

O *N. caninum* tem como hospedeiros definitivos os carnívoros (GONDIM et al., 2004; MCALLISTER et al., 1998). Inicialmente os cães (*Canis familiaris*) foram descritos como hospedeiros definitivos no ciclo de vida de *N. caninum* (MCALLISTER et al., 1998), posteriormente estudos incluíram outros canídeos como hospedeiros definitivos, são eles o coiole (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010), e o lobo cinza (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011). Mamíferos e aves são descritas como hospedeiros intermediários através de técnicas moleculares (ČOBÁDIOVÁ et al., 2013; TRUPPEL et al., 2010). Os caninos podem ser infectados naturalmente pela ingestão de cistos, pela ingestão de placentas infectadas de bovinos e músculos infectados ou ainda ser infectado através da transmissão vertical (BERTOCCO; BERTOCCO; NEVES, 2008).

Figura 4 – Ciclo biológico do *N. Caninum*

Fonte: Adaptado de Dubey (2003).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA E INFECÇÃO POR *Sarcocystis* spp., *T. gondii* e *N. Caninum* EM AVES

O gênero *Sarcocystis* apresenta mais de 220 espécies, sendo que as aves podem servir como hospedeiros definitivos e intermediários (PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012). Um surto de Sarcocistose foi relatado em aves da família Psittacidae na cidade de Foz do Iguaçu, Paraná, onde 38 animais infectados por *S. falcatula* morreram num período de 15 meses (GODOY et al., 2009). Na América do Sul, outras espécies foram descritas, como *S. falcatula-like* (DUBEY et al., 2000a) e *S. lindsayi* (DUBEY et al., 2001).

*Didelphis albiventris* e *Didelphis virginiana* são considerados hospedeiros definitivos para *S. speeri* (DUBEY et al., 2000b). Além disso, *S. falcatula* e *S. neurona* usam *Didelphis* spp. como hospedeiros definitivos (GONDIM et al., 2021). Na América do Sul podem atuar como hospedeiros definitivos *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. marsupialis*, *D. imperfecta* e *D. pernigra* (CERQUEIRA, 1985; LEMOS; CERQUEIRA, 2002).

Na América do Norte, o *S. falcatula* tem como hospedeiro intermediário aves das Ordens Psittaciformes, Passeriformes e Columbiformes conforme estudo nas espécies a seguir: canários (*Serinus canarius*), mandarim (*Poephila guttata*), periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), pombo doméstico (*Columba livia*), galinhas (*Gallus gallus*) e galinha d'angola (*Numida meleagris*) (BOX; SMITH, 1982).

Morfolgicamente os esporocistos de *S. neurona*, *S. falcatula* e *S. speeri* são similares, podendo ser distinguidos por sua patogenicidade e infectividade em aves e camundongos imunodeficientes: *S. speeri* e *S. neurona* não são infecciosos para *Melopsittacus undulatus*, mas são infecciosos para camundongos nocaute (KO) do gene interferon gama e, as espécies *S. falcatula* e *S. lindsayi* são infectantes para *Melopsittacus undulatus*, mas não para camundongos KO (DUBEY et al., 2016).

A toxoplasmose está mundialmente distribuída, apresentando índices de soropositividade variando de acordo com fatores climático, socioeconômicos e culturais (FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009). A forma infecciosa de *T. gondii* (cistos teciduais) estão presentes nos tecidos musculares dos hospedeiros intermediários, incluindo as aves e a ingestão de carne de ave infectada é considerada uma importante fonte de infecção para humanos. Estudos relatam surtos de toxoplasmose em humanos a partir do consumo de carne mal cozida, água e verduras contaminadas com oocistos infectantes (DIAS; FREIRE, 2005; NAVARRO; FREIRE; PASSOS, 1994).

Diariamente muitas aves são predadas por felídeos, especialmente pelos gatos de rua (ALI, 2016; CRAY, 2011). Os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos de *T. gondii* e excretam oocistos nas fezes contaminando o meio ambiente (DUBEY, 2002). A infecção dos felídeos pelo protozoário *T. gondii* provavelmente ocorre por predação de aves e roedores infectados (DUBEY; FELIX; KWOK, 2010). No Brasil, infecção por *T. gondii* tem sido relatada em aves domésticas no Espírito Santo (BELTRAME et al., 2012), Rio Grande do Sul (CAMILLO et al., 2015) e Recife (FERNANDES et al., 2016) com índices de ocorrência entre 16,7% e 74,4% através de testes de Hemaglutinação Indireta (HAI), Aglutinação Modificada (MAT), Imunofluorescência Indireta (IFI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

*T. gondii* foi relatado por Gennari et al. (2016) em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), onde foram encontrados anticorpos anti-*T. gondii* em 72 (72%) das 100 amostras analisadas. Outro estudo em aves silvestres na Espanha detectou 12 (6%) de um total de 200 amostras de tecido cerebral positivos para *T. gondii* utilizando a técnica de PCR (DARWICH et al., 2012).

Nardoni et al. (2019) avaliou a ocorrência de infecção por *T. gondii* em 216 aves de vida livre por IFI e PCR. Do total de aves, vinte e cinco (11,6%) apresentaram anticorpos e dezenove delas (8,8%) também foi detectado DNA de *T. gondii*. Apesar de estudos demonstrarem a presença de *T. gondii* em várias espécies de aves silvestres, uma grande variedade de espécies permanece com diagnóstico desconhecido (DUBEY, 2009).

DNA de *N. caninum* tem sido detectado em diferentes espécies de aves. Salant et al. (2015) realizou um estudo em três espécies de corvos em diferentes áreas de Israel, confirmando através da técnica de PCR que *Corvus cornix* e *Corvus monedula* foram positivas para presença de DNA de *N. caninum*. Na Espanha, amostras de cérebro de dois *Pica pica* e de um *Buteo buteo* foram positivos para *N. caninum* utilizando métodos moleculares (DARWICH et al., 2012). A presença de aves junto a criação de bovinos tem sido associada a surtos de aborto e proposto como fator de risco para infecção por *N. caninum* (OTRANTO et al., 2003; OULD-AMROUCHE et al., 1999).

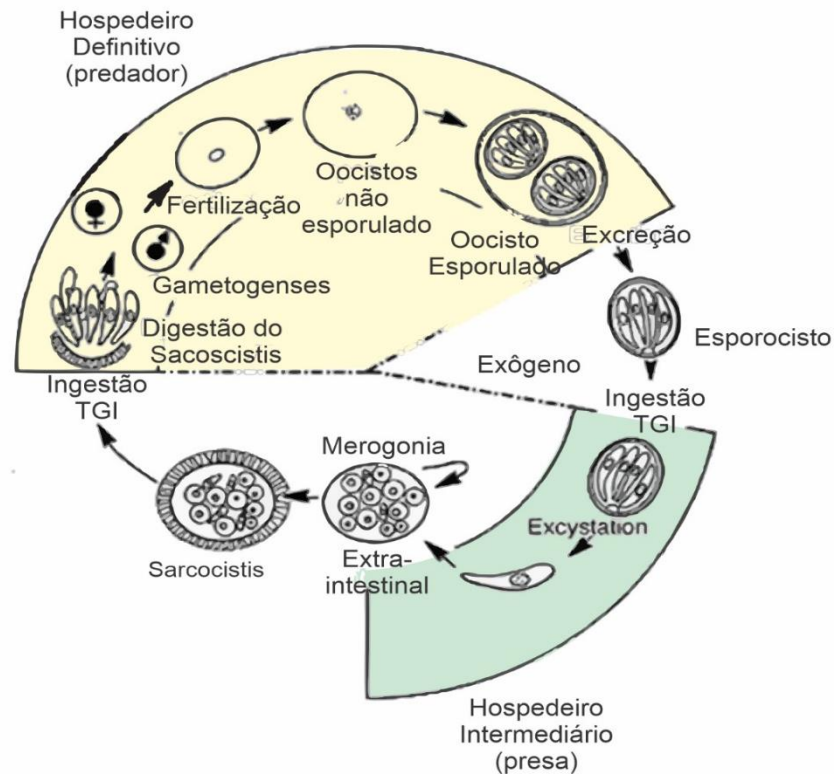
## 2.4 PATOGENIA

Na Sarcocistose o hospedeiro definitivo se infecta através da ingestão de carne contendo sarcocistos e o parasito desenvolve seu ciclo sexuado no intestino culminando na eliminação de oocistos contendo em seu interior dois esporocistos similares, com quatro esporozoítos cada (RUAS; CUNHA; SILVA, 2001). Os bradizoítos oriundos dos sarcocistos adentram na lâmina própria intestinal onde os estágios sexuais (microgametas e macrogametas) se desenvolvem. No hospedeiro definitivo o oocisto é esporulado produzindo dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos. Estes esporocistos livres normalmente podem ser observados nas fezes destes animais (REYS, 2008; STELMANN; AMORIM, 2010).

No hospedeiro intermediário a infecção por *Sarcocystis* spp. ocorre através da ingestão dos oocistos ou esporocistos eliminados pelas fezes do hospedeiro definitivo. Os esporocistos se rompem e liberam esporozoítos infectantes, estes penetram na mucosa intestinal, são disseminados pelo sistema vascular e desenvolvem-se intracelularmente nas células endoteliais dos capilares e em outros pequenos vasos (REYS, 2008; STELMANN; AMORIM, 2010). No interior da célula os esporozoítos se tornam multinucleados, transformando-se em esquizontes que produzem numerosos merozoítos podendo ser liberados no sistema vascular por meio do rompimento da célula hospedeira. Os merozoítos penetram nas células musculares cardíacas e esqueléticas, transformam-se em sarcocistos, formando

cistos nos tecidos musculares, repletos de bradizoítos, sendo que algumas espécies podem desenvolver outras merogonias teciduais (STELMAN; AMORIM, 2010; TENTER; HECKEROTH, 1999).

Figura 5 – Patogenia e formas apresentadas pelo *Sarcocystis* durante suas fases de desenvolvimento nos hospedeiros definitivos e intermediários



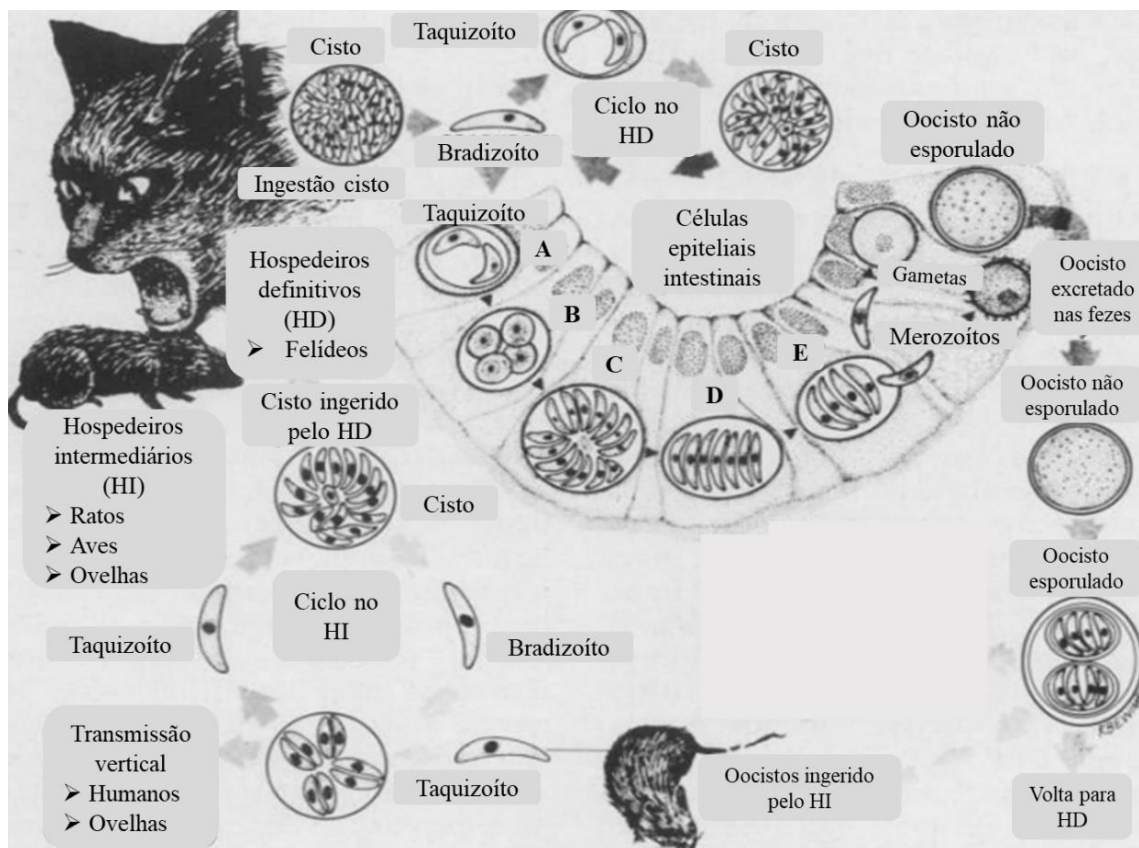
Fonte: Adaptado de Gardiner, Fayer e Dubey (1998).

O parasita *T. gondii* pode assumir três formas, são elas: taquízoítos (livres ou em grupos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos). Nos hospedeiros intermediários são encontrados os taquízoítos e cistos teciduais, onde ocorrem duas fases de desenvolvimento assexuado, sendo que na primeira fase os taquízoítos invadem as células e se multiplicam rapidamente por endodiogenia, levando à formação de pseudocistos que se rompem e liberam taquízoítos que disseminam para vários tecidos, podendo atingir os olhos, os músculos esquelético e cardíaco e o sistema nervoso central. Os taquízoítos se transformam em bradizoítos iniciando a segunda fase de desenvolvimento assexuado (DUBEY; BEATTIE, 1988; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Os bradizoítos formam os cistos teciduais, multiplicando-se lentamente por endodiogenia, desenvolvem-se preferencialmente em tecidos musculares e neurais e podem

persistir por toda a vida do hospedeiro (fase crônica). Após a ingestão pelo hospedeiro definitivo, no intestino a parede do cisto contendo bradizoítos é digerida por enzimas proteolíticas, liberando os bradizoítos na luz intestinal, esses invadem as células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento da fase assexuada (esquizogonia) com formação de esquizontes e liberação de merozoítos, os quais iniciam a fase sexuada (gamogonia) culminando com a produção de oocistos não esporulados (imaturos ou não infecciosos) que são eliminados pelas fezes. Em condições ambientais ótimas de temperatura, umidade e oxigenação entre 1 e 5 dias ocorre a esporogonia, permitindo o desenvolvimento de oocistos esporulados infectantes (DUBEY et al., 1998). Quando o hospedeiro intermediário ingerir oocistos esporulados os esporozoítos são liberados no trato digestório, invadindo as células do epitélio intestinal, fibroblastos e leucócitos, multiplicando-se como taquizoítos, podendo disseminar-se por todo o organismo. Depois de alguns ciclos de multiplicação, os taquizoítos originam novos cistos teciduais contendo bradizoítos (DUBEY et al., 1998; DUBEY; BEATTIE, 1988).

Figura 6 – Patogenia e formas apresentadas pelo *T. gondii* durante as fases de desenvolvimento nos hospedeiros definitivos e intermediários

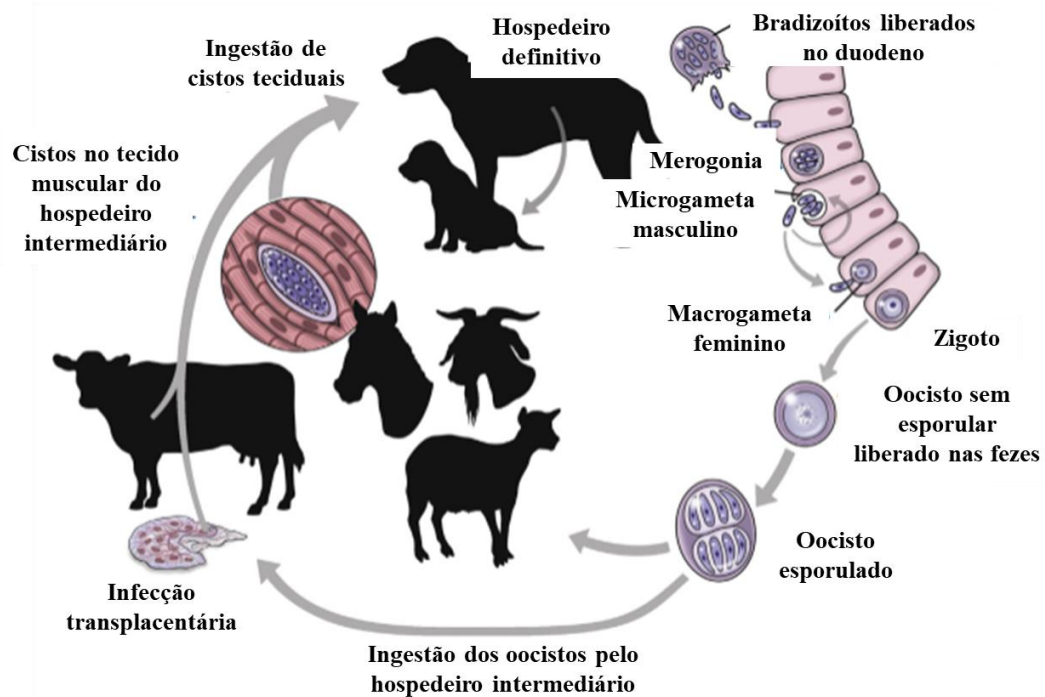


Fonte: Adaptado de Fayer (1981).



Oocistos não esporulados de *N. caninum* são excretados pelos hospedeiros definitivo no ambiente (TRESS; WILLIAMS, 2005), esses oocistos esporulam através das condições ambientais favoráveis, sendo ingeridos pelo hospedeiro intermediário, chegando a luz intestinal, são liberados nas células da parede do intestino, passando a se chamar de taquizoítos, que se dividem rapidamente por endodiogenia podendo atingir qualquer célula do organismo do hospedeiro, como: hepatócitos, células epiteliais renais, macrófagos, fibroblastos, miócitos e células nervosas. Os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos (forma de multiplicação lenta contidas em cistos teciduais) com a resposta imune do hospedeiro. Quando o hospedeiro definitivo ingerir estes cistos, os bradizoítos iniciarão o processo de penetração no epitélio intestinal dando origem às formas resultantes da multiplicação assexuada e sexuada do parasito. Posteriormente, ocorre a liberação de oocistos não esporulados no ambiente, reiniciando o ciclo (DUBEY, 2003).

Figura 7 – Patogenia e formas apresentadas pelo *N. caninum* durante as fases de desenvolvimento nos hospedeiros definitivos e intermediários



Fonte: Adaptado de Sykes (2013).

## 2.5 SINAIS CLÍNICOS

Na Sarcocistose, a apresentação de sinais clínicos está relacionada a espécie hospedeira envolvida, a dose infectante de oocistos ingerido, a localização do parasita e da

imunidade do hospedeiro intermediário (LINDSAY et al., 1995). Nos casos de infecção podem ocorrer obstrução vascular com esquizontes presentes no endotélio de artérias, capilares e veias, além disso, pode levar ao comprometimento de órgãos, como o cérebro, fígado, baço, rim, intestino e pulmão (DUBEY et al., 2016). Em aves acometidas por *Sarcocystis* spp. geralmente não se observam sinais clínicos aparentes, entretanto, alguns dos sinais clínicos observados podem incluir dispneia, letargia, perda de peso, penas eriçadas e hemorragia (CLUBB; FRENKEL, 1992; GONDIM et al., 2017).

Nos casos de infecção grave pode causar perda de tecido muscular resultando em claudicação e fraqueza, sendo que os efeitos debilitantes de infecções graves podem aumentar a susceptibilidade das aves a predação. Caso se desenvolva lesões visíveis no tecido muscular esquelético ou cardíaco, pode-se observar cistos cilíndricos de cor creme (os macrocistos) que se assemelham a grãos de arroz (TUGGLE; FRIEND, 1999).

As aves podem ser infectadas pelo *T. gondii*, entretanto, na maioria das vezes, a infecção é assintomática (DUBEY, 2002). A gravidade da infecção por *T. gondii* em aves pode variar de subclínicas, agudas a fatais (DUBEY, 2008). De acordo com a localização da lesão no Sistema Nervoso Central podem ocorrer sinais como alteração do comportamento, ataxia, tremores, convulsões, paresias e paralisias progressivas (DUBEY, 2009). Nos animais, a doença é caracterizada por distúrbios reprodutivos, principalmente nas espécies consideradas mais susceptíveis, que são ovinos, caprinos e suínos (GARCIA et al., 1999; PESCADOR et al., 2007).

Os sinais clínicos da neosporose em aves são desconhecidos. Cães de qualquer idade podem ser acometidos por *N. caninum*, manifestando-se de forma generalizada, envolvendo vários órgãos. A pele pode ser afetada, ocorrendo o desenvolvimento de lesões cutâneas. A forma mais grave geralmente ocorre nos animais jovens que foram congenitamente infectados, apresentando paresia dos membros pélvicos, podendo progredir para paralisia. Podendo apresentar ainda dificuldade na deglutição, com paralisia da mandíbula, atrofia muscular e falha cardíaca (DUBEY, 2003). Em neonatos, *N. caninum* pode causar infecção fatal no cérebro e medula (encefalite e mielite) em cães, veados, cavalos, ovelhas e bezerras congenitamente infectados (REICHEL; ELLIS, 2006). Em geral, os sinais clínicos variam conforme a abrangência da lesão no sistema nervoso periférico e central (DUBEY, 2003). Em bovinos causa problemas reprodutivos, sendo considerado um dos principais agentes determinantes de abortos em bovinos (DUBEY, 2003).

## 2.6 DIAGNÓSTICO

A sarcocistose dificilmente é diagnosticada clinicamente, uma vez que os sinais clínicos são semelhantes a outras doenças. Nos tecidos dos hospedeiros podem ser observados cistos de *Sarcocystis* utilizando técnicas histológicas. Porém, encontrar o parasita em material histológico não significa necessariamente que *Sarcocystis* spp. seja a causa da doença, pois o parasita pode estar presente nos tecidos do hospedeiro por muitos anos sem causar sinais clínicos (SAVINI et al., 1997).

O diagnóstico através de testes sorológicos que detectam anticorpos específicos para *Sarcocystis* spp. tem grande importância. A confirmação de sarcocistose clínica pode ser realizada observando a presença de IgM, pois são indicativos de infecção aguda. Considerando a detecção de IgG específica seria mais útil para o diagnóstico de infecção crônica. Assim, podemos considerar os testes sorológicos como auxiliares para confirmação do diagnóstico da infecção. Podem ser utilizados os seguintes testes: imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA, Western Blotting e DOT-BLOT (SAVINI et al., 1997).

Os testes moleculares vêm sendo amplamente utilizados no diagnóstico do gênero *Sarcocystis* contribuindo para o esclarecimento de pontos anteriormente destacados como a biologia do parasito, a diferenciação de espécies morfológicamente iguais e a relação entre parasito e hospedeiro (DOMENIS et al., 2011; PRAKAS et al., 2012). São destaques entre os métodos de diagnóstico molecular devido a sua prevalência de escolha como metodologia de estudo na detecção e diferenciação de espécies de *Sarcocystis* spp.: PCR, nested-PCR e RFLP.

Em grande parte dos estudos para identificação das espécies de *Sarcocystis* o gene 18S rRNA tem sido usado, pois a sequência desta região é altamente conservada (DUBEY et al., 2015). No entanto, algumas espécies de *Sarcocystis* não diferem neste locus ou possui uma variação muito baixa tornando difícil sua diferenciação, isso pode ser observado em espécies, como *S. neurona* e *S. falcatula*, que inicialmente foram consideradas sinônimas por apresentar pequenas diferenças nesta região (DAME et al., 1995). Para identificar espécies de *Sarcocystis* que utilizam aves como hospedeiros intermediários o gene 18S rRNA não é considerado suficientemente variável (PRAKAS et al., 2014).

Diversos estudos que buscam a caracterização molecular de espécies de *Sarcocystis* que infectam aves tem utilizado o primeiro espaço transcrito (ITS1) associado ao gene 28S (BAMAC et al., 2020; PRAKAS et al., 2021). Além disso, estudos utilizam a associação dos

lôcus 18S, 28S e ITS1 para classificação filogenética de espécies de *Sarcocystis* (DUBEY et al., 2015; GJERDE; VIKØREN; HAMNES, 2018; PARMENTIER et al., 2019).

O ITS1 é um fragmento encontrado em eucariotos entre as regiões de genes codificadores de DNA ribossômico 18S e 5.8S, por estar presente em várias cópias do genoma sua utilização tem como vantagem sua sensibilidade e universalidade (ALVAREZ; WENDEL, 2003). O gene 28S possui uma região bem conservada que através de diferentes primers tem auxiliado na diferenciação entre espécies de *Sarcocystis* (KUTKIENĖ et al., 2008; OLIAS et al., 2010).

No diagnóstico da toxoplasmose podem ser utilizados exames sorológicos, histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares (DUBEY et al., 1993; DUBEY; BEATTIE, 1988). Os exames sorológicos, como a imunofluorescência indireta (IFI) e teste de aglutinação modificado (MAT), permitem a observação de anticorpos específicos anti-*T. gondii* (ANDRADE et al. 2016; GODOI et al., 2010).

O exame histológico é uma forma de diagnóstico utilizado para aves submetidas a necropsia, sendo que em cortes histológicos, os taquizoítos são globulares a oval. A coloração de imuno-histoquímica com anticorpos específicos para *T. gondii* pode auxiliar no diagnóstico (DUBEY, 2002). O bioensaio em camundongos para isolamento de *T. gondii* pode ser uma alternativa interessante de diagnóstico quando o número de cistos é baixo (DUBEY et al., 2009). O DNA de *T. gondii* pode ser detectado usando iniciadores específicos para amplificação do gene 18S rRNA através das técnicas de PCR ou *Nested-PCR* (GONDIM et al., 2010). O gene repetitivo de 529 pares tem sido amplamente utilizado por ser altamente específico, pois apresenta de 200 a 300 cópias no genoma do parasito (HOMAN et al., 2000).

O diagnóstico da neosporose deve ser realizado de uma forma completa e sempre que possível devem ser realizadas a observação dos sinais clínicos, aliados aos exames ante-mortem, no entanto, os sinais inespecíficos dificultam o diagnóstico clínico da doença (ANDREOTTI et al., 2003). Podem ser utilizados testes sorológicos, sendo que a imunofluorescência indireta foi o primeiro teste sorológico desenvolvido e é considerada a técnica mais comumente utilizada dos diagnósticos sorológicos (DUBEY et al., 1996; KONELL et al., 2019). Além da imunofluorescência, os testes sorológicos frequentemente utilizados são ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e imunoblot (BOGER; HATTEL, 2003; HOANE et al., 2006; WOUUDA et al., 1997). O diagnóstico da neosporose foi aprimorado pela utilização de métodos moleculares, como a PCR, nesta técnica ocorre a amplificação de fragmentos de DNA do parasita, permitindo uma identificação rápida, altamente sensível e específica (DONAHOE et al., 2015). A região genômica Nc5 é um

exemplo de lócus conservado que pode ser utilizado para amplificação de DNA de *N. caninum* (DARWICH et al., 2019). Consequentemente o diagnóstico laboratorial é indispensável para confirmação da infecção, podendo ser realizada pelo diagnóstico parasitológico através dos exames histopatológico e imunoistoquímico, reação de cadeia polimerase (PCR) e isolamento dos parasitas (ANDREOTTI et al., 2003).

## 2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE

Os estudos sobre prevenção e controle de sarcocistose, toxoplasmose e neosporose em aves ainda é insuficiente para determinar as medidas a serem adotadas para evitar a doença nesses animais. No entanto, os ciclos biológicos desses parasitas em outras espécies animais é bem conhecido, sendo possível determinar maneiras de prevenir e controlar a infecção por estes parasitas. Medidas de higiene e manejo são necessárias para a prevenção da sarcocistose, sendo indispensável a educação sanitária e adoção de boas práticas na agricultura e pecuária, além do cozimento adequado das carnes antes de serem fornecidas aos carnívoros e destinadas ao consumo humano (AIMARIA et al., 2016).

Devido ao fato de não haver tratamento para infecção por *Sarcocystis* em seres humanos é importante realizar a vigilância epidemiológica através de testes diagnósticos em bovinos, humanos, fontes de água e produtos alimentícios destinados a humanos, e também em animais selvagens. A vigilância da fauna em ecossistemas naturais permite documentar a diversidade de parasitos e a sua potencial importância na etiologia das doenças na vida selvagem, pois estes têm sido identificados como agentes causadores do declínio destas populações (SMITH; ACEVEDO-WHITEHOUSE; PEDERSEN, 2009; THOMPSON; LYMEBRY; SMITH, 2010).

Algumas precauções devem ser tomadas, são elas: a) não fornecer carne crua ou mal cozida aos cães, felinos e animais selvagens, antes de serem bem cozidas para que os cistos sejam inviabilizados; ou então b) incinerar ou enterrar os animais mortos; c) manter os depósitos de grãos e alimentos cobertos para que não sejam contaminados com esporocistos (DUBEY; LINDSAY, 2006; LOPES, 2004).

Como medidas de controle da toxoplasmose deve-se notificar os surtos (2 ou mais casos) imediatamente às autoridades de vigilância epidemiológica, para que se desencadeie a investigação das fontes comuns e o controle da transmissão através de medidas preventivas (BRASIL, 2020). A infecção é prevenida através do cozimento adequado da carne e congelamento da mesma; deve-se eliminar as fezes juntamente com a areia onde os gatos

defecam para prevenir que os esporocistos se tornem infectantes; deve-se lavar a mão depois da manipulação de carne crua e após o contato com terra contaminada por fezes de gato (FOULON; NAESSENS; HO-YEN, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Como medida de prevenção da neosporose é procedente não fornecer carne ou vísceras cruas para carnívoros para evitar a transmissão horizontal, principalmente aqueles animais de áreas rurais, já que uma rota de infecção pós-natal pode ocorrer em cães. As placentas e fetos abortados devem ser descartados em locais adequados, para prevenir o seu consumo por cães (DUBEY et al., 2007). Deve-se fornecer rações comerciais para cães e isolar esses animais do contato com bovinos. Tem sido proposto também controlar a população de cães dentro e ao redor das fazendas, com medidas como esterilizar todos aqueles animais que não sejam desejados para a reprodução (DUBEY et al., 2007).

### 3 CAPÍTULO I – *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* AND *Sarcocystis* spp. IN SPECIES OF NATURALLY INFECTED BIRDS

Este capítulo originou um artigo científico que foi submetido a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

1 *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. in species of naturally infected birds

2

3

4 Alves M.E.M.<sup>1</sup>; Fernandes D.F.<sup>2</sup>; Bräunig P.<sup>2</sup>; Murer L.<sup>3</sup>; Minuzzi C.E.<sup>2</sup>; dos Santos H.F.<sup>3</sup>; Sangioni L.A.<sup>2</sup>; Vogel  
5 F.S.F.<sup>2</sup>

6

7

#### 8 ABSTRACT

9

10 *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Sarcocystis* spp. are parasites detected in tissues of  
11 domestic and wild animals. Birds are relevant in protozoa life cycles and epidemiology due the great  
12 variety of birds species, feeding and migratory habits. Therefore, the objective of the study was molecular  
13 detection of *T. gondii*, *N. caninum*, and *Sarcocystis* spp. in diverse species of naturally infected wild and  
14 domestic birds. Tissue samples were collected of 65 birds (65 brains and 65 hearts) during necropsy.  
15 Detecting nucleic acids (DNA) in tissue samples by the was carried using the Polymerase Chain Reaction  
16 technique (PCR). Genetic sequencing and phylogenetic analyses were conducted for to identify the species  
17 of this protozoan. *N. caninum* DNA was detected in two birds (02/65 – 3.07%), in brain sample of a  
18 *Rupornis magnirostris* and in brain and heart samples of a *Dendrocygna bicolor*. DNA from *Sarcocystis* spp.  
19 was detected in three birds (03/65 – 4.62%), in brain of a *Nymphicus hollandicus*, brains and hearts of a  
20 *Amazona aestiva* and a *Paroaria coronata*. *T. gondii* DNA was not detected in any tissues. No mixed  
21 infections were observed. This is the first report of DNA detection of *N. caninum*, *Sarcocystis* spp. and  
22 *Sarcocystis speeri* in tissue samples to these birds species extending the list of intermediate hosts.

23

24 **Key-words:** PCR, birds, brains, hearts, Apicomplexa.

25

26

#### 27 RESUMO

28

29 *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. são parasitas detectados em tecidos de animais  
30 domésticos e selvagens. As aves são relevantes no ciclo de vida e epidemiologia dos protozoários devido à  
31 grande variedade de espécies de aves, hábitos alimentares e migratórios. Portanto, o objetivo do estudo  
32 foi a detecção molecular de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em diversas espécies de aves selvagens  
33 e domésticas naturalmente infectadas. Amostras de tecido foram coletadas de 65 aves (65 cérebros e 65  
34 corações) durante a necropsia. A detecção de ácidos nucléicos (DNA) em amostras de tecido foi realizada  
35 pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Sequenciamento genético e análises filogenéticas

---

<sup>1</sup> Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio 63C, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. \*[marta.elenamachado@gmail.com](mailto:marta.elenamachado@gmail.com).

<sup>2</sup> Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio 63C, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio 44, Sala 5152, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

36 foram realizados para identificar as espécies deste protozoário. O DNA de *N. caninum* foi detectado em  
37 duas aves (02/65 - 3,07%), em amostra de cérebro de *Rupornis magnirostris* e em amostras de cérebro e  
38 coração de *Dendrocygna bicolor*. DNA de *Sarcocystis* spp. foi detectada em três aves (03/65 - 4,62%), em  
39 cérebro de *Nymphicus hollandicus*, cérebros e corações de *Amazona aestiva* e *Paroaria coronata*. O DNA de  
40 *T. gondii* não foi detectado em nenhum tecido. Não foram observadas infecções mistas. Este é o primeiro  
41 relato de detecção de DNA de *N. caninum*, *Sarcocystis* spp. e *Sarcocystis speeri* em amostras de tecido para  
42 essas espécies de aves estendendo a lista de hospedeiros intermediários.

43

## 44 1. INTRODUCTION

45

46 *T. gondii*, *N. caninum* and *Sarcocystis* spp. are widespread protozoa Apicomplexa organisms with  
47 heteroxenous life cycles with capacity of infecting a variety of domestic and wild animals and different  
48 degree of clinical importance in animals and man (Dubey 2010; Darwich et al., 2012; Nazir et al., 2018).  
49 Birds are susceptible to *T. gondii*, *N. caninum* and *Sarcocystis* spp. infection and they are considered  
50 intermediate hosts in these protozoa life cycles, consequently birds are important sources for humans and  
51 other animals infection (Dubey et al., 2021; Sato et al., 2020).

52 *T. gondii* infection in birds was described (Bachand et al., 2019; Ibrahim et al., 2018), as well as *N.*  
53 *caninum* infection in birds (Costa et al., 2008; Gondim et al., 2010). *Sarcocystis* species also had been  
54 detected in birds however, birds role in *Sarcocystis* life cycle is not complete determined (Konradt et al.,  
55 2017). Birds feeding habits as consumption of carcass (carnivore birds) or consumption of food and water  
56 touching the soil make possible birds infection by ingesting protozoa cysts or oocysts (Darwich et al.,  
57 2012; Dubey, 2010, al., 2020; al., Nardoni et al., 2019; Sato et al., 2020).

58 The role of birds in protozoa life cycles and epidemiology remains unclear (Dubey and Jones, 2008;  
59 Gondim et al., 2010; Sato et al., 2020). Besides that, studies showing the occurrence of *T. gondii*, *N.*  
60 *caninum* and *Sarcocystis* spp. in birds are scarce (Darwich et al., 2012; Konradt et al., 2017; Nazir et al.,  
61 2018). Therefore, the importance of domestic and wild birds in protozoa epidemiology needs more  
62 attention. So, the objective of this work was the molecular detection of *T. gondii*, *N. caninum* and  
63 *Sarcocystis* spp. in diverse species of naturally infected wild and domestic birds.

64

## 65 2. MATERIALS AND METHODS

66

### 67 2.1 Samples

68

69 Tissue samples (brains and hearts) were collected from 65 birds who died from different causes  
70 and destined to necropsy at the Avian Pathologies Diagnosis Central Laboratory (LCDPA) of the Federal  
71 University of Santa Maria (UFSM) were stored at -20°C until use DNA extraction is performed. The birds  
72 were classified in 33 species, belonging to 15 families (Accipitridae, Anatidae, Cacatuidae, Ciconiidae,  
73 Columbidae, Cracidae, Estrildidae, Fringillidae, Hirundinidae, Phasianidae, Psittacidae, Ramphastidae,  
74 Thraupidae, Turdidae and Tyranne) (Sick, 1997). Birds were free-living, domestic or originating from  
75 conservatories or maintainer located in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil (TABLE 1).

76

77



78 **Table 1.** Classification of the 65 birds in families, species and housing in the municipality of Santa Maria,  
 79 Rio Grande do Sul, Brazil.  
 80

Family	Scientific name	Number of animals	Origin
Accipitridae	<i>Rupornis magnirostris</i>	1	Maintainer
Anatidae	<i>Dendrocygna bicolor</i>	1	Maintainer
Cacatuidae	<i>Nymphicus hollandicus</i>	2	Domestic
Ciconiidae	<i>Ciconia maguari</i>	1	Wild
Columbidae	<i>Columbina passerina</i>	1	Wild
Columbidae	<i>Leptotila verreaux</i>	1	Wild
Columbidae	<i>Zenaida auriculata</i>	2	Wild
Cracidae	<i>Crax fasciolata</i>	2	Maintainer
Estrildidae	<i>Erythrura gouldiae</i>	1	Conservatory
Estrildidae	<i>Poephila cincta</i>	2	Conservatory
Estrildidae	<i>Taeniopygia guttata</i>	1	Conservatory
Fringillidae	<i>Serinus canaria</i>	3	Conservatory
Hirundinidae	<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	1	Wild
Phasianidae	<i>Chrysopholus pictus</i>	1	Conservatory
Phasianidae	<i>Lophura swinhoii</i>	1	Conservatory
Phasianidae	<i>Pavo cristatus</i>	1	Conservatory
Phasianidae	<i>Syrmaticus ellioti</i>	1	Conservatory
Psittacidae	<i>Amazona aestiva</i>	7	Maintainer
Psittacidae	<i>Amazona aestiva</i>	1	Conservatory
Psittacidae	<i>Amazona amazonica</i>	1	Maintainer
Psittacidae	<i>Amazona pretrei</i>	1	Conservatory
Psittacidae	<i>Amazona vinacea</i>	1	Maintainer
Psittacidae	<i>Ara chloropterus</i>	1	Maintainer
Psittacidae	<i>Melopsittacus undulatus</i>	2	Domestic
Psittacidae	<i>Myiopsitta monachus</i>	1	Domestic
Psittacidae	<i>Myiopsitta monachus</i>	1	Maintainer
Psittacidae	<i>Neophema splendida</i>	1	Conservatory
Psittacidae	<i>Neopsephotus bourkii</i>	5	Conservatory
Psittacidae	<i>Platycercus eximius</i>	6	Conservatory
Psittacidae	<i>Phorpus xanthopterygius</i>	1	Conservatory
Psittacidae	<i>Psephotus haematonotus</i>	2	Conservatory
Psittacidae	<i>Psephotus haematonotus</i>	1	Conservatory
Ramphastidae	<i>Ramphastos dicolorus</i>	3	Maintainer
Thraupidae	<i>Paroaria coronata</i>	5	Maintainer
Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i>	1	Wild
Tyrannidae	<i>Tyrannus savana</i>	1	Wild
15	33	65	

81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96

## 2.2 DNA extraction

A total of 130 fresh tissue samples (65 brains and 65 hearts) from birds were submitted to DNA extraction. DNA was extracted from 50 mg of tissue using commercial kit (Wizard® Genomic DNA Purification Kit-Promega), following manufacturer instructions with one modification, the lysis step was performed at 55 °C overnight, according to Moré et al., (2011). After extraction, DNA concentration was evaluated in all samples by measuring absorbance at 260 nm with ultraviolet light (NanoDrop 1000, ThermoScientific, USA) and DNA concentration of all samples was adjusted to approximately 100ng/ul. After that, DNA samples were stored at -20 °C until use.

## 97 2.3 Molecular detection

98

99 The diagnosis of infection by the protozoa *T. gondii*, *N. caninum* and *Sarcocystis* spp. was carried out  
100 by detecting nucleic acids (DNA) using the Polymerase Chain Reaction technique (PCR).

101

### 102 2.3.1 *T. gondii* PCR

103 Extracted DNA from birds tissues was submitted to PCR using specific primers TOX4  
104 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) and TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) were selected  
105 from the 5' and 3' for amplification of a repetitive gene 529 bp (Homan et al., 2000). Each PCR was  
106 performed in a total volume of 25 µL, containing 2.5 µl of 10X buffer (Promega, USA); 0.65 mM dNTPs  
107 (Ludwig Biotec, Brazil); 0.6 µM of each primer (Sigma-Aldrich, Brazil); 1U Taq DNA polymerase (Promega,  
108 USA); 1.25 mM MgCl and 100 ng of DNA as template. DNA extracted from tachizoites of *T. gondii* RH strain  
109 was used as positive control and MilliQ water was used as negative control. The PCR was carried out using  
110 a T100 thermal cycler (BioRad, USA) under the following conditions: 10 min at 95 °C for the initial hot  
111 denaturation step, followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 1 min at 65 °C, 1 min at 72 °C, and a final  
112 extension step of 5 min at 72 °C. The PCR products were visualized by UV illumination after  
113 electrophoresis at 1% agarose gel stained with Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, USA).

114

### 115 2.3.2 *N. caninum* PCR

116 PCR was performed using a set of primers Np6 (CAGTCAACCTACGTCTTC) and Np21  
117 (GTGCGTCCAATCCTGTAA) specific NC5 gene, sequence primers 5' and 3' amplifying a fragment of 328 bp  
118 (Yamage et al., 1996). Each reaction was made in a final volume of 25µl, containing 2.5 µl of 10X buffer, 0.5  
119 µM of each primer, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) (Kapa, Bio Systems, Boston, MA, USA),  
120 1 U of Taq DNA Polymerase GoTaq® (Hot Start Polymerase, Promega, Madison, WI, USA), 0.75 mM MgCl  
121 and 100 ng of DNA. DNA extracted from tachizoites of *N. caninum* NC1 strain was used as positive control  
122 and MilliQ water was used as negative control. The PCR was carried out using a T100 thermal cycler  
123 (BioRad, USA) under the following conditions: 5 min at 95 °C for the initial hot denaturation step, followed  
124 by 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 50 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension step of 10 min at 72 °C.  
125 The PCR products were visualized by UV illumination after electrophoresis at 1% agarose gel stained with  
126 Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, USA).

127

### 128 2.3.3 *Sarcocystis* spp. PCR

129 Detection of *Sarcocystis* spp. DNA by PCR was carried out using 2L  
130 (GGATAAACCGTGGTAATTCTATG) and 3H (GGCAAATGCTTTCGAGTAG), sequence primers 5' and  
131 3' amplifying a 900 bp fragment (Yang et al., 2001) with the aim of amplification of the 18S rRNA gene.  
132 Each PCR was performed in a total volume of 25 µL, containing 3ul of 10X buffer (Promega, USA); 1 mM  
133 dNTPs (Ludwig Biotec, Brazil); 1.2 uM of each primer (Sigma-Aldrich, Brazil); 1U Taq DNA polymerase  
134 (Promega, USA); 1.5 mM MgCl and 100 ng of DNA as template. DNA extracted from a pool of 50 cysts of  
135 *Sarcocystis* spp. was used as positive control and MilliQ water was used as negative control. The PCR was  
136 carried out using a T100 thermal cycler (BioRad, USA) under the following conditions: 2 min at 95 °C for  
137 the initial hot denaturation step, followed by 40 cycles of 40 s at 94 °C, 50 s at 56 °C, 6 s at 72 °C, and a  
138 final extension step of 6 min at 72 °C. The PCR products were visualized by UV illumination after  
139 electrophoresis at 1% agarose gel stained with Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, USA).

140

## 141 2.4 PCR inhibition test

142

143 Additional test was performed to determine whether PCR amplification may fail due the presence  
144 of PCR inhibitors in the samples.

145

### 146 2.4.1 Mixing positive and negative DNA templates

147 A possible effect of PCR inhibitors that could be present together with DNA templates which did not  
148 resulted in *N. caninum*, *Sarcocystis* spp. or *T. gondii* DNA amplification was tested by mixing positive  
149 control DNA templates with negative samples extracted from birds brain or heart fragments. Therefore,  
150 samples control positive were mixed 1:1; 5/5 µl with negative samples (15 brain and 15 heart) and  
151 submitted to same PCR conditions.

152

153

154

155

156 **2.5 Gene sequencing**

157

158 Positive PCR products for *N. caninum* and *Sarcocystis* spp. were purified using QIAquick® PCR  
 159 Purification Kit (Qiagen™, Germany) according to manufacturer instructions. Final purified DNA was  
 160 analyzed using spectrophotometer NanoDrop 1000 (ThermoScientific, USA) for concentration  
 161 determination. After PCR purification, the sequencing reactions were performed using 5 pmol of primers  
 162 separately, 30-60 ng of purified PCR product and MiliQ water in a final volume of 6 µl. Followed by  
 163 dehydration at 60 °C for 2 hours and finally submitted to sequencing (ACTGENE - Serviço de  
 164 Sequenciamento, Brazil). The results obtained were analyzed using StandenPackage software and the  
 165 generated nucleotide sequences evaluated in Genbank NCBI database blast search  
 166 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

167

168 **2.6 Gene identification and phylogenetic analysis**

169

170 Phylogenetic analyses were conducted separately for the 18S rRNA by using MEGA X software.  
 171 Sequence analyses were performed with the BLASTX software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).  
 172 Nucleotide sequences were aligned and compared to sequences from various hosts were downloaded  
 173 from GenBank database using ClustalW. The alignments were optimized with the BioEdit Sequence  
 174 Alignment Editor Program version 7.2. Phylogenetic analysis was carried out in MEGA-X. The confidence  
 175 of each branch in the phylogeny was estimated with bootstrap values calculated from 1000 replicates.

176

177 **2.7 Authorization for use tissue samples of dead bird**

178

179 This study was authorized by ICMBio (Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation) under  
 180 SISBIO (Biodiversity Authorization and Information System) registration number 76022-1. Animals' Use  
 181 Ethics Committee (CEUA) registration number 8263100820 because the study involves only dead animals  
 182 not necessary approval.

183

184 **3. RESULTS**

185

186 In the study, DNA from *T. gondii* was not detected in tissue sample, in addition to DNA from *N.*  
 187 *caninum* or *Sarcocystis* spp. was found in five birds (05/65- 7.69%) (TABLE 2). No mixed infections were  
 188 observed. *N. caninum* DNA was detected in two birds, in brain tissue of a *Rupornis magnirostris* and in  
 189 brain and heart tissues of a *Dendrocygna bicolor*. PCR identification was confirmed by DNA sequencing

190

191 *Sarcocystis* spp. DNA was detected by PCR in three birds: in brain tissue of a *Nymphicus hollandicus*,  
 192 in brain and heart of *Amazona aestiva* and in brain and heart of a *Paroaria coronata* (TABLE 2). The  
 193 samples tissue of the three birds were sequenced, but unsuccessful for brain and heart samples of a  
 194 *Paroaria coronata*. Genetic sequencing confirmed the presence of *Sarcocystis* spp. in the brain of a  
 195 *Nymphicus hollandicus* and *Sarcocystis speeri* in the brain and heart of a *Amazona aestiva* and the  
 196 sequences deposited in GenBank (accession numbers, respectively, MW463929; MW464125).

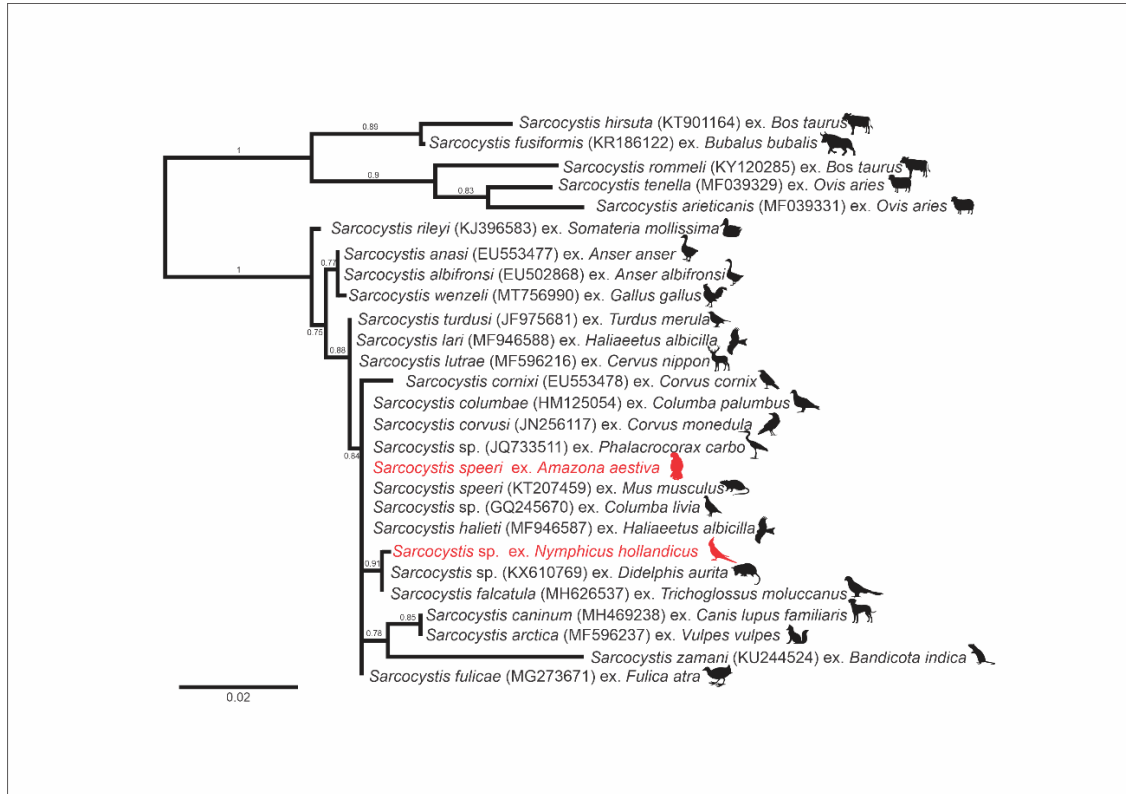
196

197 **Table 2.** *T. gondii*, *N. caninum* and *Sarcocystis* spp. nucleic acid detection in brain and heart of naturally  
 198 infected birds.

199

Scientific name	Number of animals tested	Number of animals positive	<i>T. gondii</i>		<i>N. caninum</i> (2/65 – 3.07%)		<i>Sarcocystis</i> spp. (3/65 – 4.62%)	
			Heart	Brain	Heart	Brain	Heart	Brain
<i>Rupornis magnirostris</i>	1	1	-	-	-	1	-	-
<i>Dendrocygna bicolor</i>	1	1	-	-	1	1	-	-
<i>Nymphicus hollandicus</i>	2	1	-	-	-	-	-	1
<i>Amazona aestiva</i>	7	1	-	-	-	-	1	1
<i>Paroaria coronata</i>	5	1	-	-	-	-	1	1
<b>Total</b>		5/65(7.69%)	0	0	1/65(1.54%)	2/65(3.07%)	2/65(3.07%)	3/65(4.62%)

200 Phylogenetic analysis based of the 18S rRNA (FIGURE 1) revealed that *Sarcocystis* spp. formed an  
 201 clade with *Sarcocystis* spp. that utilize *Didelphis aurita* as the known or presumed definitive host and  
 202 *Sarcocystis falcatula* that utilize *Trichoglossus moluccanus* as intermediate host. *Sarcocystis speeri* formed  
 203 an clade with *Sarcocystis speeri* that utilized *Mus musculus* (gamma interferon gene knockout mice) as  
 204 intermediate host in bioassay. Besides, formed an clade with *S. columbae*, *S. corvusi*, *S. halioti* and  
 205 *Sarcocystis* sp. that affect outers species birds.  
 206



207  
 208  
 209  
 210  
 211  
 212  
 213

**Figure 1.** Phylogenetic analysis of 18S rRNA sequences obtained from various hosts compared to representative members of Sarcocystidae family. The values between the branches represent the percent bootstrap value per 1000 replicates, and values below 70% are not shown.

#### 214 4. DISCUSSION

215

216 DNA from *T. gondii* was not detected in tissue sample. Although birds are more resistant to *T. gondii*  
 217 infection, DNA of *T. gondii* has already been detected in birds tissues in different countries (Gondim et al.,  
 218 2010; Lukášová et al., 2018). Birds eating habits involve direct contact with soil and water potentially  
 219 contaminated with sporulated oocysts, which is considered the most important form of *T. gondii* infection  
 220 for animals (Dubey, 2010). Therefore, the absence of *T. gondii* DNA in the analyzed birds samples was  
 221 unexpected due the wide environmental contamination with *T. gondii* (Dubey et al., 2021).

222 DNA detection suggests that there were infection of *N. caninum* in wild birds, demonstrating that  
 223 the positive detected birds were susceptibility to *N. caninum* infection and that birds were naturally  
 224 infected. However, infection in birds has been described by different authors and *N. caninum* DNA had  
 225 already been detected in sparrows tissues in Brazil (Costa et al., 2008; Gondim et al., 2010) and in other  
 226 places in the world as in woodpeckers and vultures in Spain (Darwich et al., 2012), in crows in Israel  
 227 (Salant et al., 2015) and pigeons in China (Du et al., 2015). A study demonstrated a higher prevalence of  
 228 Neosporosis in cattle in farms that have the presence of birds (Darwich et al., 2012). *N. caninum* infection  
 229 showed in the present study reinforce birds as an intermediate host and consequently serving as a source  
 230 of infection for definitive host.

231 DNA from *Sarcocystis* spp. was detected in the species *Nymphicus hollandicus* and *Paroaria*  
 232 *coronata*. Nucleic acids of *S. speeri* was detected in *Amazona aestiva*. In a Brazilian zoo described  
 233 *Sarcocystis* of the outbreak involving parakeets, cockatoos, parrots and pigeons (Ecco et al., 2008). In

234 South American, other species have been described, such *S. falcatula-like* (Dubey et al., 2000) and *S.*  
235 *lindsayi* (Dubey et al., 2001).

236 *S. speeri* was described and named by Dubey and Lindsay (1999), who used an experimental  
237 intermediate host (*Mus musculos*) susceptible to infection, but the natural intermediate hosts are  
238 unknown. *Didelphis albiventris* and *Didelphis virginiana* are considered definitive hosts for *S. speeri* (Dubey  
239 et al., 2000). Besides, *S. falcatula* and *S. neurona* use *Didelphis* spp. as definitive hosts (Gondim et al., 2021).  
240 In South America may act as definitive hosts *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. marsupialis*, *D. imperfecta* and *D.*  
241 *pernigra*. (Cerqueira, 1985; Lemos & Cerqueira, 2002). Studies report that *S. speeri* and *S. neurona* are not  
242 infective to *Melopsittacus undulatus*, but are infective to gamma interferon gene knockout (KO) mice and,  
243 species *S. falcatula* and *S. lindsayi* are infective to *Melopsittacus undulatus* but not to KO mice (Dubey et al.,  
244 2016).

245 In general, the *Nymphicus hollandicus*, *Amazona aestiva* and *Paroaria coronata* are classified as a  
246 granivorous birds and under natural conditions its diet consists of a wide variety of seeds, fruits, leaves,  
247 flowers and insects (Sick, 1997). The presence of DNA of parasites of gener *Sarcocystis*, in the present  
248 study, suggests these birds as intermediate host and also deduces that probably became infected by  
249 ingestion of contaminated water or food containing oocysts or *Sarcocystis*. Omnivorous or carnivorous  
250 have been identified as definitive hosts for *Sarcocystis* (Valadas et al., 2016).

251 The detection of *Sarcocystis* spp. and *S. speeri* in tissue samples from birds contribute to the  
252 extension of intermediate hosts. *Sarcocystis* spp. present a wide range of both definitive and intermediate  
253 hosts, and their detection in bird samples is extremely relevant, since birds are prey in the food chain of  
254 definitive hosts. Additionally, birds infected with *S. speeri* may be a risk factor for *D. albiventris* and *D.*  
255 *virginiana* infection when they ingest infected bird carcasses containing tissue cysts (Dubey and Lindsay,  
256 1999).

257 Diverse animal species are involved in *Sarcocystis* life cycle contributing to the wide protozoa  
258 distribution and previous studies had already demonstrated the presence of *Sarcocystis* in wild birds  
259 tissues (Prakas & Butkauskas, 2012). Therefore, DNA detection *N. caninum*, *Sarcocystis* spp. and *S. speeri*  
260 reinforce protozoa infection potential in wild and domestic birds species and the importance of birds in  
261 protozoa epidemiology.

262

## 263 5. CONCLUSIONS

264

265 This study, DNA of Neospora or *Sarcocystis* was detected in five birds. *N. caninum* nuclei acids were  
266 detected in tissue samples of naturally infected *Rupornis magnirostris* and *Dendrocygna bicolor*.  
267 *Sarcocystis* spp. DNA was detected in tissue samples *Nymphicus hollandicus* and *Paroaria coronata* and *S.*  
268 *speeri* DNA was detected in tissue samples *Amazona aestiva* of naturally infected.

269 This is the first report of DNA detection of *N. caninum*, *Sarcocystis* spp. and *S. speeri* in tissue  
270 samples to these birds species extending the list of intermediate hosts. Considering there is a great  
271 diversity of domestic and wild birds, studies that investigate their infection by protozoa are very relevant,  
272 since they clarify which species are host to the protozoa.

273

## 274 ACKNOWLEDGEMENTS

275

276 The authors are grateful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel  
277 (CAPES), Brazil, for the financial support.

278

## 279 REFERENCES

280

- 281 Bachand N., Ravel A., Leighton P., Stephen C., Ndao M., Avard E. & Jenkins E. 2019. Serological and  
282 molecular detection of *Toxoplasma gondii* in terrestrial and marine wildlife harvested for food in  
283 Nunavik, Canada. *Parasites and Vectors* 12, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3408-9>
- 284 Cerqueira R. 1985. The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae). *J*  
285 *Biogeogr* 12(2): 135-145. <http://dx.doi.org/10.2307/2844837>.
- 286 Costa K.S., Santos S.L., Uzêda R.S., Pinheiro A.M., Almeida M.A.O., Araújo F.R., McAllister M.M. & Gondim  
287 L.F.P. 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int. J.*  
288 *Parasitol.* 38, 157–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.008>
- 289 Darwich L., Cabezón O., Echeverria I., Pabón M., Marco I., Molina-López R., Alarcia-Alejos O., López-Gatius  
290 F., Lavín S. & Almería S. 2012. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the  
291 brain of wild birds. *Vet. Parasitol.* 183, 377–381. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.024>

- 292 Du L., Yang D., Zhai T., Gong P., Zhang X. & Li J. 2015. Detection of *Neospora caninum*-DNA in brain tissues  
 293 from pigeons in Changchun, Jilin (China). *Vet. Parasitol.* 214, 171–173.  
 294 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.005>
- 295 Dubey J.P., 2010. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, clinical  
 296 disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health* 57, 60–73.  
 297 <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x>
- 298 Dubey J., Calero-Bernal R., Rosenthal B., Speer C. & Fayer R. 2016. *Sarcocystosis of animals and humans*.  
 299 Boca Raton, Florida: CRC Press.
- 300 Dubey J. P., & Lindsay D. S. 1999. *Sarcocystis speeri* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the Opossum  
 301 (*Didelphis virginiana*). *The Journal of Parasitology*, 85(5), 903. doi:10.2307/3285830
- 302 Dubey J.P. & Jones J.L. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J.*  
 303 *Parasitol.* 38, 1257–1278. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007>
- 304 Dubey J.P., Murata F.H.A., Cerqueira-Cézar C.K., Kwok O.C.H. & Su C. 2021. Epidemiologic significance of  
 305 *Toxoplasma gondii* infections in turkeys, ducks, ratites and other wild birds: 2009-2020.  
 306 *Parasitology* 148, 1–30. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001961>
- 307 Dubey J.P., Rosenthal B.M. & Speer C.A. 2001. *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the  
 308 South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. *J Eukaryot Microbiol* 48(5): 595-603.  
 309 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00196.x> PMID:11596925.
- 310 Dubey J. P., Speer C. A., Bowman D. D., Horton K. M., Venturini C., & Venturini L. 2000. Experimental  
 311 Transmission of *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999 from the South American Opossum  
 312 (*Didelphis albiventris*) to the North American Opossum (*Didelphis virginiana*). *The Journal of*  
 313 *Parasitology*, 86(3), 624. doi:10.2307/3284885
- 314 Ecco R., Luppi M.M., Malta M.C.C., Araújo M.R., Guedes R.M.C. & Shivaprasad H.L. 2008. An outbreak of  
 315 sarcocystosis in psittacines and a pigeon in a zoological collection in Brazil. *Avian Dis.* 52, 706–710.  
 316 <https://doi.org/10.1637/8303-040408-Case.1>
- 317 Gondim L.S.Q., Abe-Sandes K., Uzêda R.S., Silva M.S.A., Santos S.L., Mota R.A., Vilela S.M.O. & Gondim L.F.P.  
 318 2010. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast  
 319 of Brazil. *Vet. Parasitol.* 168, 121–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.055>
- 320 Homan W.L., Vercammen M., De Braekeleer J. & Verschuere H. 2000. Identification of a 200- to 300-fold  
 321 repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative  
 322 PCR. *Int. J. Parasitol.* 30, 69–75. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00170-8)
- 323 Ibrahim H.M., Osman G.Y., Mohamed A.H., Al-Selwi A.G.M., Nishikawa Y. & Abdel-Ghaffar F. 2018.  
 324 *Toxoplasma gondii*: Prevalence of natural infection in pigeons and ducks from middle and upper  
 325 Egypt using serological, histopathological, and immunohistochemical diagnostic methods. *Vet.*  
 326 *Parasitol. Reg. Stud. Reports* 13, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.04.002>
- 327 Konradt G., Bianchi M.V., Leite-Filho R.V., da Silva B.Z., Soares R.M., Pavarini S.P. & Driemeier D. 2017.  
 328 Necrotizing meningoencephalitis caused by *Sarcocystis falcatula* in bare-faced ibis (*Phimosus*  
 329 *infuscatus*). *Parasitol. Res.* 116, 809–812. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5341-6>
- 330 Lemos B. & Cerqueira R. 2002. Morphological differentiation in the white-eared opossum group  
 331 (*Didelphidae*: *Didelphis*). *J Mammal* 83(2): 354-369. [http://dx.doi.org/10.1644/1545-1542\(2002\)083<0354:MDITWE>2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1644/1545-1542(2002)083<0354:MDITWE>2.0.CO;2).
- 333 Lukášová R., Kobédová K., Halajian A., Bártová E., Murat J.B., Rampedi K.M. & Luus-Powell W.J. 2018.  
 334 Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in birds from South Africa. *Acta*  
 335 *Trop.* 178, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.029>
- 336 Moré G., Abrahamovich P., Jurado S., Bacigalupe D., Marin J.C., Rambeaud M., Venturini L. & Venturini M.C.  
 337 2011. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet. Parasitol.* 177, 162–165.  
 338 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.036>
- 339 Nardoni S., Rocchigiani G., Varvaro I., Altomonte I., Ceccherelli R. & Mancianti F. 2019. Serological and  
 340 molecular investigation on *Toxoplasma gondii* infection in wild birds. *Pathogens* 8, 2–7.  
 341 <https://doi.org/10.3390/pathogens8020058>
- 342 Nazir M.M., Ayaz M.M., Ahmed A.N., Maqbool A., Ashraf K., Oneeb M., Yasin G., Subhani A., Ali M.A., Nazir N.  
 343 & Sajid M.A. 2018. Prevalence of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Sarcocystis* Species  
 344 DNA in the Heart and Breast Muscles of Rock Pigeons (*Columbia livia*). *J. Parasitol. Res.* 2018.  
 345 <https://doi.org/10.1155/2018/6264042>
- 346 Otranto D., Llazari A., Testini G., Traversa D., Di Regalbono A.F., Badan M. & Capelli G. 2003.  
 347 Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet.*  
 348 *Parasitol.* 118, 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.008>
- 349 Prakas P. & Butkauskas D. 2012. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations  
 350 in Lithuania. *Ekologija (Liet Moksl Akad)* 58, 45-58. <https://doi.org/10.6001/ekologija.v58i1.2349>

- 351 Salant H., Mazuz M.L., Savitsky I., Nasereddin A., Blinder E. & Baneth G. 2015. *Neospora caninum* in crows  
352 from Israel. *Vet. Parasitol.* 212, 375–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.019>
- 353 Sato A.P., Vaz F.F., Konell A.L., Koch M.O., Ferreira R.F., Sipinski E.A.B. & Dittrich R.L. 2020. Survey of  
354 *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* antibodies in wildred-tailed  
355 Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 29, 1.  
356 <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019107>
- 357 Sick H., 1997. *Ornitologia Brasileira*. Edição revista e ampliada por José Fernando Pacheco. Rio de Janeiro.
- 358 Valadas S.Y.O.B., Soares R.M. & Lindsay D.S. 2016. Revisão sobre *Sarcocystis* spp. excretados por gambás  
359 (*Didelphis* spp.) no Brasil. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 214–226.  
360 <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i3p214-226>
- 361 Yamage M., Flechtner O. & Gottstein B. 1996. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for  
362 the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase  
363 chain reaction (PCR). *J. Parasitol.* 82, 272-279.
- 364 Yang Z., Zuo Y., Yao Y., Chen X., Yang G. & Zhang Y. 2001. Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis*  
365 species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be  
366 considered the same species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 283-288. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00283-3](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00283-3)  
367  
368

## 4 CAPÍTULO II – SARCOCYSTIDAE DETECTION IN THE BREAST MUSCLE OF CAPTIVE BIRDS BELONGING TO FAMILIES, PSITTACIDAE, PSITTACULIDAE, AND RAMPHASTIDAE

Este capítulo originou um artigo científico que foi submetido a Revista Parasitology Research.

### 1 **Sarcocystidae detection in the breast muscle of captive birds belonging to families,** 2 **Psittacidae, Psittaculidae, and Ramphastidae**

3

#### 4 **Abstract**

5 Studies on diseases of wild birds are essential in the context of public health, as these animals  
6 act as sentinels, allowing information regarding the conditions in an area to be obtained. In  
7 addition, birds are food protein sources for animals, and therefore play an important role in  
8 the life cycle of *Sarcocystis* and the epidemiology of the associated infection. We aimed to  
9 identify members of the genus *Sarcocystis* in the breast muscles of naturally infected captive  
10 birds. The breast muscles of 89 birds were collected, and the DNA was used for PCR  
11 amplification of the 18S ribosomal RNA gene to detect *Sarcocystis* spp. Positive samples  
12 were sequenced, assembled, edited, and compared with *Sarcocystis* sequences deposited in  
13 GenBank. The amplified sequences from the breast muscles of 5.61% (5/89) of the birds  
14 exhibited 100% similarity with the DNA of *Sarcocystis* spp. (one *Cyanoliseus patagonus*, one  
15 *Psittacula krameri*, two *Pyrrhura frontalis*, and one *Ramphastos dicolorus*). The expansion of  
16 the species diversity of naturally infected host species tested using newly developed  
17 molecular methods led to the detection of *Sarcocystis* spp. in the breast muscle of different  
18 bird species that are possibly involved in the epidemiology of *Sarcocystis* infection. To our



19 knowledge, this is the first report specifying the presence of *Sarcocystis* spp. in the breast  
20 muscle of bird species.

21 **Keywords:** Sarcocystidae, PCR, captive birds, naturally infected

22

### 23 **1. Introduction**

24 The genus *Sarcocystis* was first described in Suiça by Miescher (1843 apud LEVINE,  
25 1977, p. 38-51), who observed lesions—with an appearance of “milky white threads”—in the  
26 musculature of rats. In 1882, based on the appearance and location of the muscular cyst,  
27 Lankester coined the name *Sarcocystis* (grego sarkos (flesh) and kystis (bladder)). *Sarcocystis*  
28 is an intracellular obligatory protozoan characterized by a life cycle in two hosts. In  
29 intermediate hosts—usually omnivores—asexual multiplication of the parasite occurs along  
30 with the formation of cysts in the musculature. In definitive hosts—usually carnivores—the  
31 sexual phase occurs in the small intestine with the formation of oocysts/sporocysts (Dubey et  
32 al. 2016).

33 Identification of the sarcocysts at the macroscopic is difficult, and molecular tools are  
34 required for *Sarcocystis* detection. Using techniques for sequencing the ribosomal RNA gene  
35 and mtDNA, a series of new species have been described, and investigations of wild bird  
36 populations indicate that a relatively high host specificity exists in several cases. Recent  
37 studies have described *Sarcocystis* species that affect birds, i.e., *S. lindsayi* (Dubey et al.  
38 2001a), *S. ramphastosi* (Dubey et al. 2008), *S. rileyi* (Dubey et al. 2010), *S. columbae* (Olias  
39 et al. 2010), *S. albifronsi*, *S. anasi* (Kutkiené et al. 2012), *S. falcatula* (Konradt et al. 2017), *S.*  
40 *halieti*, *S. lari* (Gjerde et al. 2018), and *S. calchasi* (Parmentier et al. 2019). The definitive  
41 hosts of *S. falcatula* are *Didelphis albiventris* (Dubey et al. 2000), *D. marsupialis* (Dubey et  
42 al. 2001b), and *D. aurita* (Gallo et al. 2018).

43 The identification of the presence of *Sarcocystis* DNA in the breast muscle of birds may  
44 constitute evidence that these birds serve as intermediate hosts of *Sarcocystis*. In this study,  
45 we aimed to detect members of the genus *Sarcocystis* in the breast muscles of naturally  
46 infected captive birds in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

47

## 48 **2. Materials and methods**

49 Captive birds in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, that died due to  
50 poor health, were subjected to necropsy at the Avian Pathologies Diagnosis Central  
51 Laboratory (LCDPA) of the Federal University of Santa Maria (UFSM). Breast muscle  
52 samples were collected from 89 birds and stored at -20 °C until DNA extraction.

53 PCR was conducted at the Laboratory of Parasitic Diseases (LADOPAR) of the UFSM.  
54 DNA was extracted from breast muscle samples using a commercial kit (Wizard® Genomic  
55 DNA Purification Kit-Promega), as per the manufacturer's instructions with one modification,  
56 i.e., the lysis step was performed overnight at 55 °C in accordance with the protocol proposed  
57 by Moré et al. (2011). After extraction, DNA concentration was evaluated in all samples by  
58 measuring the absorbance at 260 nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, USA), and the  
59 DNA concentration of all samples was found to be approximately 20-50 ng/μL. The DNA  
60 samples were stored at -20 °C until further use.

61 Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the 18S ribosomal RNA gene  
62 (amplicon size: 900 bp) was performed to detect members of the genus *Sarcocystis*; the  
63 following primers were used: 2L (5'-GGATAAACCGTGGTAATTCTATG-3') and 3H (5'-  
64 GGCAAATGCTTTCGCAGTAG-3') sequence primers 5' and 3' amplifying a 900 bp  
65 fragment (Yang et al. 2001). Each PCR was carried out in a total volume of 25 μL,  
66 comprising 2.5 μL of 10x buffer (Promega, USA), 1 mM dNTPs (Ludwig Biotec, Brazil), 1  
67 μM of each primer (Sigma-Aldrich, Brazil), 1 U Taq DNA polymerase (Promega, USA), 1.5

68 mM MgCl<sub>2</sub>, and 50 ng template DNA. DNA extracted from a pool of 50 *Sarcocystis* cysts  
69 was used as a positive control and MilliQ water was used as a negative control. PCR was  
70 performed on a T100 thermal cycler (BioRad, USA) under the following conditions: 2 min at  
71 95 °C for the initial hot denaturation step, followed by 40 cycles of 40 s at 94 °C, 50 s at 56  
72 °C, and 60 s at 72 °C, and a final extension step of 6 min at 72 °C. The PCR products were  
73 visualized using UV illumination after electrophoresis on a 1% agarose gel stained with Gel  
74 Red Nucleic Acid Stain (Biotium, USA).

75 Positive PCR products were purified using a QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen,  
76 Germany) according to the manufacturer's instructions. The final purified DNA was analyzed  
77 using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), for concentration  
78 determination. After PCR purification, sequencing reactions were assembled using 5 pmol  
79 primers (separately), 30–60 ng purified PCR product, and MilliQ water in a final volume of 6  
80 µL. This reaction mixture was dehydrated at 60 °C for 2 h and then sequenced (ACTGENE -  
81 Serviço de Sequenciamento, Brazil). The results obtained were analyzed using  
82 StandenPackage and the generated nucleotide sequences were evaluated using BLAST  
83 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

84 The collection of biological material from captive birds was authorized by the Chico  
85 Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio) under the Biodiversity  
86 Authorization and Information System (SISBIO) (registration number 76022-1). An approval  
87 from the Ethics Committee, i.e., Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) was  
88 not required as this study involved only dead animals.

89

### 90 **3. Results**

91 In this study, a total of 89 captive birds classified into 35 species, belonging to 19  
92 families (Sick 1997) were studied (Table 1). The five captive birds that were positive for

93 *Sarcocystis* spp. belonged to four species of three families (two Psittacidae, one Psittaculidae,  
94 and one Ramphastidae) (Figure 1).

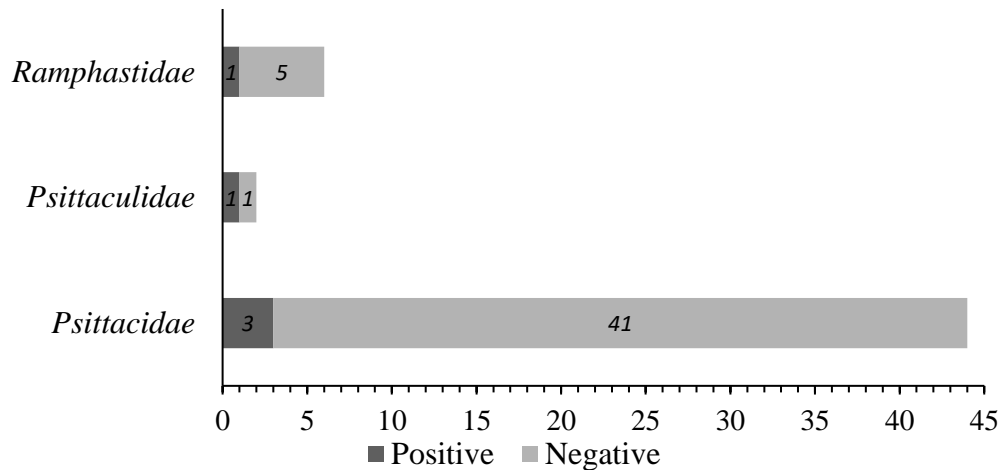
95

96 **Table 1.** List of birds tested according to their classification, i.e., family, scientific name  
97 and common name\*.

Family	Scientific name	Common name	N° tested
Accipitridae	<i>Rupornis magnirostris</i>	Roadside Hawk	5
Ardeidae	<i>Tigrisoma lineatum</i>	Rufescent Tiger-Heron	1
Cacatuidae	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Cockatiel	1
Cardinalidae	<i>Cyanoloxia brissonii</i>	Ultramarine Grosbeak	1
Columbidae	<i>Zenaida auriculata</i>	Eared Dove	5
Corvidae	<i>Cyanocorax caeruleus</i>	Azure Jay	1
Cracidae	<i>Crax fasciolata</i>	Bare-faced Curassow	1
Falconidae	<i>Falco sparverius</i>	American Kestrel	1
Fringillidae	<i>Euphonia cyanocephala</i>	Golden-rumped Euphonia	1
	<i>Paroaria coronata</i>	Red-crested Cardinal	7
	<i>Serinus canaria</i>	Domestic canary	1
Jacanidae	<i>Jacana jacana</i>	Wattled Jacana	1
Motacillidae	<i>Anthus correndera</i>	Correndera Pipit	1
Phasianidae	<i>Pavo cristatus</i>	Blue Peafowl	2
Psittacidae	<i>Amazona aestiva</i>	Amazon Parrot	11
	<i>Amazona pretrei</i>	Red-spectacled Parrot	4
	<i>Amazona vinacea</i>	Vinaceous-breasted Parrot	1
	<i>Ara ararauna</i>	Blue-and-yellow Macaw	5
	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	Burrowing Parrot	2
	<i>Forpus xanthopterygius</i>	Blue-winged Parrotlet	1
	<i>Myiopsitta monachus</i>	Monk Parakeet	7
	<i>Pionites leucogaster</i>	White-bellied Parrot	3
	<i>Pionus maximiliani</i>	Scaly-headed Parrot	1
	<i>Poicephalus senegalus</i>	Senegal Parrot	1
	<i>Pyrhura frontalis</i>	Maroon-bellied Parakeet	7
	<i>Triclaria malachitacea</i>	Blue-bellied Parrot	1
Psittaculidae	<i>Psittacula krameri</i>	Rose-ringed Parakeet	2
Rallidae	<i>Gallinula galeata</i>	Common Gallinule	1
Ramphastidae	<i>Pteroglossus castanotis</i>	Chestnut-eared Aracari	4
	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Red-breasted Toucan	2
Strigidae	<i>Athene cunicularia</i>	Burrowing Owl	3
	<i>Megascops choliba</i>	Tropical Screech-Owl	1
Thraupidae	<i>Saltator aurantiirostris</i>	Golden-billed Saltator	1
	<i>Stephanophorus diadematus</i>	Diademed Tanager	1
Threskiornithidae	<i>Theristicus caudatus</i>	Buff-necked Ibis	1
<b>19</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>89</b>

98

\* According Sick (1997).



99

100 **Figure 1.** Number of birds positive for *Sarcocystis* spp. (Family-based analysis).

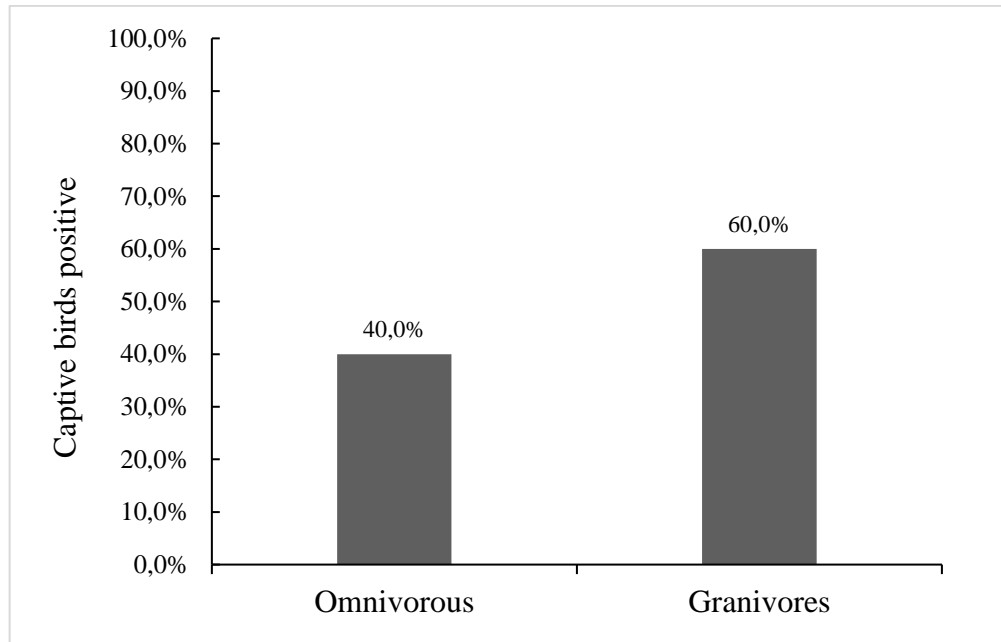
101

102 Through PCR, it was found that five breast muscle samples (5.61%) were infected with  
 103 *Sarcocystis* spp.; *Sarcocystis* DNA was detected in muscle samples from one *Cyanoliseus*  
 104 *patagonus*, one *Psittacula krameri*, two *Pyrrhura frontalis* and one *Ramphastos dicolorus*.  
 105 The amplified sequences exhibited 100% similarity with *Sarcocystis* sequences deposited in  
 106 GenBank™ (accession nos. MK803217.1, KF278955.1, KX610769.1, KX470745.1 and  
 107 DQ768305.1, respectively). The 18S rRNA region investigated in this study was not  
 108 sufficiently variable to differentiate between the *Sarcocystis* species that infect birds.

109 The birds did not show typical signs of sarcocystosis and died of various causes. This  
 110 demonstrates that—possibly—in natural infections, when birds are exposed to the infective  
 111 forms of the parasite, they develop subclinical infections, and consequently, the findings in  
 112 these birds are often incidental.

113 Taking into consideration the feeding habits of the captive birds with the presence of  
 114 *Sarcocystis* spp., it was possible to identify two forms of feeding, and of the five infected  
 115 birds, three (60%) were granivorous and two (40%) were omnivorous (Figure 2).

116



117

118 **Figure 2.** Correlation between eating habits and the presence of  
 119 *Sarcocystis* spp. in the breast muscle of captive birds in Santa Maria, Rio  
 120 Grande do Sul, Brazil.

121

#### 122 4. Discussion

123 Our results reveal that the five bird species that are positive for *Sarcocystis* spp. belong  
 124 to three families (three Psittacidae, one Psittaculidae, and one Ramphastidae). The birds  
 125 *Cyanoliseus patagonus* (Psittacidae), *Pyrrhura frontalis* (Psittacidae), and *Ramphastos*  
 126 *dicolorus* (Ramphastidae) are unique to South America (New World). *Psittacula krameri* is a  
 127 bird naturally distributed in Asia and Africa (Old World). *S. falcatula* infection was first  
 128 described in Brazil in a zoo in Belo Horizonte, where parakeets (*Psittacula krameri*) died  
 129 suddenly without manifesting any clinical signs (Ecco et al. 2008). An outbreak in a zoo in  
 130 Foz do Iguacu led to the death of 38 parrots, most of which were from the Old World (Godoy  
 131 et al. 2009).

132 In South America, *S. falcatula*-like species was first isolated from sporocysts found in  
 133 the intestine of opossum (*D. marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil (Dubey et al.  
 134 2000). *S. lindsayi* was proposed as a new species isolated from an opossum (*D. albiventris*) in

135 Jaboticabal, São Paulo, Brazil (Dubey et al. 2001a). The experimental intermediate host for  
136 both *Sarcocystis* species is *Melopsittacus undulatus*; however, its natural intermediate host  
137 remains unknown (Dubey et al. 2000; 2001a).

138 In North America, birds of the orders Psittaciformes, Passeriformes, and  
139 Columbiformes—canaries (*Serinus canarius*), mandarin (*Poephila guttata*), budgerigars (*M.*  
140 *undulatus*), domestic pigeon (*Columba livia*), chicken (*Gallus gallus*), and guinea fowl  
141 (*Numida meleagris*)—have been reported as the intermediate hosts of *S. falcatula* (Box and  
142 Smith, 1982).

143 As the sporocysts of *S. neurona*, *S. falcatula*, and *S. speeri* are similar, these species can  
144 be distinguished based on their pathogenicity and infectivity in immunodeficient birds and  
145 mice in experimental infections. *S. speeri* and *S. neurona* are not infectious to *M. undulatus*,  
146 whereas they are infectious to interferon gamma–knockout (KO) mice. In contrast, *S.*  
147 *falcatula* and *S. lindsayi* species are infectious to *M. undulatus*, while they are not infectious  
148 to KO mice (Dubey et al. 2016). In Brazil, *S. falcatula* infection has been described as  
149 necrotizing meningoencephalitis in a tapirucu (*Phimosus infuscatus*), and the bird manifested  
150 wing paralysis and mild issues with motor coordination (Konradt et al. 2017).

151 In Costa Rica, researchers have reported the presence of macroscopic sarcocysts of *S.*  
152 *ramphastosi* in a toucan (*Ramphastos sulfuratus*) (Dubey et al. 2004). Eleven individual  
153 sarcocysts were subjected to DNA extraction and PCR amplification of the 18S rRNA gene;  
154 the results demonstrated a close phylogenetic relationship with *S. falcatula* and *S. neurona*  
155 (Dubey et al. 2008). Gjerde et al. (2018) reported a secondary finding of numerous sporulated  
156 *Sarcocystis* oocysts in the intestinal mucosa of a white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*)  
157 in Western Norway. In their study, DNA was extracted from 10 mucosal scrapings containing  
158 oocysts, and was subjected to PCR amplification and sequencing of four DNA regions, i.e.,  
159 the 18S and 28S rRNA genes, ITS1 region, and *cox1* gene; the results revealed the presence

160 of *S. halioti* n. sp. and *S. lari*. Necropsy revealed that the cause of death was inflammation and  
161 occlusion of bile ducts.

162 In most studies aimed at identifying *Sarcocystis* species, the 18S rRNA gene has been  
163 used because the sequence of this region is highly conserved (Dubey et al. 2015). Prakas et al.  
164 (2014) suggested that the 18S rRNA gene was not sufficiently variable to identify *Sarcocystis*  
165 species that use birds as intermediate hosts. Recent studies on the molecular characterization  
166 of *Sarcocystis* species that infect birds have used the first transcript space (ITS1) along with  
167 the 28S rRNA gene (Bamac et al. 2020; Prakas et al. 2021). In addition, for the phylogenetic  
168 classification of species, the associations between loci 18S rRNA gene, 28S rRNA gene, and  
169 ITS1 have been used (Dubey et al. 2015; Gjerde et al. 2018; Parmentier et al. 2019). These  
170 data indicate the need for further studies aimed at designing a methodology with good  
171 sensitivity and specificity to characterize *Sarcocystis* species that use birds as intermediate  
172 hosts.

173 In this study, birds with *Sarcocystis* spp. in their breast muscle showed no clinical signs.  
174 A study in geese (*Anser* sp.) from public parks and captivity in Curitiba-PR verified—through  
175 indirect immunofluorescence assay (IFA)—that 28% (42/149) of the birds had antibodies  
176 against *Sarcocystis* spp., with 90% of the birds showing no clinical signs; nonetheless, only  
177 four birds with positive serology manifested nonspecific clinical signs (diarrhea, cloaca  
178 prolapse, and difficult breathing) (Konell et al. 2019). The frequency of reports of natural  
179 infection in New World birds by *Sarcocystis* species is low because of co-evolution with the  
180 parasite (Dubey et al. 2001a).

181 In this study, *Sarcocystis* spp. was detected in omnivores (*Cyanoliseus patagonus* and  
182 *Ramphastos dicolorus*) and granivores (*Psittacula krameri* and *Pyrrhura frontalis*).  
183 Omnivorous, carnivorous, and scavenger birds have the habit of consuming carcasses; such  
184 feeding habits facilitate the ingestion of cysts and/or parasite oocysts, thereby providing a



185 route for the birds to be infected (Dubey 2010; Sato et al. 2020). Dubey et al. (2016)  
186 demonstrated that in intermediate hosts, which are generally omnivorous, the formation of  
187 cysts in the musculature occurs via asexual multiplication of the parasite.

188 The detection of *Sarcocystis* spp. in breast muscle samples from these birds is probably  
189 due to the formation of tissue cysts, indicating the role of the birds as intermediate hosts. The  
190 expansion of the species diversity of naturally infected host species tested using newly  
191 developed molecular methods led to the detection of *Sarcocystis* spp. in the breast muscle of  
192 different bird species.

193

#### 194 **Acknowledgements**

195 The authors are grateful to the Central Laboratory for the Diagnosis of Avian Pathologies  
196 (LCDPA - UFSM) for the availability and assistance in collecting samples for the  
197 development of this research.

198

#### 199 **Declarations**

200 **Funding:** This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de  
201 Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

202 **Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

203

#### 204 **References**

205 Bamac OE, Rogers KH, Arranz-Solís D, Saeij JP, Lewis S, Duerr R, Skoglun J, Peronne L,  
206 Mete A (2020) Protozoal encephalitis associated with *Sarcocystis calchasi* and *S. falcatula*  
207 during an epizootic involving Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in coastal  
208 Southern California, USA. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl 12: 185-191. doi:  
209 org/10.1016/j.ijppaw.2020.06.005

- 210 Box ED, Smith JH (1982) The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds.  
211 The J of parasitol 68(4) 668-673. doi:10.2307/3280926  
212
- 213 Clubb SL, Frenkel JK (1992) *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches  
214 with fatal pulmonary disease in psittacine birds. J Parasitol 78:116-124. doi:  
215 10.2307/3283697  
216
- 217 Dubey JP, Calero-Bernal R, Rosenthal BM, Speer CA, Fayer R. Sarcocystosis of animals and  
218 humans. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2016.  
219
- 220 Dubey JP, Lane E, Van Wilpe E (2004) *Sarcocystis ramphastosi* sp. nov. and *Sarcocystis*  
221 *sulfuratusi* sp. nov. (Apicomplexa, Sarcocystidae) from the keel-billed toucan (*Ramphastos*  
222 *sulfuratus*). Acta Parasitol 49: 93-101.  
223
- 224 Dubey JP, Lindsay DS, Rezende PCB, Costa AJ (2000) Characterization of an unidentified  
225 *Sarcocystis falcatula*-like parasite from the South American opossum, *Didelphis albiventris*  
226 from Brazil. J of Eukaryot Microbiol 47: 538-544.  
227
- 228 Dubey JP, Lindsay DS, Rosenthal BM, Kerber CE, Kasa N, Pena H FJ, Kwok OC, Shen SK,  
229 Gennari SM (2001b) Isolates of *Sarcocystis falcatula*-like Organisms from South American  
230 Opossums *Didelphis marsupialis* and *Didelphis albiventris* from São Paulo, Brazil. J of  
231 Parasitol 87(6): 1449. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[1449:IOSFLO]2.0.CO;2  
232

- 233 Dubey JP, Morales JA, Leandro D, Rosenthal BM (2008) Molecular Phylogeny implicates  
234 new world opossums (Didelphidae) as the definitive hosts of *Sarcocystis ramphastosi*, a  
235 parasite of the keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*). Acta Protozool 47: 55-61.  
236
- 237 Dubey JP, Rosenthal BM, Felix TA (2010) Morphologic and Molecular Characterization of  
238 the Sarcocysts of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the Mallard Duck  
239 (*Anas platyrhynchos*). J of Parasitol 96(4): 765-770. doi: 10.1645/GE-2413.1  
240
- 241 Dubey JP, Rosenthal BM, Speer C (2001a) *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa:  
242 Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. J  
243 eukaryot microbial 48(5): 595-603. doi: 10.1111/j.1550-7408.2001.tb00196.x  
244
- 245 Dubey JP, Venturini L, Venturini C, Basso W, Unzaga J (1999) Isolation of *Sarcocystis*  
246 *falcatula* from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. Vet  
247 Parasitol 86: 239-244. doi: 10.1016/s0304-4017(99)00145-4  
248
- 249 Dubey JP, Verma SK, Dunams D, Calero-Bernal R, Rosenthal BM (2015) Molecular  
250 characterization and development of *Sarcocystis speeri* sarcocysts in gamma interferon gene  
251 knockout mice. Parasitol 142: 1555-1562. doi: 10.1017/S0031182015001109  
252
- 253 Ecco R, Luppi MM, Malta MCC, Araújo MR, Guedes RMC, Shivaprasad HL (2008) "An  
254 outbreak of Sarcocystosis in Psittacines and a Pigeon in a Zoological Collection in Brazil".  
255 Avian Dis 52(4):706-10. doi: 10.1637/8303-040408-Case.1  
256

- 257 Gallo SSM, Lindsay DS, Ederli NB, Matteoli FP, Venancio TM, de Oliveira FCR (2018)  
258 Identification of opossums *Didelphis aurita* (Wied-Neuweid, 1826) as a definitive host of  
259 *Sarcocystis falcatula*-like sporocysts. Parasitol Res 117(1): 213–223. doi: 10.1007/s00436-  
260 017-5695-4  
261
- 262 Gjerde B, Dahlgren SS (2010) *Corvid birds* (Corvidae) act as definitive hosts for *Sarcocystis*  
263 *ovalis* in moose (*Alces alces*). Parasitol Res 107: 1445-1453. doi: 10.1007/s00436-010-2017-5  
264
- 265 Gjerde B, Vikøren T, Hamnes IS (2018) Molecular identification of *Sarcocystis halietai* n. sp.,  
266 *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the intestine of a white-tailed sea eagle  
267 (*Haliaeetus albicilla*) in Norway. Int J for Parasitol: Parasites and Wildlife 7(1): 1-11. doi:  
268 10.1016/j.ijppaw.2017.12.001  
269
- 270 Godoy SN, De Paula CD, Cubas ZS, Matushima ER, Catão-Dias JL (2019) Occurrence of  
271 *Sarcocystis falcatula* in Captive Psittacine Birds in Brazil. J of Avian Med and Surgery 23(1):  
272 18-23. doi: 10.1647/2008-006R.1  
273
- 274 Irie T, Ikeda T, Nakamura T, Ichii O, Yamada N, Ito T, Yamazaki K, Takai S, Yagi K (2017)  
275 First molecular detection of *Sarcocystis ovalis* in the intestinal mucosa of a Japanese jungle  
276 crow (*Corvus macrorhynchos*) in Hokkaido, Japan. Vet Parasitol Reg Stud Reports 10:54-57.  
277 doi: 10.1016/j.vprsr.2017.08.005  
278
- 279 Konradt G, Bianchi MV, Leite-Filho RV, Da Silva BZ, Soares RM, Pavarini SP, Driemeier D  
280 (2017) Necrotizing meningoencephalitis caused by *Sarcocystis falcatula* in bare-faced ibis  
281 (*Phimosus infuscatus*). Parasitol Res 116:809. doi: 10.1007/s00436-016-5341-6

- 282 Kutkienė L, Prakas P, Sruoga A, Butkauskas D (2012) Description of *Sarcocystis anasi* sp.  
283 nov. and *Sarcocystis albifronsi* sp. nov. in birds of the order Anseriformes. *Parasitol Res*  
284 110(2): 1043-1046. doi: 10.1007/s00436-011-2588-9  
285
- 286 Lankester ER. On *Drepanidium ranarum*, the cellparasite of the frog's blood and spleen  
287 (Gaule's Wiirmschen). *Quarterly Journal of Microscopical Science* 1882; 22: 53-65.  
288
- 289 Luznar SL, Avery ML, Dame JB, Mackay RJ, Greiner EC (2001) Development of *Sarcocystis*  
290 *falcatula* in its intermediate host, the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*). *Vet Parasitol*  
291 95:327-334. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00399-x  
292
- 293 Mansfield LS, Mehler S, Nelson K, Elsheikha HM, Murphy AJ, Knust B, Tanhauser SM,  
294 Gearhart PM, Rossano MG, Bowman DD, Schott HC, Patterson JS (2008) Brown-headed  
295 cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. *Vet*  
296 *Parasitol* 153(1-2):24-43. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.016  
297
- 298 Miescher E (1843) Über eigenthümliche schläuche in den muskeln einer hausmaus. *Berl.*  
299 *Verh. Naturforsch. Ges. Basel.* 5: 198-202, apud (1843 apud LEVINE ND, 1977; 38-51).  
300
- 301 Moré G, Abrahamovich P, Jurado S, Bacigalupe D, Marin JC, Rambeaud M, Venturini L,  
302 Venturini LC (2011) Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet Parasitol*  
303 177:162-165. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.11.036  
304
- 305 Nazir MM, Ayaz MM, Ahmed AN, Maqbool A, Ashraf K, Oneeb M, Yasin G, Subhani A,  
306 Ali MA, Nazir N, Sajid MA (2018) Prevalence of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*,

307 and *Sarcocystis* Species DNA in the Heart and Breast Muscles of Rock Pigeons (*Columbia*  
308 *livia*). J Parasitol Res 1-4. doi: 10.1155/2018/6264042

309

310 Neill PJG, Smith JH, Box ED (1989) Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* (Apicomplexa:  
311 Sarcocystidae) in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*), IV. Ultrastructure of developing,  
312 mature and degenerating sarcocystis. J Protozool 36:430-437.

313

314 Olias P, Olias L, Lierz M, Mehlhorn H, Gruber AD (2010) *Sarcocystis calchasi* is distinct to  
315 *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis*  
316 sp. from the sparrow hawk (*Accipiter nisus*). Vet Parasitol 171(1-2):7-14. doi:  
317 10.1016/j.vetpar.2010.03.021

318

319 Parmentier SL, Maier-Sam K, Failing K, Gruber AD, Lierz M (2019) High prevalence of  
320 *Sarcocystis calchasi* in racing pigeon flocks in Germany. PLOS ONE 14(4), e0215241. doi:  
321 10.1371/journal.pone.0215241

322

323 Prakas P, Bea A, Juozaitytė-Ngugu E, Olano I, Villanúa D, Švažas S, Butkauskas D (2021)  
324 Molecular identification of *Sarcocystis halieti* in the muscles of two species of birds of prey  
325 from Spain. Parasites Vectors 14: 414. doi: 10.1186/s13071-021-04921-0

326

327 Prakas P, Oksanen A, Butkauskas D, Sruoga A, Kutkienė L, Švažas S, Isomursu M,  
328 Liaugaudaitė S (2014) Identification and intraspecific genetic diversity of *Sarcocystis rileyi*  
329 from ducks, *Anas* spp., in Lithuania and Finland. The J of Parasitol 100(5): 657-661. doi:  
330 <https://www.jstor.org/stable/24624947>

331

- 332 Sato AP, Vaz FF, Konell AL, Koch MO, Ferreira RF, Sipinski EAB, Dittrich RL (2020)  
333 Survey of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* antibodies in  
334 wildred-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*). Rev Bras Parasitol Vet 29(1). doi:  
335 10.1590/s1984-29612019107  
336
- 337 Sick, H. Ornitologia Brasileira. Edição revista e ampliada por José Fernando Pacheco. Rio de  
338 Janeiro, 1997.  
339
- 340 Valadas SYOB, Soares RM, Lindsay DS (2016) A review of *Sarcocystis* spp. shed by  
341 opossums (*Didelphis* spp.) in Brazil. Braz J Vet Res Anim Sci 53:214-226. doi:  
342 10.11606/issn.1678-4456.v53i3p214-226  
343
- 344 Yang Z, Zuo Y, Yao Y, Chen X, Yang G, Zhang Y (2001) Analysis of the 18S rRNA genes  
345 of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and  
346 water buffalo should be considered the same species. Mol Biochem Parasitol 115:283-288.  
347 doi: 10.1016/s0166-6851(01)00283-3  
348

## 5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

*Sarcocystis* spp., *T. gondii* e *N. caninum* são parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa e família Sarcocystidae que infectam aves domésticas e silvestres (CAMILLO et al., 2015; DARWICH et al., 2012; DUBEY et al., 2016; GONDIM et al., 2010). O ciclo biológico destes parasitas é heteróxico sendo necessários dois hospedeiros, onde no hospedeiro definitivo ocorre o desenvolvimento da fase sexuada e no hospedeiro intermediário a fase assexuada (DOMENIS et al., 2011; DUBEY, 2002; GONDIM et al., 2004).

São descritos como hospedeiros definitivos do gênero *Sarcocystis* os predadores carnívoros e onívoros e como hospedeiros intermediários, herbívoros ou onívoros (DOMENIS et al., 2011; RUAS; CUNHA; SILVA, 2001). Na América do Sul podem atuar como hospedeiros definitivos *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. marsupialis*, *D. imperfecta* e *D. pernigra* (CERQUEIRA, 1985; LEMOS; CERQUEIRA, 2002). O *T. gondii* tem como hospedeiro definitivo os felídeos domésticos e selvagens e como hospedeiros intermediários as aves, herbívoros, carnívoros e mamíferos marinhos (baleias e golfinhos) (DUBEY, 2002). O *N. caninum* tem como hospedeiros definitivos os carnívoros (GONDIM et al., 2004; MCALLISTER et al., 1998). Mamíferos e aves são descritas como hospedeiros intermediários (ČOBÁDIOVÁ et al., 2013; TRUPPEL et al., 2010). As aves podem ser consideradas hospedeiras intermediárias e quando predadas tornam-se fonte de infecção para os hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 2010; MINEO et al., 2009, 2011).

O hábito alimentar das aves deve ser levado em conta para entender a sua participação no ciclo biológico desses parasitas, sabe-se que as aves apresentam diversas formas e estratégias de obter o alimento, algumas aves possuem hábitos generalistas e outras mais restrito. Aves onívoras, carnívoras e necrófagos tem o hábito alimentar de consumir carcaças, além disso, em geral as aves consomem os alimentos e água em contato com o solo, o que facilita a ingestão de cistos e/ou oocistos de parasitas e possibilita a infecção das aves (DARWICH et al., 2012; DUBEY, 2010; NARDONI et al., 2019; SATO et al., 2020). Essa característica torna as aves importantes sinalizadores de contaminação ambiental por *T. gondii* (DUBEY, 2010).

Dessa forma, com os estudos realizados nesta tese, obtivemos os seguintes resultados e conclusões:

- Detectou-se DNA de *Sarcocystis* spp. ou *N. caninum* em amostras de tecido de aves pertencentes a sete famílias utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As



famílias e o número de exemplares de aves infectadas foram: Accipitridae (1), Anatidae (1), Cacatuidae (1), Psittacidae (3), Psittaculidae (1), Ramphastidae (1) e Thraupidae (1).

- Ácidos nucleicos de *Sarcocystis* spp. foram detectados através da PCR em cérebro de uma calopsita (*Nymphicus hollandicus*), e também em cérebro e coração de um papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e de um cardeal (*Paroaria coronata*).
- Após sequenciamento, confirmou-se a presença de *Sarcocystis* spp. em uma calopsita e *S. speeri* em um papagaio-verdadeiro, sendo as sequências depositadas no GenBank (números de acesso, respectivamente, MW463929; MW464125). Não obtivemos sucesso no sequenciamento para as amostras de tecido de um cardeal.
- A análise filogenética baseada no gene 18S rRNA revelou que *Sarcocystis* spp. formou um clado com *Sarcocystis* spp. que utilizam gambá (*Didelphis aurita*) como hospedeiro definitivo e *S. falcatula* que utilizam Lóris-molucano (*Trichoglossus moluccanus*) como hospedeiro intermediário.
- *S. speeri* formou um clado com *S. speeri* que utilizou *Mus musculus* (camundongos knockout para o gene interferon gama) como hospedeiro intermediário experimental. Além disso, formou um clado com *S. columbae*, *S. corvusi*, *S. halioti* e *Sarcocystis* sp. que afetam espécies de aves.
- O DNA de *N. caninum* foi detectado em cérebro de um gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*) e em cérebro e coração de uma marreca-caneleira (*Dendrocygna bicolor*). A identificação por PCR foi confirmada por sequenciamento de DNA (100% - LN714488.1).
- Nas amostras de cérebro e coração das aves analisadas não foi detectado DNA de *T. gondii*.
- Ácidos nucleicos de *Sarcocystis* spp., foi detectado em músculo do peito de um papagaio-da-patagônia (*Cyanoliseus patagonus*), um periquito-de-colar (*Psittacula krameri*), duas tiriba-de-testa-vermelha (*Pyrrhura frontalis*) e um tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*).
- A região do gene 18S rRNA investigada neste estudo foi eficaz para detecção do gênero, porém não foi suficientemente variável para diferenciar as espécies de *Sarcocystis* que infectam aves.
- As aves analisadas não apresentaram infecções mistas.

- As aves não apresentaram sinais clínicos e morreram por causas diversas. Esta apresentação demonstra que, possivelmente, em infecções naturais quando as aves são expostas às formas infectantes do parasita elas desenvolvem infecções subclínicas e, conseqüentemente, os achados nestas aves são muitas vezes incidentais.
- As aves com detecção de DNA de *Sarcocystis* spp. e *N. caninum* apresentaram duas formas distintas de alimentação, onívora e granívora.
- A correlação entre os hábitos alimentares e a presença de DNA é a seguinte: Onívoras com *Sarcocystis* spp. (papagaio-da-patagônia e tucano-do-bico-verde); onívora com *N. caninum* (gavião-carijó e marreca caneleira); granívora com *Sarcocystis* spp. (calopsita, cardeal, periquito-de-colar e tiriba-de-testa-vermelha); granívora com *S. speeri* (papagaio-verdadeiro).
- A detecção de DNA destes parasitas em amostras teciduais (cérebro, coração e músculo do peito) dessas aves provavelmente se deve à formação de cistos teciduais, evidenciando sua participação como hospedeiros intermediários.

## 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**, [s.l.], v. 13, n. 12, p. e0209007, 2018.
- AIMARIA, S. *et al.* First molecular detection and characterization of *Sarcocystis* species in slaughtered cattle in North-West Tunisia. **Meat Science**, [s.l.], v. 122, p. 55-59, 2016.
- ALI, S. Role of environment in cross species transmission of *Toxoplasma gondii*, current status and one health approach in Pakistan. **PSM Vet Res**, [s.l.], v. 1, p. 46-49, 2016.
- ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Mol Phylogenet and Evol**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 417-434, 2003.
- 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. **Pesq. Vet. Bras.**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 103-107, fev. 2016.
- BAKER, D. G. *et al.* Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, [s.l.], v. 81, n. 5, p. 783-785, 1995.
- BAMAC, O. E. *et al.* Protozoal encephalitis associated with *Sarcocystis calchasi* and *S. falcatula* during an epizootic involving Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in coastal Southern California, USA. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl**, [s.l.], v. 12, p. 185-191, 2020.
- BELTRAME, M. A. V. *et al.* Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. **Vet Parasit.**, [s.l.], v. 188, n. 3-4, p. 225-230, 2012.
- BERTOCCO, B. P.; BERTOCCO, C. P.; NEVES, M. F. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros. **Rev Científica Eletrônica de Med Vet**, [s.l.], v. 10, p. 1-6, 2008.
- BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd**, [s.l.], v. 70, p. 271-274, 1984.
- BJERKÅS, I.; PRESTHUS, J. Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. **Apmis**, [s.l.], v. 96, p. 445-454, 1988.
- BOX, E. D.; SMITH, J. H. The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. **J of Parasitol.**, [s.l.], v. 68, n. 4, p. 668-673, 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Toxoplasmose**: sintomas, tratamento e como prevenir. [Brasília, DF]: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/toxoplasmose-1/toxoplasmose>. Acesso em: 7 jan. 2022.
- CAMILLO, G. *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in backyard chickens in Rio Grande do Sul. **Braz J of Poultry Science**, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 263-265, 2015.

- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Parasites, Toxoplasmosis (Toxoplasma infection), Life Cycle**. [Atlanta]: CDC, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>. Acesso em: 21 dez. 2021.
- CERQUEIRA, R. The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae). **J Biogeogr**, [s.l.], v.12, n. 2, p. 135-145, 1985.
- ČOBÁDIOVÁ, A. *et al.* First molecular detection of *Neospora caninum* in European brown bear (*Ursus arctos*). **Vet. Parasitol.**, [s.l.], v. 197, p. 346-349, 2013.
- COSTA, K. S. *et al.* Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, [s.l.], v. 38, p. 157-159, 2008.
- CRAY, C. Infectious and zoonotic disease testing in pet birds. **Clin Lab Med**, [s.l.], v. 31, p. 71-85, 2011.
- DAME, J. B. *et al.* *Sarcocystis falcatula* from passerine and psittacine birds: synonymy with *Sarcocystis neurona*, agent of equine protozoal myeloencephalitis. **The J of Parasitol**, [s.l.], v. 81, n. 6, p. 930, 1995.
- DARWICH, L. *et al.* Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Vet Parasitol**, [s.l.], v. 183, n. 3-4, p. 377-381, 2012.
- DIAS, R. A. F.; FREIRE, R. L. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 6, p. 239-248, 2005.
- DOMENIS, L. *et al.* Detection of a morphogenetically novel *Sarcocystis hominis*-like in the context of a prevalence study in semiintensively bred cattle in Italy. **Parasitol Res**, [s.l.], v. 109, n. 6, p. 1677-1687, 2011.
- DONAHOE, S. L. *et al.* A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl**, [s.l.], v. 4, p. 216-238, 2015.
- DU, L. *et al.* Detection of *Neospora caninum*-DNA in brain tissues from pigeons in Changchun, Jilin (China). **Vet. Parasitol.**, [s.l.], v. 214, p. 171-173, 2015.
- DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Vet. Parasitol.**, [s.l.], v. 106, p. 121-153, 2002.
- DUBEY, J. P. *et al.* An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Vet Parasitol**, [s.l.], v. 209, n. 1-2, p. 1-42, 2015.
- DUBEY, J. P. *et al.* Characterization of an unidentified *Sarcocystis falcatula*-like parasite from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. **J Eukaryot Microbiol**, [s.l.], v. 47, n. 6, p. 538-544, 2000a.
- DUBEY, J. P. *et al.* Experimental Transmission of *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999 from the South American Opossum (*Didelphis albiventris*) to the North American Opossum (*Didelphis virginiana*). **The J of Parasitol**, [s.l.], v. 86, n. 3, p. 624, 2000b.
- DUBEY, J. P. *et al.* Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Vet. Parasitol.**, [s.l.], v. 181, p. 382-387, 2011.

DUBEY, J. P. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, [s.l.], v. 192, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P. *et al.* Sarcocystosis in other avian species. *In*: DUBEY, J. P. *et al.* **Sarcocystosis of animals and humans**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 281-292.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean J. Parasitol**, [s.l.], v. 41, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. p. 1-313.

DUBEY, J. P.; FELIX, T. A.; KWOK, O. C. Serological and parasitological prevalence of *Toxoplasma gondii* in wild birds from Colorado. **J. Parasitol.**, [s.l.], v. 96, p. 937-939, 2010.

DUBEY, J. P.; ROSENTHAL, B. M.; SPEER, C. A. *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. **J Eukaryot Microbiol**, [s.l.], v. 48, n. 5, p. 595-603, 2001.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clin Microbiol Rev**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Sarcocystis of Animals and Man**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 215p.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, [s.l.], v. 22, p. 645-671, 2006.

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**, [s.l.], v. 47, p. 55-61, 2008.

DUBEY, J. P. *et al.* *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **The J of Parasit**, [s.l.], v. 89, p. 851-853, 2003.

EL-MORSEY, A. *et al.* Morphologic and molecular characteristics of *Sarcocystis atraii* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) infecting the common coot (*Fulica atra*) from Egypt. **Acta Parasitol**, [s.l.], v. 60, n 4, p. 691-699, 2015a.

EL-MORSEY, A. *et al.* *Sarcocystis chloropusae* (protozoa: Sarcocystidae) n. sp. from the common moorhen (*Gallinula chloropus*) from Egypt. **Parasitology**, [s.l.], v. 142, n. 8, p. 1063-1065, 2015b.

FAYER, R. Toxoplasmosis update and public health implications. **Can. Vet. J.**, [s.l.], v. 22, p. 344- 352, 1981.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 2, p. 133-148, 2009.

- FERNANDES, M. F. T. S. *et al.* Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in backyard chicken breeding in Northeast, Brazil. **Braz J of Vet Parasitol**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 105-108, 2016.
- FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAUJO, F. A. P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s.l.], v. 37, p. 1-23, 2009.
- FOULON, W.; NAESSENS, A.; HO-YEN, D. Prevention of congenital toxoplasmosis. **J of Perinatal Med.**, [s.l.], v. 28, p. 337-343, 2000.
- GALLO, S. S. M. *et al.* Identification of opossums *Didelphis aurita* (Wied-Neuweid, 1826) as a definitive host of *Sarcocystis falcatula*-like sporocysts. **Parasitol Res**, [s.l.], v. 117, n. 1, p. 213-223, 2017.
- GARDINER, C. H.; FAYER, R.; DUBEY, J. P. **An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1998. ISBN 9781881041481.
- GENNARI, S. M. *et al.* Survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus forster*, 1781), **J of Zoo and Wildlife Med**, [s.l.], v. 47, p. 364-366, 2016.
- GJERDE, B. Molecular characterisation of *Sarcocystis rileyi* from a common eider (*Somateria mollissima*) in Norway. **Parasitol Res**, [s.l.], v. 113, n. 9, p. 3501-3509, 2014.
- GJERDE, B.; VIKØREN, T.; HAMNES, I. S. Molecular identification of *Sarcocystis halietae* n. sp., *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the intestine of a white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Norway. **Int J for Parasitol: Parasites and Wildlife**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1-11, 2018.
- GODOI, F. S. L. *et al.* *Toxoplasma gondii*: diagnosis of experimental and natural infection in pigeons (*Columba livia*) by serological, biological and molecular techniques. **Rev Bras de Parasitol Vet**, [s.l.], v. 19, n. 4, p. 237-243, 2010.
- GODOY, S. N. *et al.* Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in captive psittacine birds in Brazil. **J Avian Med Surg**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 18-23, 2009.
- GONDIM, L. F. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J for Parasitol**, [s.l.], v. 34, p. 159-161, 2004.
- GONDIM, L. F. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends Parasitol**, [s.l.], v. 22, p. 247-252, 2006.
- GONDIM, L. F. P. *et al.* *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis* spp. relacionados, excretados por gambás (*Didelphis* spp.) na América do Sul. **Rev Bras de Parasitol Vet**, [s.l.], v. 30, n. 3, 2021.
- GONDIM, L. S. Q. *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Vet Parasitol**, [s.l.], v. 168, p. 121-124, 2010.

GUÇLU, F.; ALDEM-R, O. S.; GÜLER, L. Differential identification of cattle *Sarcocystis* spp. by random amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction (RAPD-PCR). **Revue de Médecine Vétérinaire**, [s.l.], v. 155, p. 440-444, 2004.

HODO, C.L. *et al.* Histopathologic and molecular characterization of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in White-winged Doves (*Zenaida asiatica*) and Eurasian Collard Doves (*Streptopelia decaocto*), East-central Texas, USA. **J. Wildl. Dis.**, [s.l.], v. 52, p. 395-399, 2016.

IRIE, T. *et al.* First molecular detection of *Sarcocystis ovalis* in the intestinal mucosa of a Japanese jungle crow (*Corvus macrorhynchos*) in Hokkaido, Japan. **Vet Parasitol: Regional Studies and Reports**, [s.l.], v. 10, p. 54-57, 2017.

JUOZAITYTĖ-NGUGU, E. *et al.* The role of birds of the family Corvidae in transmitting *Sarcocystis* protozoan parasites. **Animals**, [s.l.], v. 11, p. 3258, 2021.

KIJLSTRA, A. *et al.* The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Vet Parasitol**, [s.l.], v. 156, p. 183-190, 2008.

KING, J. S. *et al.* Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol**, [s.l.], v. 40, p. 945-950, 2010.

KONELL, A. L. *et al.* Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 221-228, 2019.

KONRADT, G. *et al.* Necrotizing meningoencephalitis caused by *Sarcocystis falcatula* in bare-faced ibis (*Phimosus infuscatus*). **Parasitol. Res.**, [s.l.], v. 116, p. 809-812, 2017.

KUTKIENĖ, L. *et al.* Description of *Sarcocystis anasi* sp. nov. and *Sarcocystis albifronsi* sp. nov. in birds of the order Anseriformes. **Parasitol Res**, [s.l.], v. 110, n. 2, p. 1043-1046, 2012a.

KUTKIENĖ, L. *et al.* Description of *Sarcocystis turdusi* sp. nov. from the common blackbird (*Turdus merula*). **Parasitol.** [s.l.], v. 139, n. 11, p. 1438-1443, 2012b.

KUTKIENĖ, L. *et al.* Identification of *Sarcocystis rileyi* from the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) in Europe: cyst morphology and results of DNA analysis. **Parasitol Res**, [s.l.], v. 108, n. 3, p. 709-714, 2011.

KUTKIENĖ, L. *et al.* *Sarcocystis* in the birds family Corvidae with description of *Sarcocystis cornixi* sp. nov. from the hooded crow (*Corvus cornix*). **Parasitol Res**, [s.l.], v. 104, n. 2, p. 329-36, 2009.

LANKESTER, E. R. On *Drepanidium ranarum*, the cellparasite of the frog's blood and spleen (Gaule's Wiirmschen). **Quarterly J of Microscopic Sci**, [s.l.], v. 22, p. 53-65, 1882.

LATIF, B.; AZDAYANTI, M. Human and animal sarcocystosis in Malaysia: A review. **Asian Pacific J of Tropic Biomedic**, [s.l.], v. 6, p. 982-988, 2016.

LEMOS, B.; CERQUEIRA, R. Morphological differentiation in the white-eared opossum group (Didelphidae: Didelphis). **J Mammal**, [s.l.], v. 83, n. 2, p. 354-369, 2002.

LOPES, C. W. G. O gênero *Sarcocystis* (LANKESTER, 1882) (Apicomplexa: Sarcocistidae), uma questão a ser reavaliada no Brasil. **Rev Bras de Parasitol. Vet.**, [s.l.], v. 13, 2004.

MÁCA, O.; GONZÁLEZ-SOLÍS, D. Role of three bird species in the life cycle of two *Sarcocystis* spp. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in the Czech Republic. **Int J for Parasitol: Parasit and Wildlife**, [s.l.], v. 17, p. 133-137, 2022.

MÁCA, O.; GONZÁLEZ-SOLÍS, D. *Sarcocystis cristata* sp. nov. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in the imported great blue turaco *Corythaeola cristata* (Aves, Musophagidae). **Parasit Vectors**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 56, 2021.

MAIER-SAM, K. *et al.* Encephalitis associated with *Sarcocystis halioti* infection in a free-ranging little owl (*Athene noctua*). **J. Wildl. Dis.**, [s.l.], v. 57, n. 3, p. 712-714, 2021.

MAYR, S. L. *et al.* Accipiter hawks (Accipitridae) confirmed as definitive hosts of *Sarcocystis turdusi*, *Sarcocystis cornixi* and *Sarcocystis* sp. ex *Phalacrocorax carbo*. **Parasitol Res**, [s.l.], v. 115, n. 8, p. 3041-3047, 2016.

MCALLISTER, M. M. *et al.* Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J for Parasitol**, [s.l.], v. 28, p. 1473-1478, 1998.

MIESCHER, E. Über eigenthumliche schläuche in den muskeln einer hausmaus. **Berl. Verh. Naturforsch. Ges. Basel.**, [s.l.], v. 5, p. 198-202, 1843.

MINEO, T. W. P. *et al.* Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Vet Parasitol**, [s.l.], v. 159, n. 2, p. 149-153, 2009.

MINEO, T. W. P. *et al.* Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Vet. Parasitol**, [s.l.], v. 182, p. 352-355, 2011.

NARDONI, S. *et al.* Serological and molecular investigation on *Toxoplasma gondii* infection in wild birds. **Pathogens**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 58, 2019.

NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L; PASSOS, J. *Toxoplasma gondii*: animais envolvidos em surto de toxoplasmose humana. **Rev da Socied Bras de Med Trop**, [s.l.], v. 27, p. 516, 1994.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **C R Acad Sci**, [s.l.], v. 148, p. 369, 1909.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **C R Acad Sci**, [s.l.], v. 147, p. 736, 1908.

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.). **Vet Parasitol**. [s.l.], v. 200, p. 59-65, 2014.

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*). **Vet Parasitol**, [s.l.], v. 171, p. 7-14, 2010b.



- 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. **Parasitol Res**, [s.l.], v. 106, n. 3, p. 577-585, 2010a.
- PARMENTIER, S. L. *et al.* High prevalence of *Sarcocystis calchasi* in racing pigeon flocks in Germany. **PLOS ONE**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. e0215241, 2019.
- PARMENTIER, S. L. *et al.* Prevalence of *Sarcocystis calchasi* in free-ranging host species: Accipiter hawks and Common Woodpigeon in Germany. **Sci Rep**, [s.l.], v. 8, p. 17610, 2018.
- 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 Parasitol**, Praha, v. 61, n. 1, p. 11-17, 2014a.
- PRAKAS, P. *et al.* Identification and intraspecific genetic diversity of *Sarcocystis rileyi* from ducks, *Anas* spp., in Lithuania and Finland. **The J of Parasitol**, [s.l.], v. 100, n. 5, p. 657-661, 2014b.
- PRAKAS, P. *et al.* Molecular and morphological investigations of *Sarcocystis corvusi* sp. nov. from the jackdaw (*Corvus monedula*). **Parasitol Res**, [s.l.], v. 112, n. 3, p. 1163-1167, 2013.
- PRAKAS, P. *et al.* Molecular identification of *Sarcocystis halietai* in the muscles of two species of birds of prey from Spain. **Parasites Vectors**, [s.l.], v. 14, p. 414, 2021.
- PRAKAS, P. *et al.* Morphologic and genetic identification of *Sarcocystis fulicae* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the eurasian coot (*Fulica atra*). **J Wildl Dis**, [s.l.], v. 54, n. 4, p. 765-771, 2018a.
- PRAKAS, P. *et al.* Morphological and genetic characterisation of *Sarcocystis halietai* from the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*). **Parasitol Res**, [s.l.], v. 117, n. 11, p. 3663-3667, 2018b.
- PRAKAS, P. *et al.* *Sarcocystis* sp. from the herring gull (*Larus argentatus*) identity to *Sarcocystis wobeseri* based on cyst morphology and DNA results. **Parasitol Res**, [s.l.], v. 109, n. 6, p. 1603-1608, 2011.
- PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, [s.l.], v. 58, p. 45-58, 2012.
- PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; JUOZAITYTĖ-NGUGU, E. Molecular and morphological description of *Sarcocystis kutkienae* sp. nov. from the common raven (*Corvus corax*). **Parasitol Res**, [s.l.], v. 119, p. 4205-4210, 2020.
- REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense?. **Vet Parasitol**, [s.l.], v. 142, p. 23-34, 2006.
- ROGERS, K. H. *et al.* *Sarcocystis calchasi* and other Sarcocystidae detected in predatory birds in California, USA. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, [s.l.], v. 17, p. 91-99, 2021.
- ROMMEL, M. Recent Advances in the Knowledge of the Biology of the Cyst-Forming Coccidia. **Angew. Parasitol**. [s.l.], v. 30, p. 73-183, 1989.

- RUAS, J. L.; CUNHA, C. W.; SILVA, S. S. Prevalência de *Sarcocystis* spp. (LANKESTER, 1882) em bovinos clinicamente sadios, da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev Bras de Agrociência**, [s.l.], v. 7, p. 227-230, 2001.
- SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. **Science**, [s.l.], v. 85, p. 336-338, 1937.
- SALANT, H. *et al.* *Neospora caninum* in crows from Israel. **Vet. Parasitol**, [s.l.], v. 212, p. 375-378, 2015.
- SHADBOLT, T. *et al.* Molecular identification of *Sarcocystis wobeseri*-like parasites in a new intermediate host species, the white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*). **Parasitol Res**, [s.l.], v. 120, n. 5, p. 1845-1850, 2021.
- SMITH, K. F.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; PEDERSEN, A. B. The role of infectious diseases in biological conservation. **Animal Conservation Journal**, [s.l.], v. 12, p. 1-12, 2009.
- SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. **Rev Soc Sci Sao Paulo**, São Paulo, v. 3, p. 109-112, 1908.
- SYKES, J. E. **Canine and feline infectious diseases**. 1st ed. [S.l.]: Saunders, 2013. 928p.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2017. 1052 p.
- TENTER, A. M. Current research on sarcocystis species of domestic animals. **Int J Parasitol**, [s.l.], v. 25, p. 1311-1330, 1995.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R. Development of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystosis in sheep. **Int J for Parasitol**, [s.l.], v. 29, p. 1331-1349, 1999.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J for Parasitol**, [s.l.], v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.
- THOMPSON, R. C. A.; LYMEBRY, A. J.; SMITH, A. Parasites, emerging disease and wildlife conservation. **Int J for Parasitol**, [s.l.], v. 40, p. 1163-1170, 2010.
- TRUPPEL, J. H. *et al.* Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitol Int**, [s.l.], v. 59, p. 376-379, 2010.
- VERMA, S. K. *et al.* *Sarcocystis jamaicensis* n. sp., from Red-Tailed Hawks (*Buteo jamaicensis*) Definitive Host and IFN- $\gamma$  Gene Knockout Mice as Experimental Intermediate Host. **J Parasitol**, [s.l.], v. 103, n. 5, p. 555-564, 2017.
- WÜNSCHMANN, A. *et al.* Natural Fatal *Sarcocystis falcatula* Infections in Free-Ranging Eagles in North America. **J of Vet Diagnos Invest**, [s.l.], v. 22, n. 2, p. 282-289, 2010.
- WÜNSCHMANN, A. *et al.* *Sarcocystis falcatula*-associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*). **J Vet Diagn Invest**, [s.l.], v. 21, p. 283-287, 2009.

**APÊNDICE A – LISTA DE AVES AMOSTRADAS**

<b>Identificação</b>	<b>Família</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Distribuição</b>
1	Anatidae	Marreca-caneleira	<i>Dendrocygna bicolor</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	Brasil
2	Fringillidae	Canario-belga	<i>Serinus canaria</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	África
3	Fringillidae	Canario-belga	<i>Serinus canaria</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	África
4	Fringillidae	Canario-belga	<i>Serinus canaria</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	África
5	Psittacidae	Arara-vermelha-grande	<i>Ara chloropterus</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América Central e do Sul
6	Accipitridae	Gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América Central e do Sul
7	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	América do Sul
8	Ramphastidae	Tucano-de-bico-verde	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Brasil
9	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
10	Psittacidae	Papagaio-de-peito-roxo	<i>Amazona vinacea</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
11	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
12	Ramphastidae	Tucano-de-bico-verde	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	Brasil
13	Columbidae	Juriti	<i>Leptotila verreaux</i>	Macho	Jovem	Vida livre	Américas
14	Psittacidae	Papagaio-do-mangue	<i>Amazona amazonica</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América Central e do Sul
15	Ciconiidae	Maguari	<i>Ciconia maguari</i>	Macho	Adulto	Vida livre	América do Sul
16	Cacatuidae	Calopsita	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Macho	Adulto	Doméstico	Austrália
17	Psittacidae	Periquito-do-Bourke	<i>Neopsephotus bourkii</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Austrália
18	Psittacidae	Periquito-do-Bourke	<i>Neopsephotus bourkii</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Austrália
19	Psittacidae	Periquito-do-Bourke	<i>Neopsephotus bourkii</i>	Macho	Adulto	Criatório	Austrália
20	Psittacidae	Periquito Red Rumped	<i>Psephotus haematonotus</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Austrália

<b>Identificação</b>	<b>Família</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Distribuição</b>
21	Psittacidae	Rosela-multicolorida	<i>Platycercus eximius</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Austrália
22	Psittacidae	Rosela-multicolorida	<i>Platycercus eximius</i>	Macho	Jovem	Criatório	Austrália
23	Psittacidae	Periquito-do-Bourke	<i>Neopsephotus bourkii</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Austrália
24	Psittacidae	Papagaio-charão	<i>Amazona pretrei</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Brasil
25	Estrildidae	Mandarim	<i>Taeniopygia guttata</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Europa, Ásia, Austrália, América do norte e do Sul
26	Estrildidae	Diamante-de-gold	<i>Erythrura gouldiae</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Austrália
27	Estrildidae	Bavete-de-cauda-curta	<i>Poephila cincta</i>	Macho	Adulto	Criatório	Austrália
28	Estrildidae	Bavete-de-cauda-curta	<i>Poephila cincta</i>	Macho	Adulto	Criatório	Austrália
29	Psittacidae	Rosela-multicolorida	<i>Platycercus eximius</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Austrália
30	Psittacidae	Periquito-esplendido	<i>Neophema splendida</i>	Macho	Adulto	Criatório	Austrália
31	Psittacidae	Tuim	<i>Forpus xanthopterygius</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	América do Sul
32	Psittacidae	Rosela-multicolorida	<i>Platycercus eximius</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Austrália
33	Psittacidae	Rosela-multicolorida	<i>Platycercus eximius</i>	Macho	Adulto	Criatório	Austrália
34	Columbidae	Rolinha-cinzenta	<i>Columbina passerina</i>	Macho	Jovem	Vida livre	Américas
35	Psittacidae	Periquito Red Rumped	<i>Psephotus haematonotus</i>	Macho	Adulto	Criatório	Austrália
36	Psittacidae	Rosela-multicolorida	<i>Platycercus eximius</i>	Fêmea	Jovem	Criatório	Austrália
37	Psittacidae	Periquito-do-Bourke	<i>Neopsephotus bourkii</i>	Fêmea	Adulto	Criatório	Austrália
38	Psittacidae	Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Fêmea	Adulto	Doméstico	América do Sul
39	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
40	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
41	Cracidae	Mutum-de-penacho	<i>Crax fasciolata</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
42	Columbidae	Pomba-de-bando	<i>Zenaida auriculata</i>	Macho	Adulto	Vida livre	América do Sul

<b>Identificação</b>	<b>Família</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Distribuição</b>
43	Tyrannidae	Tesourinha-do-campo	<i>Tyrannus savana</i>	Macho	Adulto	Vida livre	América Central e do Sul
44	Columbidae	Pomba-de-bando	<i>Zenaida auriculata</i>	Macho	Jovem	Vida livre	América do Sul
45	Hirundinidae	Andorinha-pequena-de-casa	<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	Macho	Adulto	Vida livre	América Central e do Sul
46	Cacatuidae	Calopsita	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Macho	Jovem	Doméstico	Austrália
47	Psittacidae	Periquito-australiano	<i>Melopsittacus undulatus</i>	Fêmea	Adulto	Doméstico	Austrália
48	Psittacidae	Periquito-australiano	<i>Melopsittacus undulatus</i>	Macho	Adulto	Doméstico	Austrália
49	Turdidae	Sabiá-laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i>	Macho	Jovem	Vida livre	América do Sul
50	Psittacidae	Periquito Red Rumped	<i>Psephotus haematonotus</i>	Macho	Jovem	Criatório	Austrália
51	Phasianidae	Faisão-de-swinhoe	<i>Lophura swinhoii</i>	Macho	Jovem	Criatório	Ásia
52	Phasianidae	Faisão-dourado	<i>Chrysopholus pictus</i>	Macho	Adulto	Criatório	Ásia
53	Phasianidae	Faisão-elliott	<i>Syrmaticus ellioti</i>	Macho	Adulto	Criatório	Ásia
54	Thraupidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
55	Thraupidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Macho	Jovem	Mantenedouro	América do Sul
56	Thraupidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
57	Thraupidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Macho	Jovem	Mantenedouro	América do Sul
58	Thraupidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Macho	Jovem	Mantenedouro	América do Sul
59	Phasianidae	Pavão-comum	<i>Pavo cristatus</i>	Macho	Adulto	Criatório	Ásia
60	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
61	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
62	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
63	Psittacidae	Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
64	Ramphastidae	Tucano-de-bico-verde	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Fêmea	Jovem	Mantenedouro	Brasil

<b>Identificação</b>	<b>Família</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Distribuição</b>
65	Cracidae	Mutum-de-penacho	<i>Crax fasciolata</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
66	Fringillidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Macho	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
67	Fringillidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Macho	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
68	Fringillidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
69	Psittacidae	Papagaio-de-peito-roxo	<i>Amazona vinacea</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
70	Psittacidae	Tiriba-de-testa-vermelha	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	Brasil
71	Psittacidae	Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
72	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
73	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
74	Cardinalidae	Azulão	<i>Cyanoloxia brissonii</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
75	Psittacidae	Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
76	Psittacidae	Papagaio-charão	<i>Amazona pretrei</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	Brasil
77	Psittacidae	Sabiá-cica	<i>Triclaria malachitacea</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
78	Psittacidae	Papagaio-da-patagônia	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Europa e América do Sul
79	Fringillidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
80	Ramphastidae	Tucano-de-bico-verde	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Fêmea	Não identificado	Mantenedouro	Brasil
81	Psittacidae	Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
82	Psittacidae	Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
83	Psittacidae	Papagaio-charão	<i>Amazona pretrei</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	Brasil
84	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
85	Motacillidae	Caminheiro-de-espora	<i>Anthus correndera</i>	Macho	Jovem	Mantenedouro	América do Sul

<b>Identificação</b>	<b>Família</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Distribuição</b>
86	Thraupidae	Bico-duro	<i>Saltator aurantirostris</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
87	Fringillidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
88	Psittacidae	Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	Fêmea	Jovem	Mantenedouro	América do Sul
89	Psittaculidae	Periquito-de-colar	<i>Psittacula krameri</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	Ásia e África
90	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
91	Columbidae	Pomba-de-bando	<i>Zenaida auriculata</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
92	Psittacidae	Maitaca-verde	<i>Pionus maximiliani</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
93	Psittacidae	Tiriba-de-testa-vermelha	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	Brasil
94	Fringillidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
95	Fringillidae	Canário-belga	<i>Serinus canaria</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	África
96	Columbidae	Pomba-de-bando	<i>Zenaida auriculata</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
97	Psittacidae	Tiriba-de-testa-vermelha	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Macho	Não identificado	Mantenedouro	Brasil
98	Psittacidae	Papagaio-da-patagônia	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Europa e América do Sul
99	Columbidae	Pomba-de-bando	<i>Zenaida auriculata</i>	Não identificado	Jovem	Mantenedouro	América do Sul
100	Psittacidae	Tuim	<i>Forpus xanthopterygius</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
101	Psittacidae	Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Não identificado	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
102	Psittacidae	Papagaio-charão	<i>Amazona pretrei</i>	Não identificado	Adulto	Mantenedouro	Brasil
103	Jacanidae	Jaçanã	<i>Jacana jacana</i>	Macho	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
104	Fringillidae	Gaturamo-rei	<i>Euphonia cyanocephala</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul

<b>Identificação</b>	<b>Família</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Distribuição</b>
105	Psittacidae	Marianinha-de-cabeça-amarela	<i>Pionites leucogaster</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
106	Columbidae	Pomba-de-bando	<i>Zenaida auriculata</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
107	Phasianidae	Pavão-comum	<i>Pavo cristatus</i>	Indefinido	Jovem	Mantenedouro	Ásia
108	Psittacidae	Papagaio-charão	<i>Amazona pretrei</i>	Indefinido	Adulto	Mantenedouro	Brasil
109	Psittacidae	Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Não identificado	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
110	Psittacidae	Papagaio-da-guiné	<i>Poicephalus senegalus</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	África
111	Thraupidae	Sanhaço-frade	<i>Stephanophorus diadematus</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	Brasil
112	Cacatuidae	Calopsita	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Austrália
113	Psittacidae	Tiriba-de-testa-vermelha	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	Brasil
114	Psittacidae	Tiriba-de-testa-vermelha	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Brasil
115	Psittaculidae	Periquito-de-colar	<i>Psittacula krameri</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Ásia e África
116	Strigidae	Coruja-buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Américas
117	Psittacidae	Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
118	Accipitridae	Gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América Central e do Sul
119	Ramphastidae	Araçari-castanho	<i>Pteroglossus castanotis</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
120	Ramphastidae	Araçari-castanho	<i>Pteroglossus castanotis</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
121	Accipitridae	Gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América Central e do Sul
122	Accipitridae	Gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	Indefinido	Adulto	Mantenedouro	América Central e do Sul
123	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
124	Psittacidae	Tiriba-de-testa-vermelha	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Brasil



<b>Identificação</b>	<b>Família</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Distribuição</b>
125	Psittacidae	Tiriba-de-testa-vermelha	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Indefinido	Jovem	Mantenedouro	Brasil
126	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
127	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
128	Ramphastidae	Araçari-castanho	<i>Pteroglossus castanotis</i>	Macho	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
129	Ramphastidae	Araçari-castanho	<i>Pteroglossus castanotis</i>	Fêmea	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
130	Psittacidae	Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Indefinido	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
131	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
132	Strigidae	Coruja-buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Américas
133	Psittacidae	Marianinha-de-cabeça-amarela	<i>Pionites leucogaster</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
134	Ardeidae	Socó-boi	<i>Tigrisoma lineatum</i>	Fêmea	Não identificado	Mantenedouro	América Central e do Sul
135	Falconidae	Quiriquiri	<i>Falco sparverius</i>	Indefinido	Não identificado	Mantenedouro	Américas
136	Psittacidae	Marianinha-de-cabeça-amarela	<i>Pionites leucogaster</i>	Fêmea	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
137	Psittacidae	Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Macho	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
138	Strigidae	Coruja-buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>	Macho	Não identificado	Mantenedouro	Américas
139	Corvidae	Gralha-azul	<i>Cyanocorax caeruleus</i>	Fêmea	Adulto	Mantenedouro	Brasil
140	Psittacidae	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul

<b>Identificação</b>	<b>Família</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Distribuição</b>
141	Threskiornithidae	Curicaca	<i>Theristicus caudatus</i>	Indefinido	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
142	Accipitridae	Gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	Fêmea	Não identificado	Mantenedouro	América Central e do Sul
143	Psittacidae	Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Macho	Adulto	Mantenedouro	América do Sul
144	Strigidae	Corujinha-do-mato	<i>Megascops choliba</i>	Fêmea	Não identificado	Mantenedouro	América Central e do Sul
145	Columbidae	Pomba-de-bando	<i>Zenaida auriculata</i>	Indefinido	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul
146	Accipitridae	Gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	Indefinido	Não identificado	Mantenedouro	América Central e do Sul
147	Rallidae	Galinha-d'água	<i>Gallinula galeata</i>	Indefinido	Não identificado	Mantenedouro	Américas
148	Fringillidae	Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	Macho	Não identificado	Mantenedouro	América do Sul

## ANEXO A – AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA SISBIO/ICMBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 76022-1	Data da Emissão: 20/08/2020 14:28:43	Data da Revalidação*: 20/08/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Marta Elena Machado Alves	CPF: 019.146.760-09
Título do Projeto: Coleta de amostras teciduais de aves silvestres necropsiadas no Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias da Universidade Federal de Santa Maria no período de junho de 2016 a junho de 2021.	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Santa Maria	CNPJ: 95.591.764/0001-05

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de tecidos de aves necropsiadas pelo Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviária	11/2020	07/2021

#### Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0760220120200820

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 76022-1	Data da Emissão: 20/08/2020 14:28:43	Data da Revalidação*: 20/08/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Marta Elena Machado Alves	CPF: 019.146.760-09
Título do Projeto: Coleta de amostras teciduais de aves silvestres necropsiadas no Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias da Universidade Federal de Santa Maria no período de junho de 2016 a junho de 2021.	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Santa Maria	CNPJ: 95.591.764/0001-05

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Município de Santa Maria	Santa Maria-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal

#### Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora da natureza)

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aves	-

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade Federal de Santa Maria	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0760220120200820

Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 76022-1	Data da Emissão: 20/08/2020 14:28:43	Data da Revalidação*: 20/08/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Marta Elena Machado Alves	CPF: 019.146.760-09
Título do Projeto: Coleta de amostras teciduais de aves silvestres necropsiadas no Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias da Universidade Federal de Santa Maria no período de junho de 2016 a junho de 2021.	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Santa Maria	CNPJ: 95.591.764/0001-05

#### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0760220120200820

Página 3/3

## ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFSM)



*Comissão de Ética no Uso de Animais*

da

*Universidade Federal de Santa Maria*

Santa Maria, 18 de agosto de 2020  
CEUA N [8263100820](#)

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Fernanda Silveira Flores Vogel  
Área: Departamento De Medicina Veterinária Preventiva

Título da proposta: "Infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres: ocorrência e caracterização molecular".

### **Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSM** (ID 003142)

Aves silvestres podem ser infectadas por protozoários do gênero *Toxoplasma*, *Neospora* e *Sarcocystis*. No ciclo biológico as aves podem ser consideradas hospedeiras intermediárias e quando predadas tornam-se fonte de infecção para os hospedeiros definitivos. *Toxoplasma gondii* infecta diversas espécies de aves silvestres, podendo determinar infecção clínica em algumas espécies, entretanto, na maioria das vezes, a infecção é subclínica. Vários isolados de *T. gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. tem sido descrito em aves silvestres, porém inúmeras espécies de aves continuam sem diagnóstico. Embora se saiba que aves podem ser infectadas por estes protozoários, o papel das aves no ciclo epidemiológico das protozooses ainda não está totalmente esclarecido. As aves têm um importante papel na epidemiologia das protozooses do filo apicomplexa pelo hábito alimentar. Como se alimentam diretamente do solo, tem maior probabilidade de ingestão de oocistos e por isso são importantes sinalizadores dos protozoários que estão contaminando o ambiente. Assim, o objetivo deste estudo é obter informações sobre a ocorrência de *T. gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em amostras de tecido de aves silvestres, sendo este projeto subdividido em 2 subprojetos. No subprojeto 1 será verificada a presença de DNA dos protozoários *T. gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em amostras de cérebro e coração. No subprojeto 2 serão analisadas amostras de músculo do peito de aves silvestres para detecção de material genético do protozoário *Sarcocystis* spp. Para isso serão coletadas amostras de cérebro, coração e músculo do peito de todas as aves necropsiadas no Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA), no período de junho de 2016 a junho de 2021. As aves silvestres recebidas para necropsia no LCDPA são de diversas origens e morreram por causas variadas. Estas amostras de cérebro, coração e músculo do peito serão submetidas a testes moleculares, sendo eles: extração de DNA, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sequenciamento e teste de inibição. Os testes para detecção e caracterização molecular serão realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR). A partir deste estudo espera-se, determinar a ocorrência e caracterizar molecularmente as espécies de *T. gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria, na reunião de 18/08/2020, **ANALISOU** a proposta em questão, e decidiu por **ARQUIVAR** todo o processo.

Comentário da CEUA: [O projeto em questão não necessita ser submetido à CEUA, uma vez que envolve apenas cadáveres. Seria interessante o pesquisador manter certificado de origem desses cadáveres, para comprovação, caso seja necessário.](#)

Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria