

**UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Diagnóstico morfológico e molecular de
hemoparasitos de aves oriundas de cativeiro e
centros de reabilitação de fauna do estado do Rio
de Janeiro**

Marcos Pereira da Silva Junior

2024



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

**Diagnóstico molecular de parasitos de aves oriundas de cativeiro
e centros de triagem ou reabilitação de fauna do estado do Rio de
Janeiro**

MARCOS PEREIRA DA SILVA JUNIOR

Sob a orientação da Professora Doutora
Claudia Bezerra da Silva

Sob a coorientação dos Professores Doutores
Adilton Pacheco de Oliveira
Bruna Azevedo Baêta

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências
Veterinárias**, no Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586d Silva Junior, Marcos Pereira, 1997-
Diagnóstico morfológico e molecular de hemoparasitos
de aves oriundas de cativeiro e centros de
reabilitação de fauna do estado do Rio de Janeiro /
Marcos Pereira Silva Junior. - Rio de Janeiro, 2024.
66 f.: il.

Orientadora: Claudia Bezerra Silva.
Coorientador: Adlilton Pacheco Oliveira.
Coorientadora: Bruna de Azevedo Baêta.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2024.

1. Aves silvestres. 2. Bactéria. 3. Biologia
Molecular. 4. Citologia. 5. Protozoário . I. Silva,
Claudia Bezerra, 1984-, orient. II. Oliveira,
Adlilton Pacheco , 1988-, coorient. III. Baêta, Bruna
de Azevedo, 1984-, coorient. IV Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 407/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.010370/2024-63

Seropédica-RJ, 29 de fevereiro de 2024.

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

MARCOS PEREIRA DA SILVA JUNIOR

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a)** em Ciências, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/02/2024

(Assinado digitalmente em 19/03/2024 17:33)

CARLOS LUIZ MASSARD
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: ###61#3

(Assinado digitalmente em 03/03/2024 10:56)

CLAUDIA BEZERRA DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: ###035#8

(Assinado digitalmente em 01/03/2024 10:24)

RODRIGO GREDILHA DUARTE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.547-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 407, ano: 2024, tipo: ATA, data de emissão: 29/02/2024 e o código de verificação: 5adec77570

Se Deus fizer, Ele é Deus

Se não fizer, Ele é Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por está ao meu lado nos momentos felizes e difíceis, me mantendo de pé. Nada seria possível sem ele.

Aos meus avós maternos, Miriam e José Apolinário, que são a minha maior inspiração em toda vida. Sei que são capazes de mover montanhas para me verem feliz, sendo base em todos os momentos.

A minha irmã e mãe, Pietra e Janaina, por todo amor, carinho e apoio recebido.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Cláudia Bezerra, por todos os ensinamentos, carinho, conselhos, conversar, paciência e acolhimento. A senhora foi inspiração, energia e calma em momentos felizes e difíceis.

Ao meu eterno orientador Prof. Dr. Adlilton Pacheco, obrigado pela oportunidade e por acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava da minha capacidade.

Aos meus amigos, Gabi, Marcela, Laurinha, Byanca, Raphael, Lara, Mariana, Jeferson, Rodrigo, Thalita, Isadora, Gilliard, por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava e por me impulsionarem para o melhor resultado.

Ao Jônathan, que não só me ajudou na bancada e na escrita, mas estando ao meu lado para me apoiar no que precisasse. Eu tenho plena certeza que não chegaria até aqui se não fosse você. Obrigado por ser luz na minha vida!

Aos locais de coletas que abriram as portas para realizar o projeto. Em especial ao Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) que sempre foi a minha segunda casa e me ensinou muito.

A todos os animais que participaram desta pesquisa, todo o meu carinho e gratidão por vocês, tenho muito orgulho de trabalhar com cada espécie, espero contribuir mais e mais com a conservação e a reabilitação da Fauna Brasileira.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa durante o Mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Marcos Pereira da Silva Junior, filho de Marcos Pereira da Silva e Janaina Diacui Ferreira Soares Costa, nasceu em 26 de maio de 1997, no município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro.

Cursou todo o ensino fundamental e ensino médio em Instituições particulares do município do Rio de Janeiro, concluindo em 2014.

Em 2016, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estácio de Sá.

Durante toda a graduação realizou estágio na área de silvestres/selvagens, realizando iniciação científica na área de Parasitologia com ênfase no diagnóstico de hemoparasitos de animais silvestres no município do Rio de Janeiro, concluído a graduação em Janeiro de 2022.

Atuou como médico veterinário de animais silvestres em clínicas veterinárias especializadas em pets não convencionais, centros de reabilitação de animais silvestres e zoológicos do Estado do Rio de Janeiro

Em março de 2022, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no nível de Mestrado. Em 2023 foi contemplado com a Bolsa de Mestrado do Programa Nota 10 da FAPERJ que visar estimular excelência na pós-graduação. Neste mesmo ano recebeu a premiação de Menção Honrosa pelo trabalho intitulado “Carcinoma de células escamosas em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) – relato de caso”, apresentado durante o XXI Prêmio Tokarnia de Pesquisa em Medicina Veterinária na XXXV SEMEV da UFRRJ.

Ao longo da pós-graduação participou de diversos eventos científicos, apresentando trabalhos com temas em Parasitologia.

Em maio de 2023, ingressou no Programa de Pós-Graduação da Faculdade Qualittas, no curso de especialização de Clínica e Cirurgia de Animais Silvestres e Exóticos.

Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

RESUMO

SILVA JUNIOR, M. P. **Diagnóstico morfológico e molecular de hemoparasitos de aves oriundas de cativeiro e centros de reabilitação de fauna do estado do Rio de Janeiro.** 2024. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

O estudo envolvendo hemoparasitos de aves silvestres e exóticas, sob cuidados humanos e de vida livre, auxilia diretamente na conservação de animais *ex situ* e *in situ*, através da manutenção da saúde dos animais que são mantidos em instituições e de animais que sofreram ações antrópicas, visto que o Brasil alberga uma das maiores biodiversidades do planeta. Estudos para determinação de ocorrência e diversidade desses parasitos, podem esclarecer a relação parasito-hospedeiro e as condições físicas que as aves se encontram ao albergar o agente. Posto isso, o objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência citológica e molecular de hemoparasitos em aves recebidas por Centro de Reabilitação de Animais Silvestres, pelo criadouro comercial e por Parque de Educação Ambiental, todos situados na zona oeste do estado do Rio de Janeiro. Foram colhidos sangue total de 104 aves, divididas em 55 aves de vida livre e 49 aves mantidas sob cuidados humanos. A partir disso, esfregaços sanguíneos foram confeccionados e análises moleculares realizadas para agentes dos gêneros *Borrelia* e *Ehrlichia*, família Trypanosomatidae e das ordens Haemosporida e Piroplasmida. A positividade de hemoparasitos nos indivíduos estudados foi de 13,46% (n=14/104) através da técnica molecular, sendo agentes das ordens Haemosporida (11,54%; n=12/104), Piroplasmida (0,96%; n=1/104) e para família Trypanosomatidae (0,96%; n=1/104). Na técnica de esfregaço sanguíneo foi possível observar a presença de formas tripomastigotas em amostra compatível com diagnóstico molecular com alvo no gene 24Sα-*rDNA* em amostra obtida de *Asio clamator* (Coruja-orelhuda). Foram identificados merozoítos sugestivos de Piroplasmida encontrados em esfregaço sanguíneo e confirmados por meio de PCR com alvo no gene 18S *rDNA* em *Sula leucogaster* (Atobá-pardo) de vida livre. Com a realização do sequenciamento, o agente de *Asio clamator* teve 91,60% de similaridade ao gene 24Sα-*rDNA* de *Trypanosoma theileri*, e duas amostras com similaridade de 99,57% ao fragmento do gene *cytB* de *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *paramultipigmentatus* em espécimes de *Columbina talpacoti* (Rolinha-roxa) sob condições de resgate. Além disso, observou-se também *Plasmodium* sp., com identidade de 99,9% com o fragmento do gene *cytB*, em um espécime de *Ramphastos toco* (Tucano-toco) também sob proveniente de vida livre. *Plasmodium juxtanucleare* foi encontrado com similaridade (99% a 100%) a outras sequências depositadas no GenBank em seis indivíduos de *Gallus gallus domesticus* (Galinha-doméstica), bem como *P. juxtanucleare* em um indivíduo de *Ara ararauna* (Arara-canindé), todos sob condições de cativeiro. Outro achado confirmado após sequenciamento, foi *P. juxtanucleare* em um indivíduo de *Rupornis magnirostris* (Gavião-carijó) de vida livre com 99,57% de similaridade com sequência do gene *cytB* depositado no GenBank. Estudos envolvendo a frequência de hemoparasitos em aves, auxilia na criação de protocolos de medicina preventiva e de ações de quarentena para animais que serão mantidos sob cuidados humanos ou que serão reintroduzidos em natureza, reforçando a necessidade do conhecimento do agente e do seu hospedeiro.

Palavras-chave: Aves silvestres, bactérias, biologia molecular, citologia, protozoários.

ABSTRACT

SILVA JUNIOR, M. P. **Morphological and molecular diagnosis of hemoparasites in birds from captivity and fauna rehabilitation centers in the state of Rio de Janeiro.** 2024. 66p. Dissertation (Masters in Veterinary Sciences). Graduate Program in Veterinary Sciences. Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

The study of hemoparasites in wild and exotic birds, under human care and free-living, directly helps in the conservation of ex situ and in situ animals, by maintaining the health of animals that are kept in institutions and animals that have suffered anthropic actions, given that Brazil is home to one of the greatest biodiversities on the planet. Studies to determine the occurrence and diversity of these parasites can shed light on the parasite-host relationship and the physical conditions that birds find themselves in when harboring the agent. That said, the aim of this study was to investigate the cytological and molecular occurrence of hemoparasites in birds received by a Wild Animal Rehabilitation Center, a commercial breeding facility and an Environmental Education Park, all located in the western zone of the state of Rio de Janeiro. Blood was collected from a total of 104 birds, divided into 55 free-living birds and 49 birds kept under human care. Blood smears were then taken and molecular analyses carried out for agents of the *Borrelia* and *Ehrlichia* genus, the Trypanosomatidae family and the Haemosporida and Piroplasmida orders. The positivity of hemoparasites in the individuals studied was 13.46% (n=14/104) through the molecular technique, with agents from the orders Haemosporida (11.54%; n=12/104), Piroplasmida (0.96%; n=1/104) and the Trypanosomatidae family (0.96%; n=1/104). In the blood smear technique, it was possible to observe the presence of trypomastigote forms in a sample compatible with molecular diagnosis targeting the 24S α -rDNA gene in a sample obtained from *Asio clamator* (Striped Owl). Merozoites suggestive of Piroplasmida were identified in blood smears and confirmed by PCR targeting the 18S rDNA gene in free-living *Sula leucogaster* (Brown Booby). With sequencing, the *Asio clamator* agent had 91.60% similarity to the 24S α -rDNA gene of *Trypanosoma theileri*, and two samples with 99.57% similarity to the *cytB* gene fragment of *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *paramultipigmentatus* in *Columbina talpacoti* (Ruddy Ground-Dove) specimens under rescue conditions. *Plasmodium* sp. was also found, with 99.9% identity with the *cytB* gene fragment, in a specimen of *Ramphastos toco* (Toco Toucan) also from the wild. *Plasmodium juxtannucleare* was found with similarity (99% to 100%) to other sequences deposited in GenBank in six individuals of *Gallus gallus domesticus* (Chicken), as well as *P. juxtannucleare* in one individual of *Ara ararauna* (Blue-and-yellow Macaw), all under captive conditions. Another finding confirmed after sequencing was *P. juxtannucleare* in a free-living individual of *Rupornis magnirostris* (Roadside Hawk) with 99.57% similarity to the *cytB* gene sequence deposited in GenBank. Studies involving the frequency of hemoparasites in birds help in the creation of preventive medicine protocols and quarantine actions for animals that will be kept under human care or that will be reintroduced into the wild, reinforcing the need for knowledge of the agent and its host.

Keywords: Wild birds, bacteria, molecular biology, cytology, protozoa.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Biodiversidade de aves utilizadas na dissertação- A. *Amazona aestiva* (Papagaio-verdadeiro); B. *Ramphastos vitellinus* (Tucano-de-bico-preto); C. *Pulsatrix koeniswaldiana* (Murucututu-de-barriga-amarela); D. *Balearica regulorum* (Grou-coroadado); E. *Gallus gallus domesticus* (Galinha-doméstica); F. *Goura cristata* (Pomba-goura). Fonte: arquivo pessoal.....3
- Figura 2.** Representação esquemática dos diferentes morfotipos presentes nos tripanossomatídeos. Fonte: D’Avila-Levy et al., 2015. o travessão deve ser substituído pela palavra “mastigota”.....7
- Figura 3.** Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Ave: 1 – 16. Vetor: 17-24. , I, II – merogonia exoeritrocítica primária; III – merogonia eritrocítica; IV – merogonia exoeritrocítica secundária; 1- esprozoítos em células reticuloendoteliais; 2,3- criptozoítos; 4- merozoítos em macrófagos; 5,6 -metacriptozoítos; 7- merozoítos nos eritrócitos; 8 – gametócitos; 9- merozoítos nas células endoteliais dos capilares; 13, 14- fanerozoítos; 15-merozoítos nos eritrócitos; 16 -gametócitos; 17- macrogametócitos; 18- exflagelação dos microgametas; 19- fertilização dos macrogametas; 20- oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21- oocistos jovens; 22, 23 – esporogonia; 24- esporozoítos na glândula salivar do vetor. (CHAGAS, 2016).....9
- Figura 4.** Colheita de sangue da veia jugular direita de *Ara ararauna*. Fonte: arquivo pessoal.....13
- Figura 5.** Presença de merozoítos (setas vermelhas) intracelulares em eritrócitos de *Sula leucogaster* de vida livre, observado sob microscopia óptica em aumento de 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.....21
- Figura 6.** Presença de gametócito (seta vermelha) de Haemosporida em eritrócito de *Columbina talpacoti* de vida livre, observado sob microscopia óptica em aumento de 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.....21
- Figura 7.** Presença de estrutura extra-eritrocitária suspeita de tripanosomatídeo em amostra de *Asio clamator* de vida livre, observado sob microscopia óptica em aumento de 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.....22
- Figura 8.** Presença de estruturas intra-eritrocitárias suspeita de haemosporídeos em amostra de *Rupornis magnirostris* de vida livre, observado sob microscopia óptica em aumento de 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.....22
- Figura 9.** Representação dos produtos da PCR para o gene *18S rRNA*, aplicado em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separado por eletroforese (5V/cm), corado em brometo de etídio e visualizado em transiluminador de Luz UV. Poços 1-19 e 21-58: Amostras testes negativas; Poço 20: Amostra teste positiva; Poço 59: Controle negativo; Poço 60: Controle positivo.....23

Figura 10. Representação dos produtos da PCR para o gene *dsb*, aplicado em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separado por eletroforese (5V/cm), corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de Luz UV. Poço 01: Ladder; Poços 2-28: Amostras testes negativas; Poço: 29: Controle negativo; Poço 30: Controle positivo.....24

Figura 11. Representação dos produtos da PCR para o gene *flaB*, aplicado em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separado por eletroforese (5V/cm), corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de Luz UV. Poço 01: ladder; Poços 2-27: Amostras testes negativas; Poço 28: Controle negativo; Poços 29 e 30: Controles positivos.24

Figura 12. Representação dos produtos da PCR para o gene 24S, aplicado em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separado por eletroforese (5V/cm), corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de Luz UV. Poço 01: ladder; Poços 2-5 e 7-28: Amostras testes negativas; Poço 06: Amostra teste positiva; Poço 29: Controle negativo; Poço 30: Controle positivo.....25

Figura 13. Análise filogenética de organismo da família Trypanosomatidae detectado em ave *Asio clamator* (Coruja Mocho Orelhuda), baseada na comparação da sequência do gene 24Sα-*rDNA* (292 pares de base após ajuste manual). Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Maximum Likelihood e modelo Tamura-Nei, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *Trypanosoma cruzi* (GQ303145.1) e *Trypanosoma rangeli* (JN016745.1) foram usadas como outgroups. Sequência do presente estudo: amostra 66.....26

Figura 14. Análise filogenética de *Plasmodium* sp. detectado em ave *Ramphastos toco* (Tucano toco), baseada na comparação da sequência do gene *cytb* (451 pares de base após ajuste manual). Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Neighbor-Joining e modelo Kimura 2-parameter, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *Leucocytozoon quynzae* (KF309188.1) foi usado como outgroup. Sequência do presente estudo: amostra 29.....27

Figura 15. Análise filogenética de protozoário da ordem Haemosporida detectado em ave *Columbina talpacoti* (Rolinha), baseada na comparação da sequência do gene *cytb* (342 pares de base após ajuste manual). Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Maximum Likelihood e modelo Tamura-Nei, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *Leucocytozoon quynzae* (KF309188.1) foi usado como outgroup. Sequências do presente estudo: amostra 52 e amostra 53.....28

Figura 16. Análise filogenética de protozoários da ordem Haemosporida detectado em *Gallus gallus domesticus*, baseada na comparação da sequência do gene *cytb* (356 pares de base após ajuste manual). Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Neighbor-Joining e modelo Kimura 2-parameter, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *Leucocytozoon quynzae* (KF309188.1) foi usado como outgroup. Sequências do presente estudo: amostra 139, 142, 143 e 146.....29

Figura 17. Análise filogenética de protozoários da ordem Haemosporida detectado em animais silvestres das espécies *Rupornis magnirostris* (vida livre) e *Ara ararauna* (cativeiro), baseada na comparação da sequência do gene *cytb*. Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Neighbor-Joining e modelo Kimura 2-parameter, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *Leucocytozoon quynzae* (KF309188.1) foi usado como outgroup. Sequências do presente estudo: amostra 78 e 128.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de Famílias, espécies, nomes populares e quantidade de aves silvestres de vida livre coletadas no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres – UNESA/RJ.....19

Tabela 2. Relação de Famílias, espécies, nomes populares e quantidade de aves silvestres coletadas em Criação Comercial e Jardim zoológico.....20

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Oligonucleotídeos e suas características utilizados para detecção de hemoparasitos em aves silvestres sob cuidados humanos e vida livre.....	17
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Biodiversidade de aves.....	2
2.2 Centros de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), Criação Comercial e Jardim Zoológico.....	3
2.3 Ocorrência de hemoparasitos em animais silvestres.....	3
2.3.1 Ordem Piroplasmida.....	4
2.3.2 Família Spirochetaceae	5
2.3.3 Família Anaplasmataceae.....	6
2.3.4 Família Trypanosomatidae.....	6
2.3.5 Ordem Haemosporida.....	8
2.4 Métodos Diagnósticos.....	10
2.4.1 Caracterização morfológica.....	10
2.4.2 Diagnóstico molecular.....	10
2.4.3 Métodos indiretos.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Aspectos éticos e legais da pesquisa científica.....	12
3.2 Locais de processamento de amostras.....	12
3.3 Origem das amostras.....	12
3.4 Colheita de material biológico.....	12
3.5 Técnica de esfregaço sanguíneo.....	13
3.6 Diagnóstico molecular.....	13
3.6.1 Extração de DNA.....	13
3.6.2 Análise molecular para Ordem Piroplasmida.....	14
3.6.3 Análise molecular para <i>Borrelia</i> spp.....	14
3.6.4 Análise molecular para <i>Ehrlichia</i> spp.....	15
3.6.5 Análise molecular para Família Trypanosomatidae.....	15
3.6.6 Análise molecular para Ordem Haemosporida.....	15
3.7 Eletroforese e análise dos resultados.....	18
3.8 Sequenciamento genético.....	18
4 RESULTADOS.....	19
4.1 Caracterização e localização das amostras coletadas.....	19

4.2 Diagnóstico de Parasitos.....	20
4.2.1 Diagnóstico direto de hemoparasitos por esfregaços sanguíneos.....	20
4.2.2 Detecção de DNA de agentes da ordem Piroplasmida.....	23
4.2.3 Detecção de DNA de <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Borrelia</i> spp.....	23
4.2.4 Diagnóstico e caracterização molecular: família Trypanosomatidae.....	25
4.2.5 Diagnóstico e caracterização molecular: Ordem Haemosporida.....	26
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÃO.....	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	49

1 INTRODUÇÃO

O território brasileiro apresenta a maior biodiversidade do planeta, possuindo seis biomas (Caatinga, Cerrado, Amazônia, Pampa, Pantanal e Mata Atlântica), sendo parte dessa biodiversidade, uma grande variedade de fauna, onde as aves compõem 1903 espécies (ICMBIO, 2018). Porém, estima-se que cerca de 38 milhões de animais sejam retirados anualmente da natureza, movimentando em torno de 10 bilhões de dólares por ano (RENCTAS, 2001; DE ALEXANDRIA PAGANO et al., 2009; SANTOS et al., 2011). Devido ao aumento dessas ilegalidades cresceu também o número de apreensões feitas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Com isso, os Centros de Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres (CETAS e CRAS) foram criados com o objetivo principal de receber e manter esses animais oriundos de apreensões realizadas pelos órgãos ambientais, entrega voluntária e resgate até que estes possam ser soltos ou transferidos para um zoológico ou criadouro cadastrado (BRASIL, 2003; SANTOS et al., 2011).

Os animais ao serem recebidos pelo CRAS ou CETAS, podem albergar agentes causadores de enfermidades que conseguem se disseminar no local se não forem preventivamente diagnosticados e dentre esses problemas sanitários estão as enfermidades parasitárias que são as doenças mais frequentes de animais domésticos e silvestres, podendo causar desde infecções subclínicas até a morte, sendo as hemoparasitoses muito comuns principalmente em casos de alta-densidade populacional (FREITAS et al. 2002; RIBEIRO et al. 2019). Posto isso, o controle sanitário dessas parasitoses faz parte do plano de manejo do CRAS/CETAS, uma vez que a reintrodução do animal na natureza só é possível se o mesmo estiver saudável (IUCN 2011).

Percebendo que os agentes causadores de hemoparasitoses possuem distribuição cosmopolita e que a infecção sofre dependência de seus vetores (MACPHERSON, 2005; GEIGER et al, 2015), alguns relatos de hemoparasitos como *Trypanosoma* sp. (DUARTE, 2020), *Anaplasma* sp. (IOANNOU et al., 2009; MACHADO et al., 2012), *Babesia* sp. (SGARIONI et al., 2023), *Ehrlichia* sp. (MACHADO et al., 2012; MUÑOZ-LEAL et al., 2019), *Haemoproteus* sp. (TOSTES et al., 2015) e *Plasmodium* sp. (TOSTES et al., 2015) já foram descritos em animais silvestres, incluindo aves de vida livre e mantidas sob cuidados humanos. Contribuindo para o entendimento das hemoparasitoses presentes em aves silvestres e exóticas de vida livre e mantidas em cativeiro, de interesse para a conservação da espécie *ex situ* e *in situ*, esta pesquisa teve como objetivo detectar hemoparasitos em aves oriundas de zoológicos, criadouro e centros de triagem ou reabilitação de fauna do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biodiversidade de Aves

A origem das aves vem sendo discutida por diversos campos da pesquisa, onde nas últimas décadas foi concretizado a evolução vinda da subordem Theropoda, gerando uma linhagem próxima a diversos répteis como quelônios e squamatas (CHIAPPE; VARGAS, 2003). Tal descoberta impacta em aspectos biológicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (PRUM, 2002).

As aves podem ser encontradas em todo o planeta, com exceção do interior da Antártida e de águas profundas. Possui uma biodiversidade e uma grande variedade de tamanhos, como o beija flor das Antilhas (*Anthracothorax dominicus*) que podem pesar até 2g e o Avestruz (*Struthio camelus*) que pode chegar aos 100kg (BENCKE, 2001) (Figura 1).

Segundo dados do IBGE (2014), o Brasil se encontra responsável pela maior biodiversidade do planeta, sendo ela composta por 120 mil espécies de invertebrados e aproximadamente 8.930 espécies de vertebrados. Dentre as estatísticas, as aves registram um número de aproximadamente 1.903 espécies, ficando atrás somente da quantidade existente de peixes marinhos (IBGE, ICMBio, 2018). Entre o grande número de avifauna brasileira, 257 se encontram na lista vermelha do Ministério do Meio Ambiente (ICMBIO, 2022).

As aves são os animais mais cobiçados pelo tráfico de animais no Brasil, correspondendo a 82% do total de espécimes apreendidas, entre os anos de 1999 e 2000 (IBGE, 2004). Entretanto, o índice de mortalidade dos indivíduos chega à 90%, devido às condições precárias de armazenamento, captura e transporte (ROCHA, 1995).

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2021), o Brasil se encontra com a segunda maior população de cães, gatos e aves ornamentais do mundo. Destaca-se a grande população de pets não convencionais, caracterizado por aves ornamentais, répteis e pequenos mamíferos, sendo assim um mercado ascendente e com grande potencial (ABINPET, 2019; ABINPET, 2020). Outro desafio é a redução do tráfico de animais e a demonstração que criatórios se encontram interessados na preservação e na sustentabilidade (ABRASE, 2012).

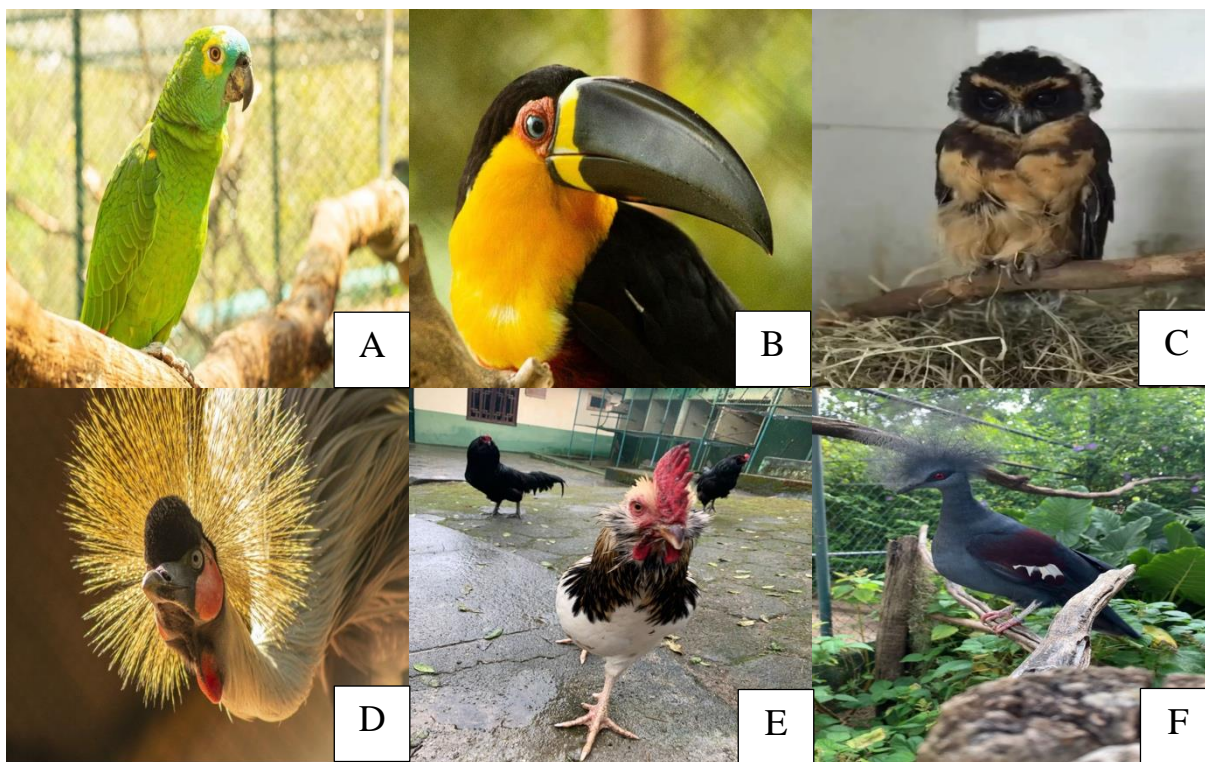


Figura 1. Biodiversidade de aves utilizadas na dissertação- A. *Amazona aestiva* (Papagaio-verdadeiro); B. *Ramphastos vitellinus* (Tucano-de-bico-preto); C. *Pulsatrix koeniswaldiana* (Murucututu-de-barriga-amarela); D. *Balearica regulorum* (Grou-coroadado); E. *Gallus gallus domesticus* (Galinha-doméstica); F. *Goura cristata* (Pomba-goura). Fonte: arquivo pessoal.

2.2 Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), Criação Comercial e Jardim Zoológico

Segundo a resolução de N°157, de 19 de outubro de 2018, do Instituto Estadual do Meio Ambiente (INEA), os empreendimentos de fauna silvestres e exóticas, são divididos em categorias autorizadas, reguladas e controladas. Entendendo-se como Centro de Reabilitação de Fauna Silvestre Nativa, os empreendimentos tem a finalidade de receber, identificar, marcar, triar, avaliar, recuperar e reabilitar espécimes nativas, que são provenientes de resgates e possuem por fins programas de reintrodução no ambiente natural.

Classifica-se como criação comercial, os estabelecimentos com finalidades de manter e reproduzir espécies da fauna nativa sob cuidados humanos, cujo objetivo é a utilização em atividades comerciais (INEA, 2018).

Os Jardins zoológicos são especificados como instituições que possuem coleções de animais silvestres mantidos vivos, sob cuidados humanos ou em semiconfinamento, sendo expostos aos visitantes para atender as finalidades educativas, científicas, conservacionistas e socioculturais (INEA, 2018).

2.3 Ocorrência de Hemoparasitos em animais silvestres

Dentre os hemoparasitos, diversos gêneros se inserem, dentre eles estão *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Borrelia*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, entre outros (DAVIES; JOHNSTON, 2000; HALLA et al., 2014). Esses agentes possuem grande importância mundial,

devido as diversas parasitoses que podem estar associadas às zoonoses (COIMBRA, 2020; SANTOS, 2018)

A transmissão destes agentes pode ocorrer através de vetores artrópodes como moscas, mosquitos, pulgas e carrapatos (COLWELL et al., 2011). Quadros como imunossupressão do hospedeiro geram influências nas taxas de infecção dos hemoparasitos em seus respectivos hospedeiros. Desta forma, alterações em dietas e animais oriundos do tráfico que passaram por condições de estresse de captura, transporte e alterações climáticas, podem favorecer a disseminação de agentes patogênicos e consequentemente possíveis zoonoses (BARBOSA, 2014).

Estudos para realizar a detecção de hemoparasitos em animais silvestres vem ocorrendo através de Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), como demonstra Cordeiro (2022), em pesquisa de *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. e *Ehrlichia* spp. em *Didelphis aurita* do município de Seropédica. Além da existência de hemoparasitos ocorrendo em aves do Estado do Rio de Janeiro, mesmo que com a baixa ocorrência de indivíduos positivos na região da Ilha de Marambaia (BRUM, 2016).

2.3.1 Ordem Piroplasmida

Com base em análises multigênicas, a ordem possui três gêneros como *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*, onde ambos os gêneros possuem características morfológicas e desenvolvimentos semelhantes, como organelas complexas, merogonia dentro de eritrócitos de hospedeiros vertebrados e multiplicação sexual seguida pela formação de esporozoítos em vetores invertebrados (HOMER et al., 2000).

Dentro das células preferenciais, os gêneros *Babesia* e *Theileria* possuem plasticidade morfológica, apresentando formas variáveis, uma vez que as babesias possuem formato piriforme, podendo ser encontradas em forma única, dímera ou em cruz e *Theileria* possui formatos oval, anular, circular, ovóide ou irregular (LAHA et al., 2015; LEMPEREUR et al., 2017). São parasitos distintos, com diferenças no que tange ao parasitismo e à biologia, porém devido às diversas formas e o mesmo modo de transmissão, podem ser confundidos (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Em relação a *Cytauxzoon felis* dentro de eritrócitos, a morfologia é muito semelhante à de pequenas *Babesia* spp. e *Theileria* spp., sendo encontrados formatos individuais anelares, ovais ou circulares, com diâmetro de 0.5–0.8µm (CARLI et al., 2012).

O gênero *Babesia* compreende protozoários que parasitam hemácias de humanos, animais domésticos e silvestres. Sua transmissão depende de invertebrados da família Ixodidae para realizar o ciclo biológico, visto que, o desenvolvimento sexual ocorre dentro dos carrapatos. Os principais gêneros da família Ixodidae envolvidos na transmissão do agente são *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* e *Ixodes* (GENCHI, 2007; PIETROBELLI et al., 2007). A eficiência na transmissão, juntamente com a distribuição mundial dos invertebrados, torna o protozoário com maior ocorrência em animais de vida livre e domésticos (HUNFELD et al., 2008).

Segundo Jalovecka (2019), o ciclo biológico possui três fases sucessivas, que são merogonia, gametogonia e esporogonia. Dentre as fases de esporogonia e merogonia o protozoário presente na glândula salivar do hospedeiro invertebrado na fase de esporozoítos, migra para os eritrócitos durante o repasto sanguíneo e ao adentrar no eritrócito ocorre uma transformação de esporozoítos para trofozoítos, que realizarão reprodução assexuada, por divisão binária, formando merozoítos. Ao ocorrer o rompimento celular, para liberação de merozoítos que podem penetrar novos eritrócitos. Nos hospedeiros vertebrados, podem ocorrer sinais clínicos como febre, anorexia, perda de peso, anemia hemolítica, hemoglobinúria e até o óbito do hospedeiro (TELFORD III et al., 1993; GENCHI, 2007; MONTEIRO, 2018).

Diversas são as espécies de *Babesia* documentadas em mamíferos silvestres, principalmente em carnívoros e ungulados (PENZHORN, 2006). Assim como, um estudo envolvendo baço de mamíferos silvestres que vieram a óbito nas estradas da região Sul do Rio Grande de Sul, *Babesia microti* foi relatada em *Cavia aperea* (Preá) e *Babesia* sp. em *Procyon cancrivorus* (Mão-pelada) (SCHEER et al., 2022).

Os relatos da ocorrência de *Babesia* spp. vêm sendo demonstrado em diversos trabalhos pelo mundo, devido a ocorrência de babesiose humana, que pode variar de infecções assintomáticas ao óbito do paciente (KARSHIMA, 2021).

Carrapatos parasitando aves migratórias no sudeste da Suécia foram utilizados no estudo de Wilhelmsson et al. (2021), sendo possível detectar dentre os 1.102 carrapatos, uma positividade de 2,4% dos carrapatos *Ixodes ricinus* positivos para o gênero *Babesia*. De todas as amostras positivas para *Babesia*, *Babesia venatorum* foi a espécie mais prevalente (58%), seguida por *Babesia microti* (38%) e *Babesia capreoli* (4,0%).

No que tange as aves, Sgarioni e colaboradores (2023), investigaram a ocorrência de *Babesia* spp. em aves marinhas da ordem procellariiformes na costa Sul do Brasil, encontrando positividade em uma ave fêmea adulta da espécie *Thalassarche chlororhynchos* (albatroz-de-nariz-amarelo-atlântico). Diante da positividade, denominaram o protozoário encontrado como *Babesia* sp. cepa Albatroz.

2.3.2 Família Spirochetaceae

Membros dessa família são caracterizados por serem bactérias com formato helicoidal, protoplasma cilíndrico, possuem uma ou mais voltas completas no eixo central, uma membrana externa que contém diversas proteínas de superfície e podem possuir capacidade de se locomoverem. A família possui cinco gêneros, porém os gêneros *Treponema*, *Leptospira* e *Borrelia* possuem grande importância para saúde única (DOBSON; SÁNCHEZ, 2009).

O gênero *Borrelia* difere, morfológicamente, dos demais gêneros desta família por apresentar maior número de flagelos periplasmáticos, por serem maiores e possuem menor número de espiras (BABOUR; HAYES, 1986; QUINN et al., 1994). As espécies desse gênero são classificadas em dois clados evolutivos principais, o clado da borreliose de Lyme e o clado da febre recorrente. Os membros do clado da borreliose de Lyme são transmitidos por hospedeiros invertebrados da família Ixodidae, enquanto os vetores do clado da febre recorrente englobam os membros da família Argasidae (ADEOLU; GUPTA, 2014; BARBOUR et al., 2017; MARGOS et al., 2020).

A borreliose aviária, doença causada por *Borrelia anserina* demonstrou ocorrência no Brasil em 1903, quando Marchoux e Salimbeni estudava a presença da espiroqueta em *Gallus gallus domesticus*, no estado do Rio de Janeiro. Outras aves foram relatadas como hospedeiros naturais, dentre elas estão: *Anser cygnoides* (Ganso-africano), *Meleagris gallopavo* (Peru-selvagem), *Carina moschata* (Pato-do-mato), *Phasianus colchicus* (Faisão-coleira) e *Serinus canarius* (Canário) (MCNEIL et al., 1949). Trabalhos demonstram a infecção experimental de *B. anserina* através de *Argas miniatus* em *Gallus gallus domesticus*, além de ocasionar sinais clínicos como apatia, palidez da crista, diarreia esverdeada, penas eriçadas e hiporexia (LISBÔA, 2006). Gylfe (2000) sugere que aves migratórias podem funcionar como carreadores do agente *Borrelia burgdorferi* por longas distâncias. Um estudo envolvendo aves migratórias e perus selvagens do Tennessee (EUA), diagnosticou a presença de *Borrelia burgdorferi* e *Borrelia lonestari*, comprovando a presença dos agentes em meio silvestre (JORDAN et al., 2009).

2.3.3 Família Anaplasmataceae

A família Anaplasmataceae, inserida na ordem Rickettsiales, é composta por alfa-proteobactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias. Estas bactérias se reproduzem no interior de vacúolos citoplasmáticos de células hospedeiras, tais como células fagocíticas, eritrócitos, células retículo-endoteliais, tecidos reprodutivos de helmintos e artrópodes. Apresentando uma distribuição cosmopolita, essas bactérias têm a capacidade de causar doenças em animais e seres humanos, sendo transmitidas por meio de vetores invertebrados, principalmente carrapatos (WALKER; DUMLER, 1996; DUMLER et al., 2001).

Com o avanço da biologia molecular, Dumler et al. (2001) procederam à reorganização dos membros da ordem Rickettsiales, concentrando-os nas famílias Rickettiaceae e Anaplasmataceae. Na Anaplasmataceae, foram englobadas espécies provenientes dos gêneros *Wolbachia*, *Ehrlichia* e *Neorickettsia*, preservando as espécies dos gêneros *Anaplasma* e *Aegyptianella*.

Na família, os gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* se destacam por possuir uma ampla diversidade de espécies que acometem humanos, animais domésticos e silvestres, incluindo aves e répteis (ALMEIDA, 2011; DOLZ et al., 2013; CALCHI et al., 2020; MAGALHÃES, 2020; BERNARDES, 2022). O gênero *Anaplasma* é responsável por causar a doença infecciosa conhecida como anaplasmosse (DUMLER et al., 2001), cujas espécies descritas são *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma odocoilei* e *Anaplasma capra* (DUMLER et al., 2001; TATE et al., 2013; LI et al., 2015). Já o gênero *Ehrlichia* é composto por diversas espécies, dentre elas *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia ruminantium* e *Ehrlichia minasensis* (AGUIAR et al., 2019; DINIZ; AGUIAR, 2022).

Daniels et al. (2002) identificaram larvas de carrapatos infectadas por *A. phagocytophilum*, indicando a possibilidade de aves atuarem como reservatórios para *Anaplasma*. No entanto, divergências existem, já que outros pesquisadores descrevem o papel das aves apenas como portadoras desse gênero (ALEKSEEV et al., 2001; OGDEN et al., 2008; HILDEBRANDT et al., 2010). DNA de *Anaplasma* spp. foi detectado em amostras sanguíneas de aves silvestres na Grécia (IOANNOU et al., 2009) e no Brasil (MACHADO et al., 2012).

Estudos englobando o papel das aves e dos seus vetores no ciclo biológico de *Ehrlichia* sp. ainda são escassos em comparação aos estudos abordando a ocorrência do agente em mamíferos (DANIELS et al., 2002). Porém, num estudo utilizando sangue de aves silvestres do Brasil, Machado et al. (2012) relataram a ocorrência de *Ehrlichia* sp. em Quiriquiri (*Falco sparverius*) no Estado de São Paulo. Assim como, Muñoz-Leal et al. (2019) detectaram *Ehrlichia* sp. em fragmentos de baço e pulmão de Pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) através de técnicas moleculares.

2.3.4 Família Trypanosomatidae

A família trypanosomatidae, pertencente ao filo Euglenozoa e a ordem Kinetoplastida, detém dois gêneros de suma importância para saúde pública, no qual engloba o gênero *Trypanosoma* e o gênero *Leishmania*, possuindo o flagelo como forma morfológica semelhante entre os gêneros (MONTEIRO, 2018; HAAG, 1998; HOARE, 1972). Dentro da família, existem diversas espécies que são capazes de infectar vertebrados e invertebrados, que participarão do ciclo biológico de cada agente (PODLIPAIEV, 1990; SANTOS et al., 2021). Os representantes da família Trypanosomatidae apresentam diferentes morfologias durante o ciclo de vida, tanto na natureza como em cultivo no laboratório. Por definição, apresentam sete morfotipos principais. Entre os morfotipos esféricos e arredondados, destacam-se os amastigotas, esferomastigotas e coanomastigotas. Já os morfotipos mais alongados e

fusiformes incluem os promastigotas, epimastigotas, tripomastigotas e opistomastigotas (Figura 2) (D'AVILA-LEVY et al., 2015).

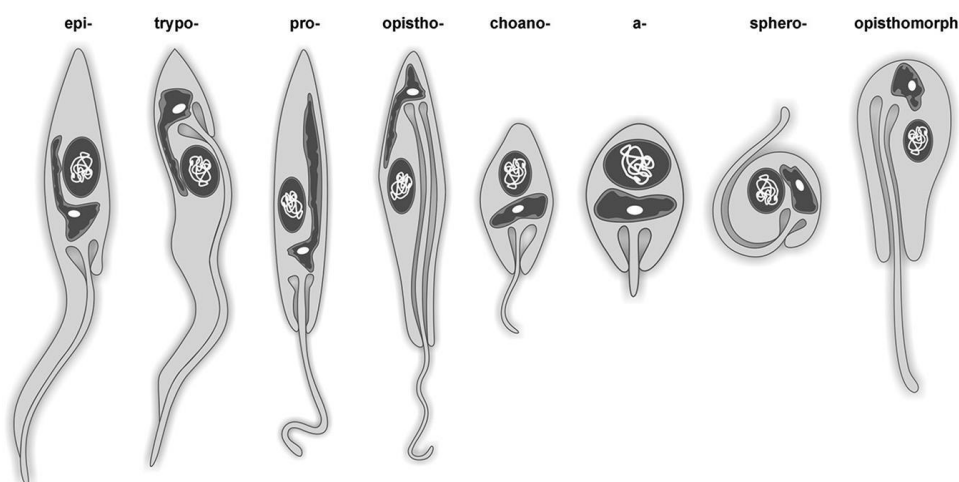


Figura 2. Representação esquemática dos diferentes morfotipos presentes nos tripanossomatídeos. Fonte: D'Avila-Levy et al., 2015. o travessão deve ser substituído pela palavra “mastigota”.

O gênero *Trypanosoma* pode ser classificado em secção Stercoraria, na qual ocorre a transmissão via fezes dos hospedeiros invertebrados, de forma contaminativa, possuindo um grau de patogenicidade baixo, com exceção da espécie *Trypanosoma cruzi*. Esta secção abrange os seguintes subgêneros: *Megatrypanum* (apresentam um grande porte, cinetoplasto aproximadamente na metade da distância entre o núcleo e a extremidade posterior), *Herpetosoma* (apresentam médio porte e cinetoplasto subterminal) e *Schizotrypanum* (apresentam um pequeno porte, com morfologia em formato de C e o cinetoplasto volumoso e próximo à extremidade). A secção Salivaria ocorre de forma inoculativa ou mecânica, possuindo os subgêneros *Duttonella*, que apresenta flagelo livre, monomórfico, extremidades arredondadas, cinetoplasto grande e geralmente terminal, e o subgênero *Trypanozoon*, que apresenta cinetoplasto pequeno, membrana ondulante bem visível e grânulos no citoplasma (MONTEIRO, 2018).

O gênero *Leishmania* pode ser classificado em dois subgêneros, o subgênero *Viannia* e o subgênero *Leishmania*, apresentando formas clínicas descritas como leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral ou calazar (SOUZA et al., 2022). Dentre suas características morfológicas podemos observar a forma amastigota infectando hospedeiros vertebrados e as formas promastigotas presentes em hospedeiros invertebrados (BRASIL, 2006).

Os tripanossomatídeos utilizam uma variedade de vetores invertebrados sugadores de sangue, como sanguessugas, carrapatos e insetos (THEKISOE et al., 2007; ZINGALES et al., 2012; FERMINO et al., 2015; MAROTTA et al., 2018; CECÍLIO et al., 2022). Esses parasitas estão altamente adaptados a uma ampla gama de espécies de vertebrados como hospedeiros, incluindo algumas espécies aquáticas (VIRGILIO et al., 2021). Destacam-se na literatura os vetores de maior importância, que são os flebotomíneos e os triatomíneos. Esses insetos são responsáveis pela transmissão de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, sendo estes agentes zoonóticos. Em muitas regiões do Brasil, esses vetores são endêmicos, representando significativos desafios para a saúde pública (RIBEIRO et al., 2019; COSTA et al., 2021; PINTO et al., 2022).

Os parasitos pertencentes ao gênero *Trypanosoma*, encontrados em aves, apresentam uma ampla variedade de possíveis hospedeiros invertebrados, incluindo mosquitos das famílias Culicidae, Simuliidae, Ceratopogonidae e Hippobocidae, além de ácaros da família Dermanyssidae (BENNETT, 1961). A primeira observação de *Trypanosoma* em aves foi realizada em corujas europeias por Basil Danilewsky em 1885. Desde então, tripanossomatídeos aviários foram identificados em diversas espécies de aves (BENNETT, 1961).

Trypanosoma spp. parasita frequentemente diversas espécies de aves, sendo aves canoras e raptos as mais afetadas (APANJUS, 1991). No entanto, Kucera (1983) sugere que patos, gansos e pardais raramente apresentam infecções.

Na África, pesquisas revelaram a presença da forma tripomastigota de *Trypanosoma naviformis* em passarinhos e beija-flores, além de relatos de numerosas aves positivas para *Trypanosoma* spp. neste continente (SEHGAL et al., 2011). No Brasil, a presença de *Trypanosoma* sp. foi avaliada em 925 aves através de esfregaços sanguíneos de aves da região de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais, obtendo uma prevalência de 3,8% de aves positivas (SEBAIO et al., 2012). Em outro estudo realizado por Gredilha (2020) em aves do Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG) e da Zona da Mata Mineira (MG), foi possível observar a presença de *Trypanosoma* sp. através de biologia molecular em *Turdus flavipes* (Sabiá-uma), *Turdus albicollis* (Sabiá-coleira), *Tachyphonus coronatus* (Tiê-preto), *Thamnophilus caerulescens* (Choca-da-mata) e *Synallaxis spixi* (João-teneném).

2.3.5 Ordem Haemosporida

Pertencente ao filo Apicomplexa, classe Haemosporidea e ordem Haemosporida, a família Plasmodiidae engloba o gênero *Plasmodium* spp. (COX, 1994; VALKIUNAS, 2005), o qual possui cerca de 450 espécies descritas, sendo 75 de ocorrência em aves. Possui divisão de subgêneros como: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Huffia* e *Bennetinia*. Os quais apresentam caracterização morfológica da seguinte maneira: *Haemamoeba*, possuindo grandes esquizontes eritrocitários e gametócitos arredondados; *Giovannolaia*, com a presença de grandes esquizontes eritrocitários e gametócitos alongados; *Novyella*, com pequenos esquizontes eritrocitários e gametócitos ovais ou alongados; *Huffia*, com grandes esquizontes eritrocitários, gametócitos alongados e grande presença de estágios imaturos; e *Bennetinia*, com esquizontes de citoplasma escasso e gametócitos ovais ou arredondados (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005).

Dentro da família, existem algumas espécies capazes de infectar diferentes ordens de aves, como, por exemplo, os galiformes, sphenisciformes e diversas outras ordens (SERRA FREIRE, 1979; BUENO et al., 2010). Sua transmissão possui grande impacto na avicultura, devido aos quadros de infecção graves que podem levar à morte, baixa de produção, prostração, febre e megália de órgãos. Porém, pode apresentar quadros assintomáticos e raramente fatais (MASSARD; MASSARD, 1981; GARNHAM, 1966). Seus vetores incluem dípteros da família Culicidae, tribos Culicini e Anophelini (URQUHART, 1998; GARNHAM, 1966).

O ciclo biológico é heteróximo, composto por um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado, constituído pelas fases exoeritrocítica, eritrocítica e esporogônica. O hospedeiro invertebrado possui os esporozoítos presentes na glândula salivar e, ao realizar o repasto sanguíneo, inoculam a forma infectante no hospedeiro vertebrado. Os esporozoítos adentram aos fibroblastos da pele e células do sistema fagocítico mononuclear, onde realizam a mudança para trofozoítos. Através da esquizogonia, dão origem aos esquizontes que realizarão reprodução de forma assexuada para dar origem aos merozoítos. Após algumas reproduções, os merozoítos migram para os eritrócitos, tornando-se trofozoítos, e através de uma nova esquizogonia, dão origem aos merozoítos sanguíneos. Depois de algumas gerações,

alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos (macrogametócitos e microgametócitos). Durante o repasto sanguíneo, o vetor pode ingerir os gametócitos que, ao chegarem no trato digestivo dos vetores, sofrem o processo de exflagelação, dando origem ao microgameta, que se funde com macrogametócitos e gera a formação de um zigoto. Este dará origem à forma de oocineto, que penetrará a parede do intestino e se fixará na sub-serosa até ocorrer a maturação e transformação em oocisto através da esporogonia. No interior do oocisto, ocorre a formação de novas formas de esporocistos, que contêm diversos esporozoítos. O rompimento do esporocisto possibilita a liberação dos esporozoítos que migrarão para a glândula salivar, completando a maturação e fechando o ciclo biológico (GARNHAM, 1966; MC GHEE et al., 1988) (Figura 3).

Estudos sobre a prevalência de *Plasmodium* vêm se demonstrando presentes em diversas pesquisas, visto a variação das prevalências de 83,19% (TOSTE et al., 2015) e 6,9% (FECCHIO et al., 2007). Tanto aves de vida livre quanto aves cativas apresentam a presença do parasito através dos métodos de diagnóstico como microscopia direta e Reação em Cadeia de Polimerase, abrindo alertas para risco com espécies endêmicas ou com risco de extinção (RIBEIRO et al., 2005; ATKINSON et al., 2000; BENSCH et al., 2000).

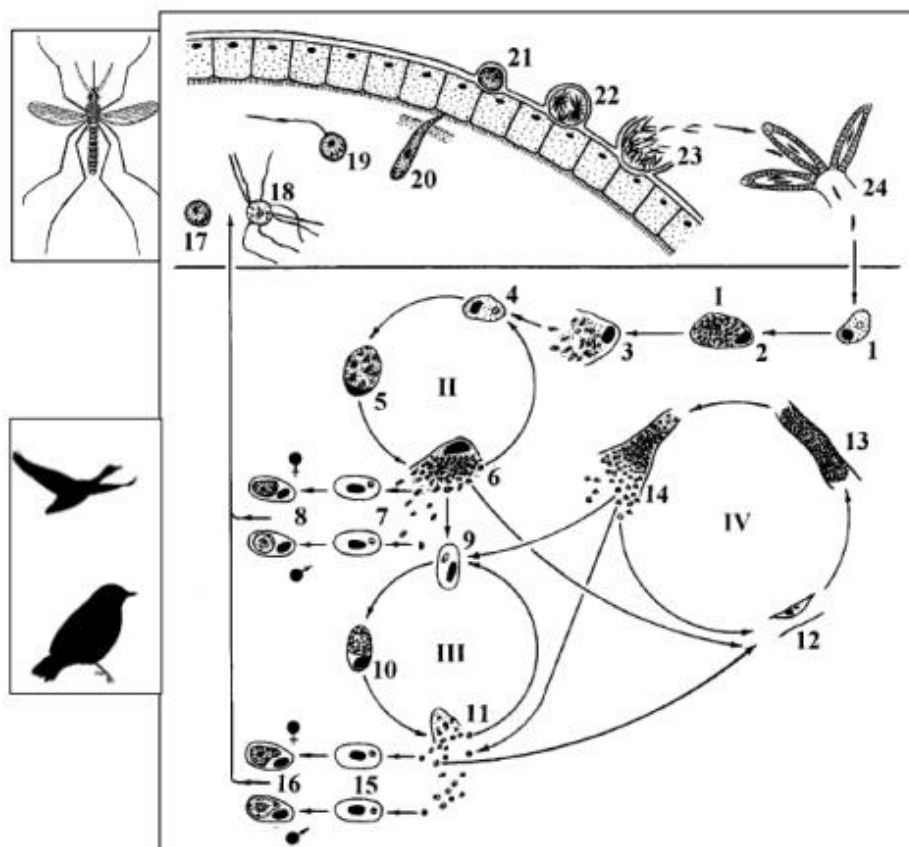


Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Ave: 1 – 16. Vetor: 17-24. , I, II – merogonia exoeritrocítica primária; III – merogonia eritrocítica; IV – merogonia exoeritrocítica secundária; 1- esprozoítos em células reticuloendoteliais; 2,3- criptozoítos; 4- merozoítos em macrófagos; 5,6 -metacriptozoítos; 7- merozoítos nos eritrócitos; 8 – gametócitos; 9- merozoítos nas células endoteliais dos capilares; 13, 14- fanerozoítos; 15-merozoítos nos eritrócitos; 16 -gametócitos; 17- macrogametócitos; 18- exflagelação dos microgametas; 19- fertilização dos macrogametas; 20- oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21- oocistos jovens; 22, 23 – esporogonia; 24- esporozoítos na glândula salivar do vetor. (CHAGAS, 2016).

2.4 Métodos de diagnóstico

2.4.1 Caracterização Morfológica

Almosny e Monteiro (2007) destacam que a realização do método de esfregaço sanguíneo é de grande valor para a realização de hemograma, onde irá ocorrer a contagem e diferenciação dos leucócitos, observação morfológica das células e a pesquisa dos hemoparasitos que podem estar presente na amostra coletada. A presença do hemoparasito pode se encontrar em células do tecido hematopoiético, junto com a inclusões de corpúsculos, mórulas e dentre outras formas que o parasito pode se apresentar (ALMOSNY; MASSARD, 2002; FERREIRA, 2012).

Existe uma variação entre a parasitemia que ocorre nos exames parasitológicos, não existindo correlação direta com a sintomatologia do espécime (PALTRINIERI et al., 2010). As fases da doença também é um fator a ser levado em consideração, pois fases iniciais da doença, podem gerar resultados falso-negativos (FAYET, 1999) e fases crônicas ou latentes dificultam a detecção direta do parasito, reduzindo a perspectiva de visualização em esfregaço sanguíneo (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991).

Como exemplo, Tostes et al. (2015) citaram que em estudo realizado para determinar a prevalência da infecção por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em aves silvestres mantidas em cativeiros na Mata Atlântica, utilizando microscopia óptica e PCR, a prevalência da infecção por estes hemoparasitos demonstrada pelas duas técnicas foram semelhantes (83,19% e 81,3%, respectivamente). Portanto, pesquisas utilizando ambos os métodos vêm sendo realizadas (RIBEIRO et al., 2005; RICHARD et al., 2002) e demonstrando que a técnica de PCR pode fornecer diagnósticos rápidos e confiáveis mesmo que a amostra apresente um baixo nível de parasitemia ou infectada por várias espécies de parasitos (RICHARD et al., 2002).

2.4.2 Diagnóstico Molecular

Na medicina veterinária, as técnicas moleculares são amplamente utilizadas, principalmente na área de parasitologia animal, onde permite a elaboração de novas formas de diagnóstico, desenvolvimento de técnicas, descoberta de novas espécies, entre outros. Dentre as técnicas, a técnica de PCR possui vantagens como: detecção rápida de microrganismos de crescimento lento, ou daqueles não cultiváveis, no monitoramento de doenças através da quantificação da infecção e em estudos epidemiológicos. No diagnóstico molecular de parasitos, uma variedade de materiais pode ser empregada, incluindo sangue, tecidos, fezes, urina e até mesmo partes ou corpos inteiros de ectoparasitos (HODGKINSON, 2006; TORINA et al., 2013; MELO et al., 2016).

Com isso, as técnicas de biologia molecular estão cada vez mais sendo aplicadas na detecção de hemoparasitos em aves (IOANNOU et al., 2009; JORDAN et al., 2009; MACHADO et al., 2012; TOSTES et al., 2015; DUARTE, 2020; SGARIONI et al., 2023), principalmente em situações em que apenas pequenos volumes de sangue estão disponíveis e que poucos hemoparasitos estão presentes (VIANA, 2010).

2.4.3 Métodos indiretos

A sorologia pode ser empregada como método de diagnóstico para detectar hemoprotozoários, mas a interpretação dos resultados é desafiadora devido à detecção de anticorpos contra os parasitos. É difícil diferenciar entre infecções ativas e infecções

previamente eliminadas pela ave, pois os anticorpos permanecem na circulação em ambas as situações (SHAW et al., 2001; FALLON et al., 2003; SACCHI, 2015).

Num estudo realizado por Sacchi (2015) utilizando a técnica de RIFI, detectou 5,68% (4/88) e 3,41% (3/88) das aves com anticorpos anti-*A. phagocytophilum* e anti-*Ehrlichia chaffeensis*, respectivamente e que existe a possibilidade de que as aves não mantenham título de anticorpos após a exposição por agentes Anaplasmataceae devido a fatores diversos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos e Legais da pesquisa científica

A realização deste estudo foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estácio de Sá (Protocolo nº 022/2019) (Anexo 1) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio) sob o protocolo de nº 69103-2 (Anexo 2).

3.2 Locais de Processamento de Amostras

As etapas desse estudo foram desenvolvidas no Laboratório de Estudo da Interação Parasito-Hospedeiro (LEIPH), localizado no Bloco A do Anexo I; Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE), localizado na sala 29, e Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV), localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, sediados no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

3.3 Origem das Amostras

Foram utilizadas amostras de sangue total de aves silvestres recebidos pela Clínica de Reabilitação de Animais Selvagens da Universidade Estácio de Sá (CRAS-UNESA), Campus Vargem Pequena, do Parque de Educação Ambiental Arca do Noah, localizado no Bairro de Guaratiba e de uma Criação de Psitacídeos, também localizado no Bairro de Guaratiba, todos pertencentes a zona oeste do município do Rio de Janeiro.

Todas as aves que adentraram ao CRAS-UNESA foram identificadas de acordo com os livros de identificação (ERIZE et al., 2006) dos espécimes presentes na instituição. Os animais presentes no criatório e parque de educação ambiental eram oriundos dos Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), outros criatórios, apreensões policiais e outros zoológicos. Posto isso, no período de 2022 a 2023, foram coletadas 55 amostras provenientes do CRAS-UNESA e 49 amostras de aves mantidas sob cuidados humanos.

3.4 Coleta de material biológico

A coleta do material biológico foi realizada respeitando o bem-estar para cada espécime, onde animais que se encontravam debilitados ou em estado crítico, recebiam terapia e estabilização, e após melhora clínica eram liberados para coleta de material biológico. O volume de sangue coletado foi de acordo com Campbell (2014), que sugere a coleta de 1% do peso vivo do animal, desde que o espécime esteja hígido. Os animais eram contidos de forma física com o auxílio de equipamentos de segurança como luvas de raspas de couro. A região aptérica da lateral direita do pescoço era umedecida com álcool 70%, facilitando a visualização da veia jugular e realizado venopunção (Figura 4) (SANTOS; CUBAS, 2007).

Foram colhidos cerca de 0,5ml de sangue, utilizando seringas de 1ml e agulhas hipodérmicas descartáveis estéreis. Após, o sangue foi acondicionado em tubos de 0,5ml contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), mantidos sob refrigeração inicial em caixas isotérmicas, e após foram conservados em freezer a -80°C até o momento das análises moleculares.



Figura 4. Colheita de sangue da veia jugular direita de *Ara ararauna*. Fonte: arquivo pessoal.

3.5 Técnica de esfregaço sanguíneo

Para identificação de hemoparasitos por microscopia, foram realizados esfregaços sanguíneos de cada indivíduo no momento da coleta sanguínea. Esses esfregaços foram fixados em metanol por 3 minutos e encaminhados ao LEIPH para serem corados com Giemsa a 10%, deixando-os imersos por 20 minutos (SHUTE; LEWIS, 1966), rinsado sequencialmente em água e secas ao ar. Posteriormente, os esfregaços foram observados sob microscopia óptica, na objetiva de 100x com óleo de imersão.

As estruturas encontradas sugestivas de parasitos foram fotografadas com auxílio do microscópio óptico, no Laboratório Multiusuário de Bioimagem do Departamento de Parasitologia Animal – LAMBIO (DPA/IV/UFRRJ), para fins de registro e identificação morfológica.

3.6 Diagnóstico Molecular

3.6.1 Extração de DNA

A extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) foi utilizando kit comercial (PureLink® Genomic DNA Mini Kit) com algumas modificações. Utilizou-se 5 µL de sangue total, que foi acrescido de 20µL de PROTEINASE K (PKa do próprio Kit) e 20 µL de RNase A, sendo homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 2 minutos. Após homogeneização eram adicionados 200µL de Genomic lysis/Binding Buffer, que eram vortexados até a formação de uma substância homogênea. Logo em seguida, eram incubados a 56°C por 1 hora e 30 minutos, onde ao final era adicionado 200 µL de etanol 100% gelado e misturado por vortex até homogeneização.

Após se iniciava a etapa de *Binding* DNA, onde toda substância lisada em etapa anterior era em coluna com sílica e centrifugada a 12.000 rpm por 1 min em temperatura ambiente. Era realizado o descarte do tubo coletor e adicionado uma nova coluna.

Em sequência era iniciado a fase de lavagem de DNA, onde eram adicionados 500µL de Wash Buffer 1 a coluna, centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente. Após era descartado o tubo coletor e encaixado uma nova coluna, na qual era inserido 500µL

de Wash Buffer 2 e centrifugado a 12.000 rpm por 3 min em temperatura ambiente. Em seguida era descartado o tubo coletor.

Para a fase de eluição do DNA, era transferido o tubo de sílica para um tubo de 1,5ml, adicionado 25 µL de tampão de eluição e incubados por 2 minutos em temperatura ambiente. Após, eram centrifugados em velocidade de 12.000 rpm por 3 minutos, e acondicionados em eppendorfs para a realização das análises moleculares para os respectivos genes alvos (Quadro 1).

3.6.2 Análise molecular para ordem Piroplasmida

Para detecção dos agentes da ordem Piroplasmida foi realizado nested-PCR para amplificação do gene 18S, como demonstrado por Jefferies et al. (2007). Para a primeira reação da nested-PCR foi adicionado em microtubo de 200µL um produto com volume final de 25µL contendo 3µL do DNA extraído acrescido de 22 µL do Master Mix [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (BTF1 e BTR1) (tabela 1), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão (5X Colorless GoTaq®, Promega®) e 9,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. No termociclador a primeira reação ocorreu seguindo o protocolo de 95 °C por 2 minutos e 30 segundos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 20 segundos, 72 °C por 30 segundos e, por fim, extensão final de 72 °C por 5 minutos. Já para a segunda reação da nested-PCR foi adicionado a um tubo de 200 µL: 2 µL do “amplicon” resultado da primeira reação acrescidos de 23 µL do Master Mix [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (BTF2 e BTR2) (tabela 1), 2µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão (5X Colorless GoTaq®, Promega®) e 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. Para o termociclador, na segunda reação, utilizou-se o protocolo de 95 °C por 2 minutos e 30 segundos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 62 °C por 20 segundos, 72 °C por 30 segundos e, por fim, extensão final de 72° por 5 minutos.

Como controle positivo foi utilizado amostra previamente analisada e sequenciada, positiva para *Babesia vogeli*. Para o controle negativo foi utilizado água ultrapura livre de DNases aplicadas dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *Master Mix*.

3.6.3 Análise molecular para *Borrelia* spp.

Uma nested-PCR foi utilizada para a detecção dos agentes do gênero *Borrelia* através da amplificação do gene flaB (flagelina), como demonstrado por Stromdahl et al. (2003). A primeira reação da nested-PCR utilizou-se um volume final de 25 µL contendo 3 µL do DNA extraído acrescido de 22 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2µL de cada iniciador a 10 µM (FLARL e FLALL) (tabela 1), 2 µL de dNTP a 2,5mM, 1,5µL de MgCl₂ a 25mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão (5X Colorless GoTaq®, Promega®) e 9,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. No termociclador a primeira reação ocorreu seguindo o protocolo de 95 °C por 2 minutos e 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 35 segundos, com extensão final de 72 °C por 5 minutos. Na segunda reação foi adicionado 2µL do amplicon gerado na primeira reação acrescido de 23 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (FLARS e FLALS) (tabela 1), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão (5X Colorless GoTaq®, Promega®) e 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. As condições de termociclagem na segunda reação foram: 95°C por

2 minutos e 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55° por 30 segundos e 72° por 30 segundos e, por fim, uma extensão final de 72° por 5 minutos.

Como controles positivos foram utilizadas amostras previamente analisadas e sequenciadas, positivas para *Borrelia anserina* e como controle negativo água ultrapura livre de DNases aplicadas dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *Master Mix*.

3.6.4 Análise molecular para *Ehrlichia* spp.

Para a detecção do gênero *Ehrlichia*, foi utilizada uma nested-PCR baseada no gene *dsb*. O volume final da reação foi 25 µL, sendo: 3µL do DNA extraído acrescidos de 22 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 1µL de cada iniciador a 10 µM (DSB330F e DSB720R) (tabela 1), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão (5X Colorless GoTaq®, Promega®) e 9,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. O protocolo de termociclagem foi 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C por 30 segundos, 72° por 30 segundos, com uma extensão final de 72° por 5 minutos. Já a segunda reação foi realizada com 2µL do produto da primeira reação, complementado com 23µL de *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 1µL de cada iniciador a 10 µM (DSB380F e DSB720R) (Tabela 1), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão (5X Colorless GoTaq®, Promega®) e 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. As condições no termociclador foram: 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos, 72° por 30 segundos, com uma extensão final de 72° por 5 minutos.

O controle positivo foi obtido através de uma amostra previamente analisada e sequenciada, demonstrando positividade para *Ehrlichia canis*, e como controle negativo foi utilizado água ultrapura livre de DNases aplicadas dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *Master Mix*.

3.6.5 Análise molecular para família Trypanosomatidae

Para a detecção dos agentes da família Trypanosomatidae foi realizada uma PCR convencional para amplificação do gene 24Sα-*rDNA*. Para a reação de PCR convencional, 3µL do DNA extraído. Foram acrescidos de 22 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 1 µL de cada iniciador a 10µM (D75 e D76) (tabela 1), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5µL de tampão (5X Colorless GoTaq®, Promega®) e 11,8µL de água ultrapura livre de DNases]. O protocolo de termociclagem utilizado foi de 95 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e, por fim, uma extensão final de 72° por 5 minutos.

O controle positivo utilizado foi amostra previamente analisada e sequenciada, positiva para *Trypanosoma cruzi*, e como controle negativo foi utilizado água ultrapura livre de DNases aplicadas dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *Master Mix*.

3.6.6 Análise molecular para a ordem Haemosporida

Para a detecção de agentes da ordem Haemosporida, foi utilizada nested-PCR para amplificação do gene *CytB*. Na primeira reação foi utilizado os iniciadores HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') para amplificar DNA de parasitos dos gêneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* e *Leucocytozoon*. A reação de PCR foi composta por 2µL do DNA

extraído acrescido de 23µL do *Master Mix* [0,5 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2,5 µL dos iniciadores a 10 µM (HaemNFI e HaemNR3) (tabela 1), 2µL de dNTP a 2,5mM, 3µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 2,5µL de tampão (5X Colorless GoTaq®, Promega®) e 12,5 µL de água ultrapura livre de DNases]. Já na segunda reação, os iniciadores HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') foram usados para detecção de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., sendo utilizado 2 µL de produto da primeira reação, acrescido de 23 µL do *Master Mix* [0,5µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 1,5µL dos iniciadores a 10µM (HaemF e HaemR2) (tabela 1), 2µL de dNTP a 2,5mM, 3µL de MgCl₂ a 25mM (Promega® MgCl₂ Solution), 2,5µL de tampão (5X Colorless GoTaq®, Promega®) e 13,5µL de água ultrapura livre de DNases].

O protocolo de termociclagem para ambas as reações foram: 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 54° por 30 segundos, 72° por 45 segundos e, por fim, extensão final de 72 °C por 10 minutos.

O controle positivo utilizado foi de uma amostra previamente analisada e sequenciada, sendo positiva para *Plasmodium gallinaceum*, e como controle negativo água ultrapura livre de DNases aplicadas dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *Master Mix*.

Quadro 1. Oligonucleotídeos e suas características utilizados para detecção de hemoparasitos em aves silvestres sob cuidados humanos e vida livre.

Gene	Sequência dos Oligonucleotídeos (‘5-3’)	Especificidade	Fragmento	Referências
18S <i>rDNA</i>	BTF1 GGCTCATTACAACAGTTATAG	Piroplasmida	930pb	(JEFFERIES et al., 2007)
	BTR1 CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC			
	BTF2 CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC		800pb	
	BTR2 GGACTACGACGGTATCTGATCG			
<i>FlaB</i>	FlaLL ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT	<i>Borrelia</i> spp.	665pb	(STROMDAHL et al., 2003)
	FlaRL GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT			
	FlaLS AACAGCTGAAGAGCTTGGAAT		354pb	
	FlaRS CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC			
<i>Dsb</i>	DSB-330 GATGATGTTTGAAGATATSAAACAAAT	<i>Ehrlichia</i> spp.	401pb	(DOYLE et al., 2005)
	DSB-720 CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC		349pb	(ALMEIDA, 2011)
	DSB-380 ATTTTLAGRGATTTTCCAATACTTGG			
	DSB-720 CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC			
24Sa- <i>rDNA</i>	D75 GCAGATCTTGGTTGGCGTAG	Trypanosomatidae	270pb	(SOUTO et al., 1999)
	D76 CGTTCTCTGTTGCCCTTTT			
<i>CytB</i>	HaemFNI CATATATTAAGAGAAITATGGAG	<i>Haemoproteus</i> spp.	~ 479pb	(BENSCH et al., 2000)
	HaemNR3 ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC			(HELLGREN et al., 2004)
	Haem F ATGGTGCTTTCGATATATGCATG	<i>Plasmodium</i> spp.		
	Haem R2 GCATTATCTGGATGTGATAATGGT			

3.7 Eletroforese e análise dos resultados

Um volume de 10 µL dos produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corado em brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Loccus). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (100bp Ladder Plus, Ready To Use - Sinapse Inc - M1071).

3.8 Sequenciamento e análise filogenética

O material para sequenciamento foi purificado a partir de 5µL do produto de PCR das amostras positivas, sendo tratados com Exo-Sap-IT (GE Healthcare®), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções em um analisador genético automatizado (ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) alocado no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular PPGCV/ UFRRJ. As sequências obtidas foram alinhadas através do programa DNA Baser®.

A ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) foi usada para avaliar a similaridade dos genes analisados nesse estudo com sequências de nucleotídeos disponíveis no GenBank. As sequências obtidas neste estudo foram alinhadas com as sequências do GenBank para os genes 24Sα-*rDNA* e *cytB* usando o software “Clustal W”. As sequências foram ajustadas manualmente, e os nucleotídeos dos genes alvos foram analisadas no conjunto de dados final. *Leucocytozoon quynzae* (KF309188.1) foi usada como outgroups para o gene *cytB*. *Trypanosoma cruzi* (GQ303145.1) e *Trypanosoma rangeli* (JN016745.1) foram usadas como outgroups na análise do gene 24Sα-*rDNA*. A reconstrução filogenética de Trypanosomatidae isolado de ave foi inferida usando o método Maximum Likelihood. O modelo Tamura-Nei foi usado para calcular a distância evolucionária. Para análise das sequências obtidas com alvo no gene *cytB* de *Plasmodium* sp., o método Neighbor-Joining foi adotado, considerando o modelo Kimura 2-parameter para calcular distância evolucionária. Para análise das sequências obtidas com alvo no gene *cytB* de haemosporídeos do gênero *Haemoproteus*, o método Maximum Likelihood foi adotado, considerando o modelo Tamura-Nei para calcular distância evolucionária. A combinação de clusters filogenéticos foi avaliada usando um teste de bootstrap com 1000 réplicas para testar diferentes reconstruções filogenéticas. Análise evolucionária foi conduzida usando o programa MEGA-X (KUMAR et al., 2018).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização e localização das amostras coletadas

Do total de aves providas do ambiente de vida livre, foram encontradas 18 espécies representantes das famílias Caprimulgidae, Cracidae, Sulidae, Psittacidae, Strigidae, Falconidae, Columbidae, Cathartidae, Ramphastidae e Accipitridae, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de Famílias, espécies, nomes populares e quantidade de aves silvestres de vida livre coletadas no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres – UNESA/RJ.

Famílias	Espécies	Nomes populares	N*
Accipitridae	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Gavião asa-de-telha	4
	<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	12
Caprimulgidae	<i>Hydropsalis longirostris</i>	Bacurau-da-telha	1
Cathartidae	<i>Coragyps atratus</i>	Urubu-de-cabeça-preta	3
Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	2
Cracidae	<i>Penelope superciliaris</i>	Jacupemba	1
Falconidae	<i>Caracara plancus</i>	Carará	1
	<i>Falco femoralis</i>	Falcão-de-coleira	1
	<i>Falco sparverius</i>	Quiriquiri	1
	<i>Mivalgo chimachima</i>	Gavião-carrapateiro	1
Psittacidae	<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã-nobre	2
	<i>Psittacara leucophthalmus</i>	Maracanã-pequena	13
Ramphastidae	<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	1
	<i>Ramphastos vitellinus</i>	Tucano-de-bico-preto	2
Strigidae	<i>Asio clamator</i>	Coruja-mocho-orelhuda	4
	<i>Glaucidium brasilianum</i>	Caburé	3
	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-do-mato	2
Sulidae	<i>Sula leucogaster</i>	Atobá-pardo	1
Total			55

* Número de amostras coletadas no presente estudo.

Das aves mantidas sob cuidados humanos, teve representação de 12 espécies distribuídas nas famílias Psittacidae, Phasianidae, Ramphastidae, Anatidae e Gruidae, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Relação de Famílias, espécies, nomes populares e quantidade de aves silvestres coletadas em Criação Comercial e Jardim zoológico.

Famílias	Espécies	Nomes populares	N*	Localidade
Anatidae	<i>Cygnus atratus</i>	Cisne-negro	4	Jardim Zoológico
Gruidae	<i>Balearica regulorum</i>	Grou-coroado	2	Jardim Zoológico
Phasianidae	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Galinha-doméstica	12	Jardim Zoológico
Psittacidae	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	17	Criação Comercial
	<i>Amazona amazónica</i>	Papagaio-do-mangue	2	
	<i>Amazona farinosa</i>	Papagaio-moleiro	2	
	<i>Amazona festiva</i>	Papagaio-de-várzea	3	
	<i>Amazona ochrocephala</i>	Papagaio-campeiro	1	
	<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	3	
Ramphastidae	<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	1	Jardim Zoológico
	<i>Ramphastos tucanus</i>	Tucano-de-papo-branco	1	
	<i>Ramphastos vitellinus</i>	Tucano-de-bico-preto	1	
Total			49	

* Número de amostras coletadas no presente estudo.

4.2 Diagnóstico de Parasitos

Do total de 104 aves inspecionadas, nenhum ectoparasito foi encontrado. De todas as aves, distribuídas em vida-livre (n=55) e oriundas de ambientes cativos (n=49), foram obtidas amostras sanguíneas às quais foram submetidas a exames diretos de detecção de hemoparasitos.

4.2.1 Diagnóstico direto de hemoparasitos por esfregaços sanguíneos

Durante a amostragem, não foi possível realizar a confecção do esfregaço sanguíneo de seis aves, em virtude do momento de manejo e contenção, para minimizar estresse e priorizar o bem-estar animal.

Na amostra de número de identificação 51, correspondente a material proveniente de *S. leucogaster* foi observada a presença de estruturas semelhantes a merozoitos intraeritrocitários (Figura 5), sugestivo de agente da ordem Piroplasmida.

Outro achado interessante foi de inclusão intraeritrocitária encontrada em *C. talpacoti* (amostra de identificação 53) (Figura 6), sugestivo de gametócito observado na ordem Haemosporida, característico de *Haemoproteus* sp.

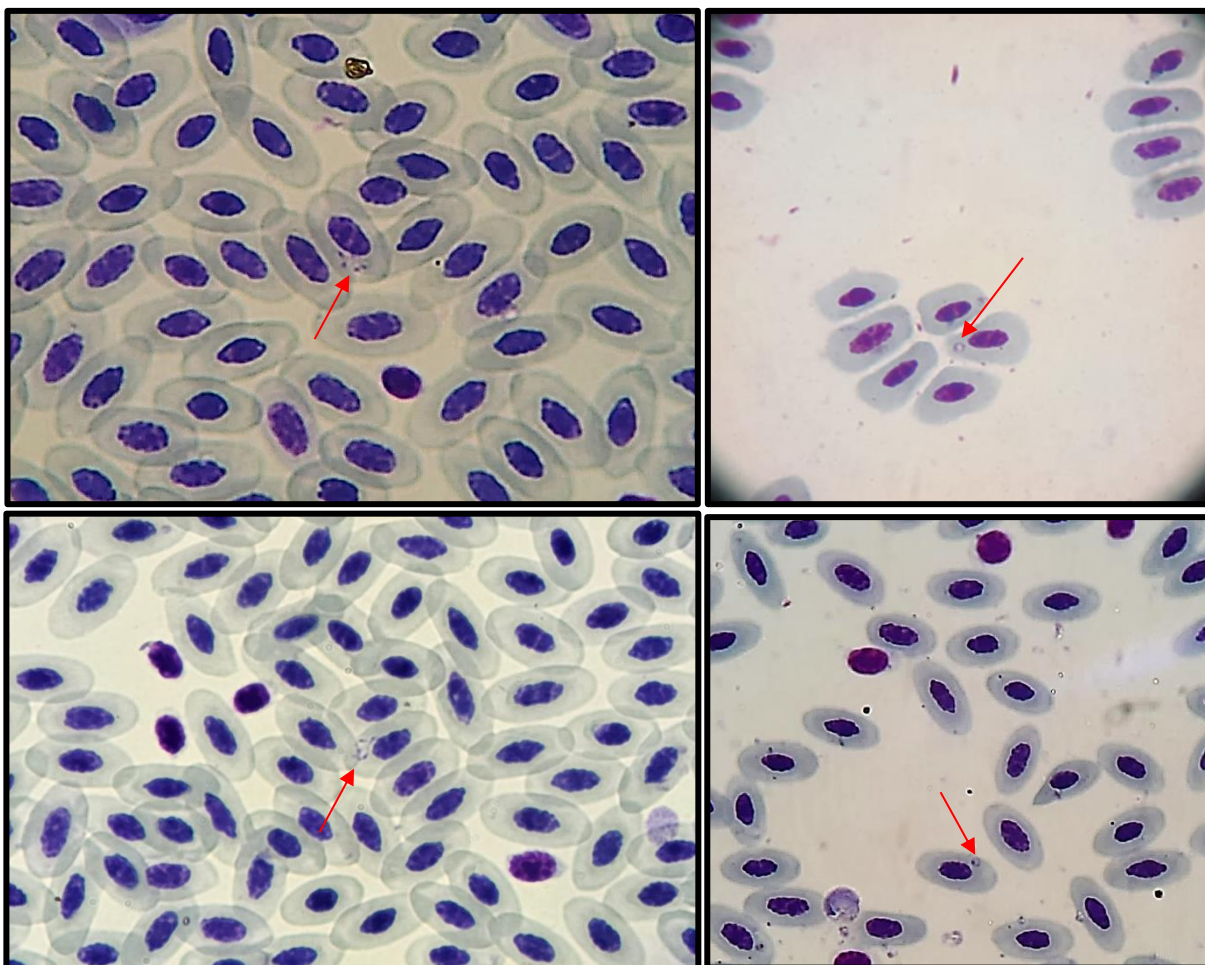


Figura 5. Presença de merozoítos (setas vermelhas) intracelulares em eritrócitos de *Sula leucogaster* de vida livre, observado sob microscopia óptica em aumento de 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.

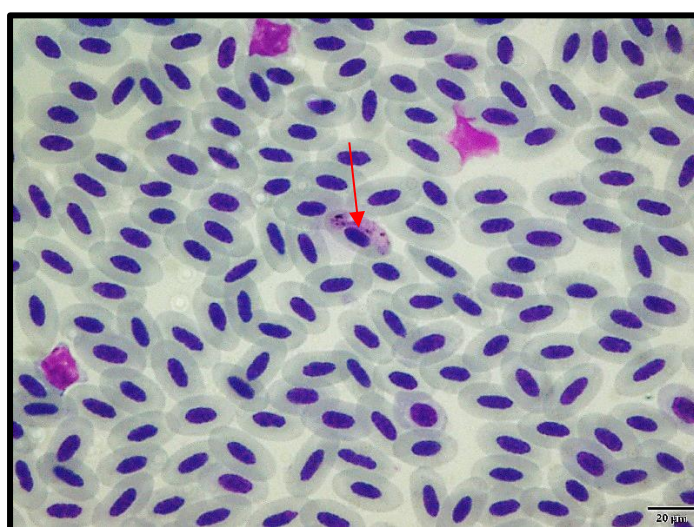


Figura 6. Presença de gametócito (seta vermelha) de Haemosporida em eritrócito de *Columbina talpacoti* de vida livre, observado sob microscopia óptica em aumento de 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.

Durante a leitura das lâminas, estruturas suspeitas de formas tripomastigotas de tripanosomatídeos foram visualizadas (Figura 7), como observado na amostra 66 correspondente a *A. clamator*, conhecida popularmente como Coruja-mocho-orelhuda. Além disso, na amostra de identificação 78, proveniente de *R. magnirostris* observaram-se formas intraeritrocitárias sugestivas de haemosporídeos (Figura 8).

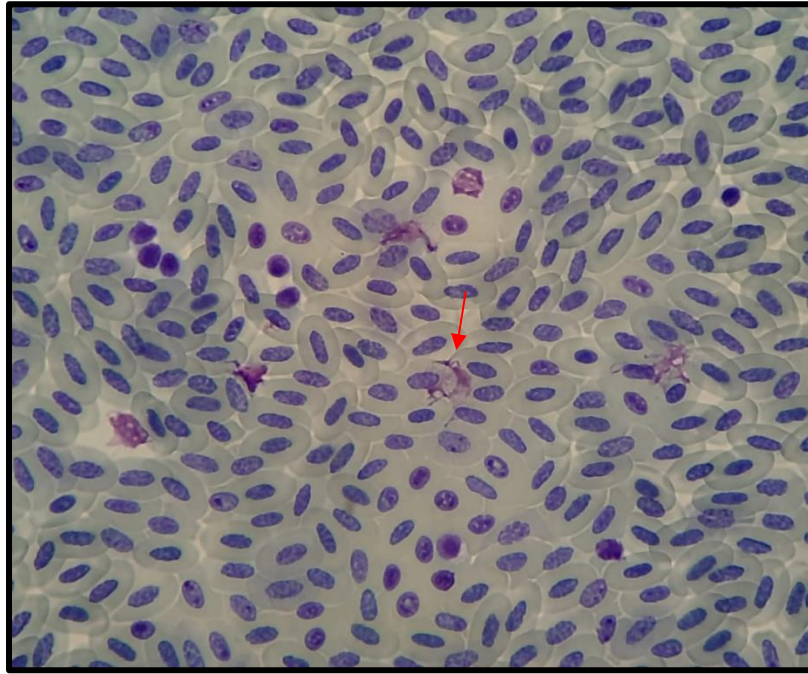


Figura 7. Presença de estrutura extra-eritrocitária suspeita de tripanosomatídeo em amostra de *Asio clamator* de vida livre, observado sob microscopia óptica em aumento de 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.

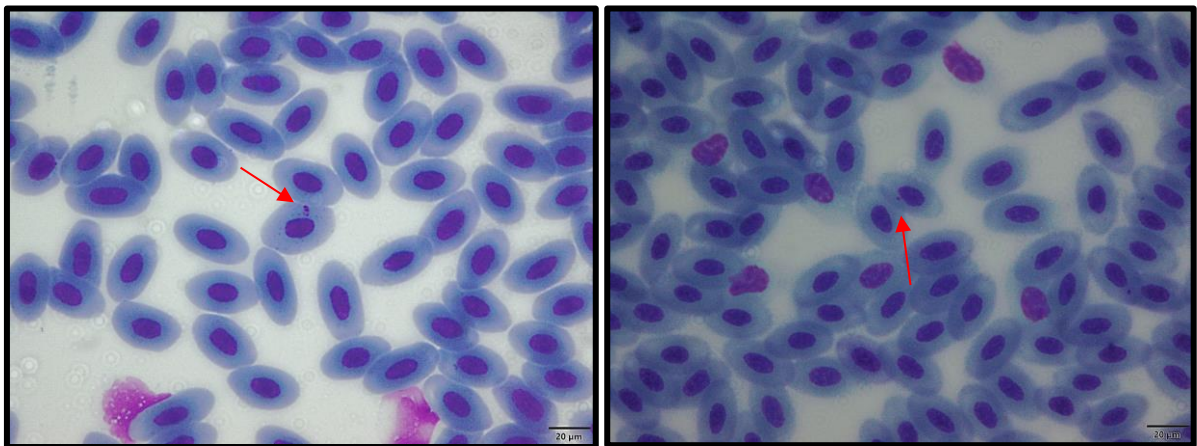


Figura 8. Presença de estruturas intra-eritrocitárias suspeita de haemosporídeos em amostra de *Rupornis magnirostris* de vida livre, observado sob microscopia óptica em aumento de 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.2 Detecção de DNA de agentes da Ordem Piroplasmida

Das 104 amostras de aves submetidas ao diagnóstico molecular, somente uma amostra amplificou 800pb do gene 18S *rDNA* de Piroplasmida (Figura 9). Essa amostra era proveniente de um *S. leucogaster* resgatado no Bairro do Recreio dos Bandeirantes e encaminhado para o CRAS-UNESA.

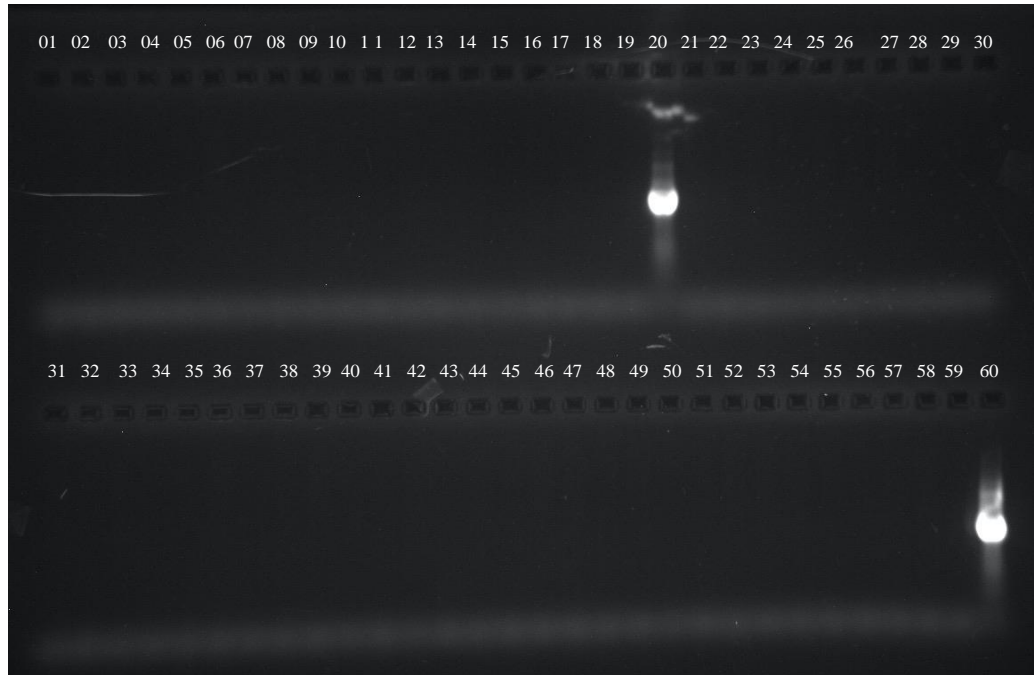


Figura 9. Representação dos produtos da PCR para o gene 18S *rDNA* (800 pb), aplicado em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separado por eletroforese (5V/cm), corado em brometo de etídio e visualizado em transiluminador de Luz UV. Poços 1-19 e 21-58: Amostras testes negativas; Poço 20: Amostra teste positiva; Poço 59: Controle negativo; Poço 60: Controle positivo.

4.2.3 Detecção de DNA para *Ehrlichia* spp. e *Borrelia* spp.

Das 104 amostras analisadas por testes moleculares, nenhuma amostra amplificou os fragmentos do gene *dsb* de *Ehrlichia* spp. (Figura 10) e do gene *flaB* de *Borrelia* spp. (Figura 11).



Figura 10. Representação do produto da PCR para o gene *dsb* (seta amarela: ~349 pb), aplicado em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separado por eletroforese (5V/cm), corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de Luz UV. Poço 01: Ladder; Poços 2-28: Amostras testes negativas; Poço: 29: Controle negativo; Poço 30: Controle positivo.



Figura 11. Representação dos produtos da PCR para o gene *flaB* (seta amarela: 354 pb), aplicado em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separado por eletroforese (5V/cm), corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de Luz UV. Poço 01: ladder; Poços 2-27: Amostras testes negativas; Poço 28: Controle negativo; Poços 29 e 30: Controles positivos.

4.2.4 Diagnóstico e caracterização molecular: família Trypanosomatidae

Durante a realização de PCR com alvo no fragmento do gene 24S α -rDNA da família Trypanosomatidae, houve amplificação de DNA-alvo em uma amostra (amostra 66) (Figura 12) provida do CRAS, sendo esta pertencente ao espécime *A. clamator*, que foi resgatada no município de Niterói.

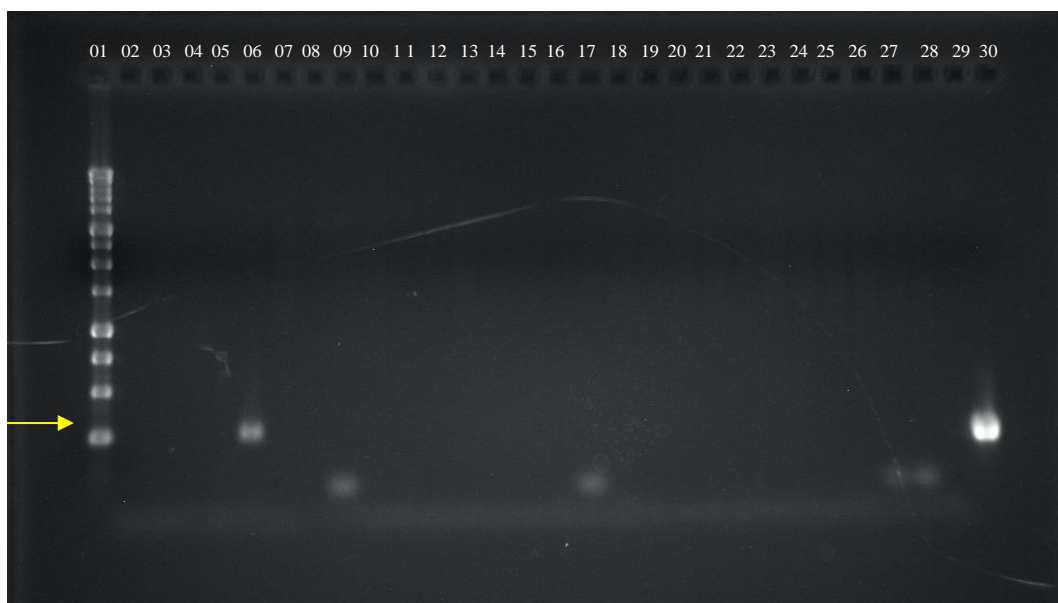


Figura 12. Representação dos produtos da PCR para o gene 24S *rDNA* (seta amarela: 270 pb), aplicado em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separado por eletroforese (5V/cm), corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de Luz UV. Poço 01: ladder; Poços 2-5 e 7-28: Amostras testes negativas; Poço 06: Amostra teste positiva; Poço 29: Controle negativo; Poço 30: Controle positivo.

A amostra positiva foi analisada e demonstrou uma identidade de 91,60% com sequências depositadas no GenBank correspondentes a *Trypanosoma theileri* (XM_029023350 e LC618031). Contudo, durante análise filogenética, e montagem de cladograma, observou-se que pouquíssimas sequências do gene 24S α -rDNA da família Trypanosomatidae encontram-se depositadas no GenBank. Dessa forma, restando algumas sequências da classe Protozoa desejáveis para alinhamento, onde foram selecionadas as seguintes para construção filogenética: *Trypanosoma cruzi* (GQ303145), *Trypanosoma minasenses* (KT369016), *Trypanosoma rangeli* (JN016745), *Leishmania braziliensis* (U73613), *Leishmania amazonensis* (U73615).

No cladograma (Figura 13), a amostra desse estudo se destacou das representações do gênero *Trypanosoma*, estando entre *Leishmania* spp. e *T. minasenses*, confirmando pertencer a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, porém necessitando de amplificação em outros genes alvos para definição em nível de espécie.

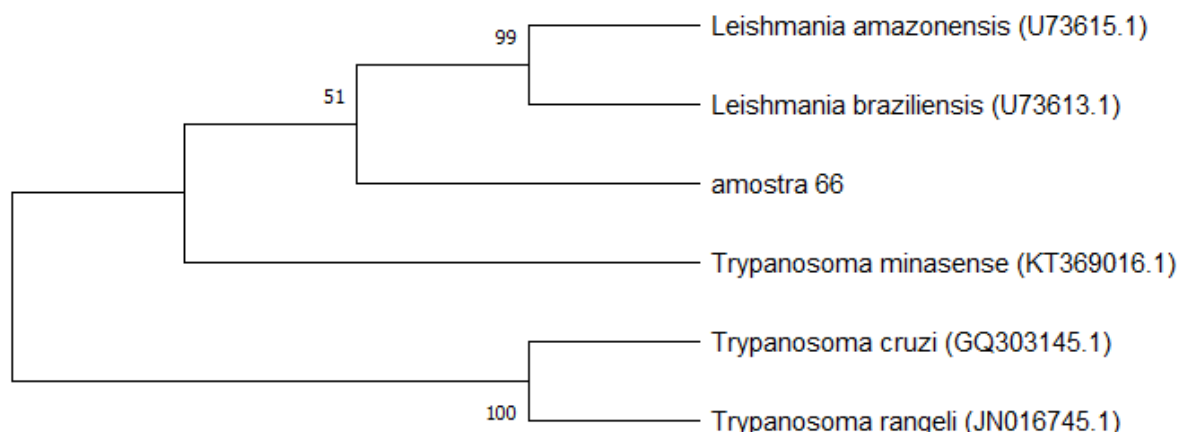


Figura 13. Análise filogenética de organismo da família Trypanosomatidae detectado em ave *Asio clamator* (Coruja Mocho Orelhuda), baseada na comparação da sequência do gene 24S α -rDNA (292 pares de base após ajuste manual). Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Maximum Likelihood e modelo Tamura-Nei, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *T. cruzi* (GQ303145.1) e *T. rangeli* (JN016745.1) foram usadas como outgroups. Sequência do presente estudo: amostra 66.

4.2.5 Diagnóstico e caracterização molecular: Ordem Haemosporida

Das 104 amostras analisadas para o gene *cytB*, 12 se apresentaram positivas para agentes da ordem Haemosporida, sendo quatro aves de vida livre (um *R. toco*, duas *C. talpacoti*, e um *R. magnirostris*) e oito aves mantidas sob cuidados humanos (um *A. aestiva*, uma *A. ararauna* e seis *G. gallus domesticus*). Uma das amostras positivas (amostra 126, *A. aestiva*) não apresentou eletroferograma satisfatório no sequenciamento, sendo retirada das análises filogenéticas, mantendo diagnóstico apenas como Haemosporida.

A amostra de *R. toco* foi analisada e demonstrou uma identidade de 99,9% com a sequência do gene *cytB* depositada no GenBank correspondente a *Plasmodium* sp. (KX171628) também encontrada em *R. toco*, porém no estado de São Paulo em animal mantido sob cuidados humanos. A reconstrução filogenética demonstrou que a amostra positiva do presente estudo é idêntica a sequência depositada sob o código KX171628, formando um clado exclusivo dessa espécie, destacando-se das demais espécies de *Plasmodium* descritas em aves utilizadas no alinhamento (Figura 14).

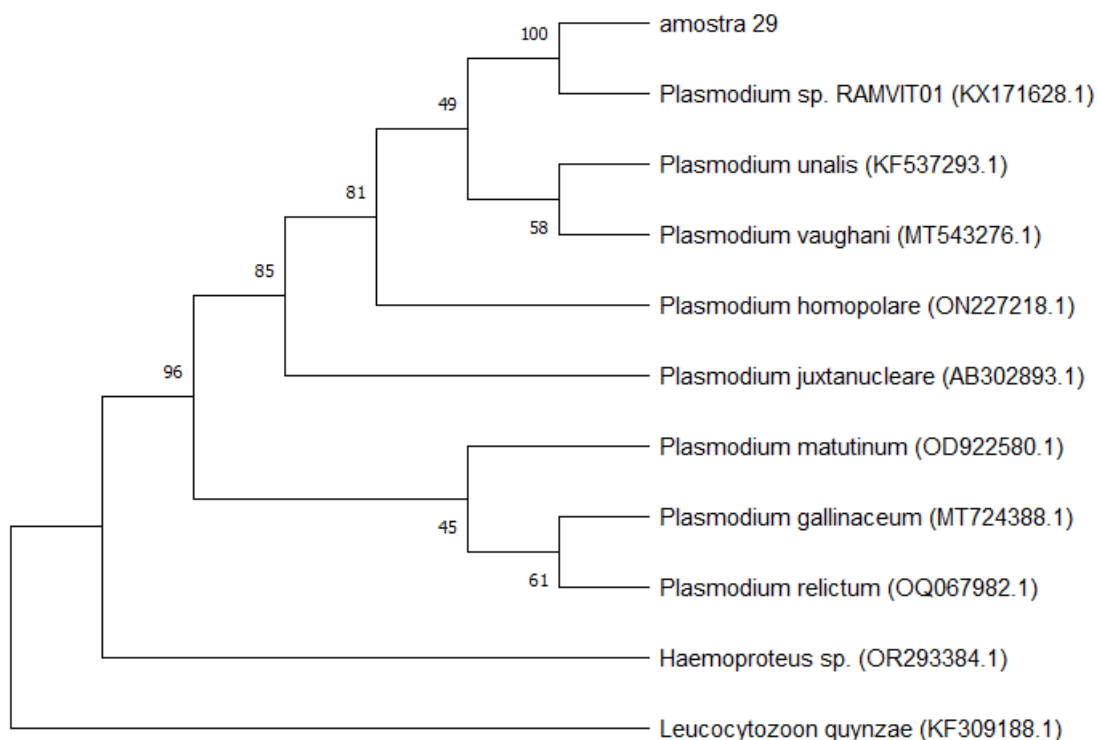


Figura 14. Análise filogenética de *Plasmodium* sp. detectado em ave *Ramphastos toco* (Tucano toco), baseada na comparação da sequência do gene *cytb* (451 pares de base após ajuste manual). Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Neighbor-Joining e modelo Kimura 2-parameter, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *Leucocytozoon quynzae* (KF309188.1) foi usado como outgroup. Sequência do presente estudo: amostra 29.

As duas amostras obtidas de *C. talpacoti* de vida livre analisadas nesse estudo (amostras 52 e 53) apresentaram uma identidade de 99,57% com *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *paramultipigmentatus* (depósito no GenBank: OP701685.1). Durante a reconstrução filogenética, ocupou o clado com representantes do gênero *Haemoproteus* que infecta aves, estando mais próximo filogeneticamente das sequências respectivas a protozoários encontrados em aves columbriformes. Contudo, formou um *cluster*, destacando-se juntamente com *Haemoproteus paramultipigmentatus* (depósito citado anteriormente) (Figura 15).

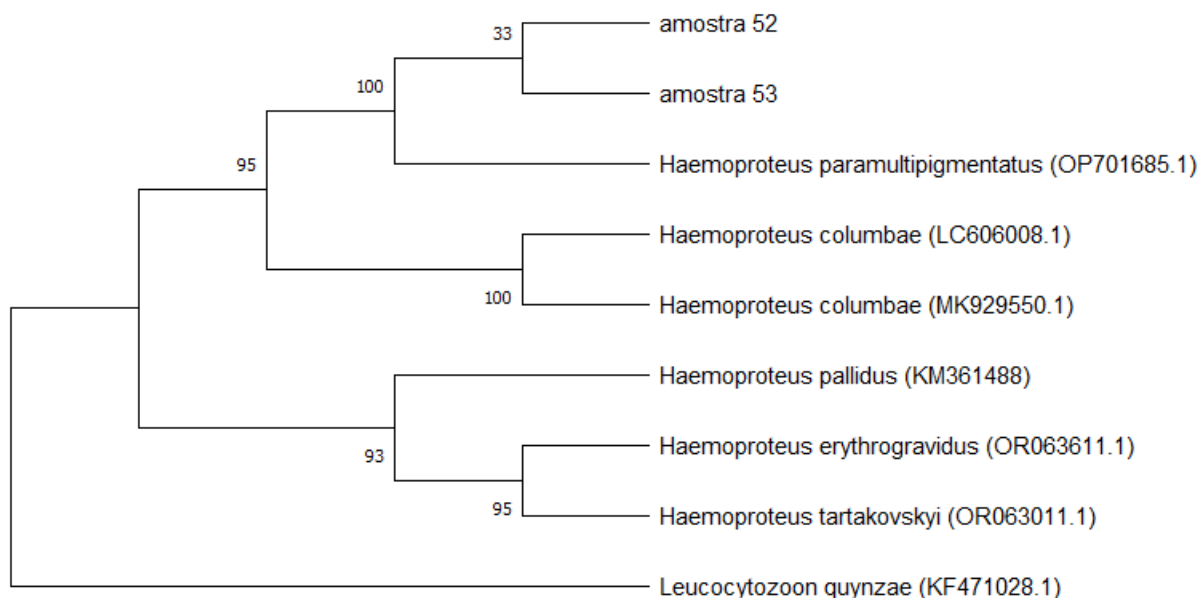


Figura 15. Análise filogenética de protozoário da ordem Haemosporida detectado em ave *Columbina talpacoti*, baseada na comparação da sequência do gene *cytb* (342 pares de base após ajuste manual). Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Maximum Likelihood e modelo Tamura-Nei, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *Leucocytozoon quynzae* (KF309188.1) foi usado como outgroup. Sequências do presente estudo: amostra 52 e amostra 53.

As amostras obtidas de *A. araruana* (amostra 128) e *G. gallus domesticus* provenientes de cativeiro e de *R. magnirostris* (amostras 78) de vida livre foram analisadas nesse estudo, e apresentaram uma identidade que variou de 99,57% a 100% com *P. juxtannucleare*. Durante a reconstrução filogenética, as amostras dos animais silvestres e de galináceos (amostras 139, 142, 143 e 146) com melhor qualidade foram selecionadas para a análise preliminar pelo gene *cytB*. Nos cladogramas, as amostras analisadas ocuparam o cluster com sequências representantes de *P. juxtannucleare* (Figura 16 e 17).

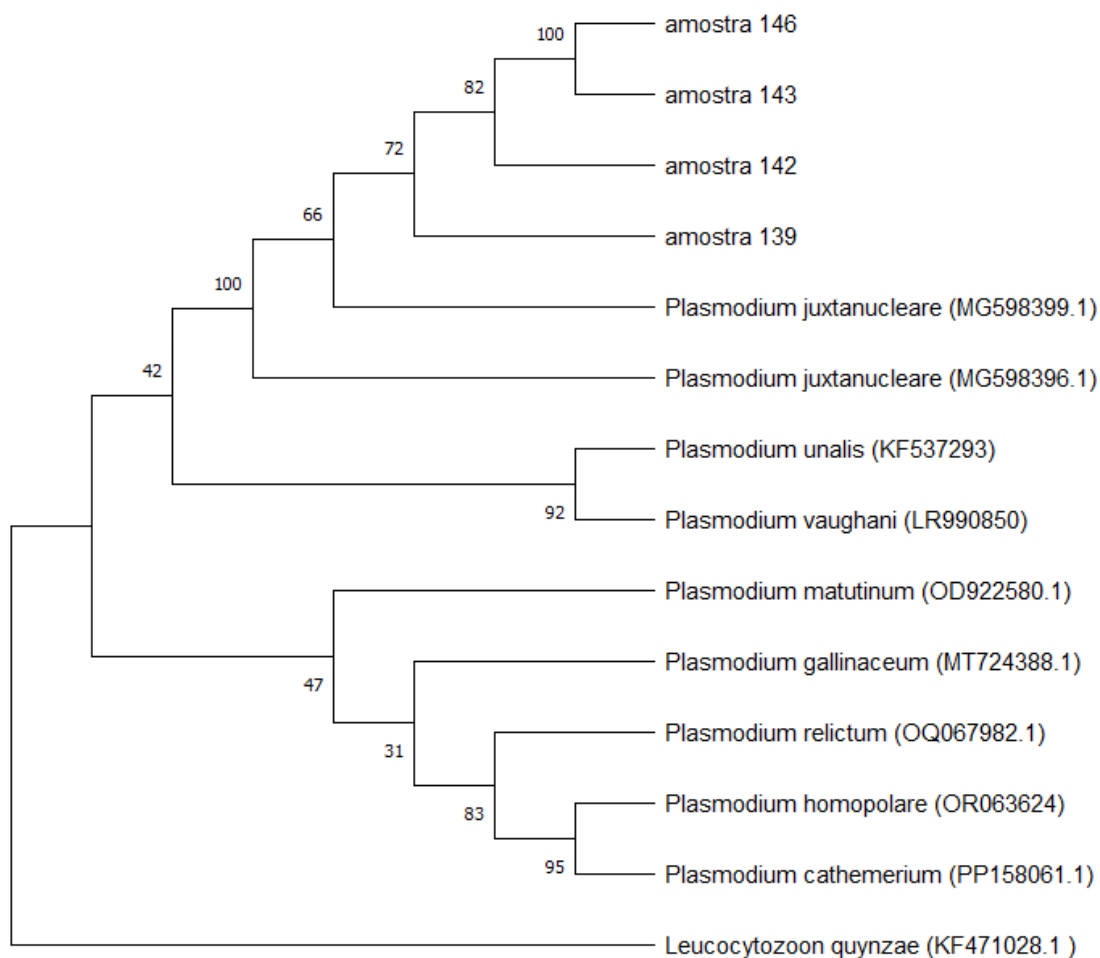


Figura 16. Análise filogenética de protozoários da ordem Haemosporida detectado em *G. gallus domesticus*, baseada na comparação da sequência do gene *cytb* (356 pares de base após ajuste manual). Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Neighbor-Joining e modelo Kimura 2-parameter, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *Leucocytozoon quynzae* (KF309188.1) foi usado como outgroup. Sequências do presente estudo: amostra 139, 142, 143 e 146.

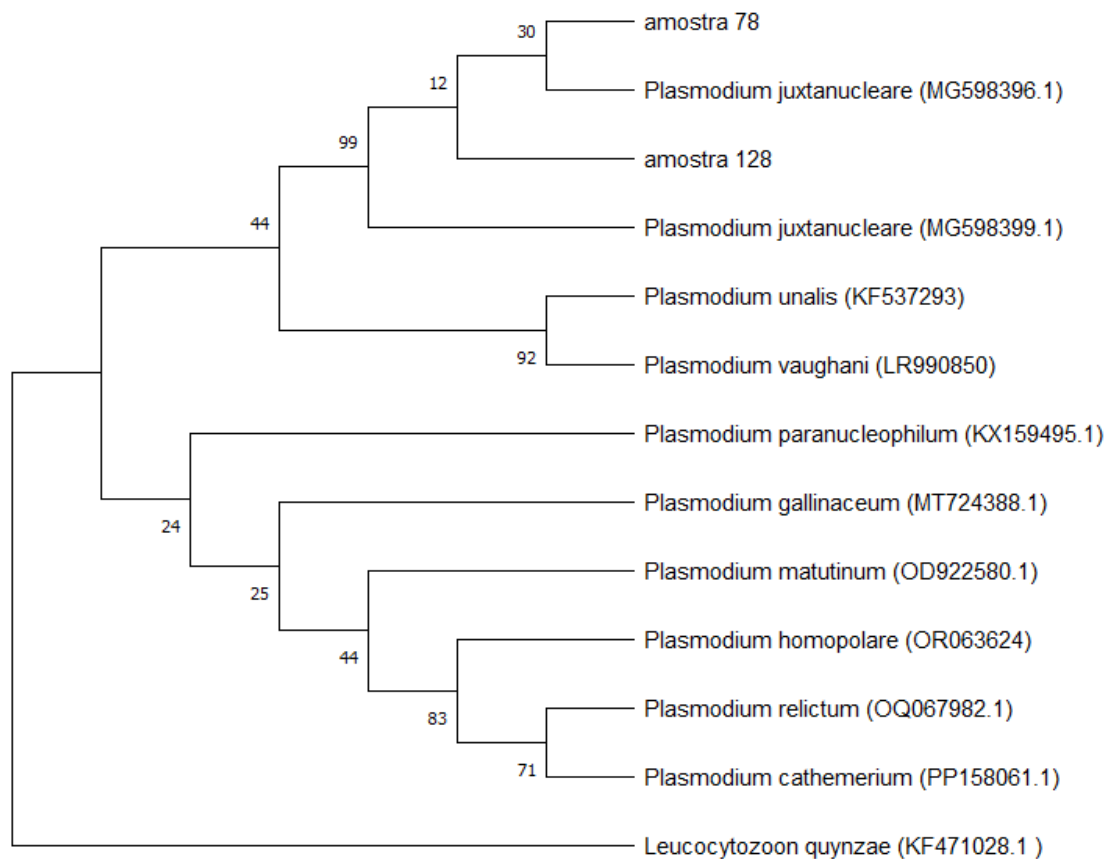


Figura 17. Análise filogenética de protozoários da ordem Haemosporida detectado em animais silvestres das espécies *Rupornis magniristris* (vida livre) e *Ara ararauna* (cativeiro), baseada na comparação da sequência do gene *cytb*. Números de acesso do GenBank estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Neighbor-Joining e modelo Kimura 2-parameter, e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 bootstrap que suportaram o ramo. *Leucocytozoon quynzae* (KF309188.1) foi usado como outgroup. Sequências do presente estudo: amostra 78 e 128.

5 DISCUSSÃO

Este estudo realizou o diagnóstico molecular para diversos hemoparasitos, com importância ecológica, conservação de avifauna e saúde pública, a partir do sangue de aves silvestres e domésticas provenientes de cuidados humanos e vida livre do estado do Rio de Janeiro. Estudos envolvendo aves vêm ocorrendo em diversas localidades do território nacional, mostrando a ocorrência de hemoparasitos em Centros de Triagem de Animais Silvestres (STOCCO, 2021), hospitais veterinários (BRUM et al., 2016) e vida livre (FECCHIO, 2011).

O presente estudo utilizou o gene *flaB*, para realizar o diagnóstico molecular para *Borrelia* spp., o que corrobora com estudos de Duneau e colaboradores (2008) que utilizaram o mesmo gene para identificação destes agentes em carrapatos *Ixodes uriae* provenientes de aves marinhas, constatando a presença nos ectoparasitos. Sabe-se que aves marinhas possuem ectoparasitos, entretanto, no presente trabalho nenhuma ave marinha continha ectoparasitos. Norte et al. (2015) usando carrapatos Ixodidae de aves passeriformes de Portugal, identificaram a presença de genótipos do complexo *B. burgdoferi* s.l, despertando o papel de aves silvestres como reservatórios e transportadores mecânicos de vetores do agente. Em pesquisas visando detectar *Borrelia* spp. em vertebrados presentes na Reserva Biológica de Duas Bocas, localizada no Espírito Santo, não foi encontrado a presença do agente em aves, morcegos e marsupiais (CUNHA, 2020), o que concorda com a presente pesquisa, uma vez que não houve amplificação de nenhuma amostra para *Borrelia* sp.

Nas amostras analisadas por este estudo não houve detecção molecular de DNA de *Ehrlichia* sp., porém, aves silvestres podem se infectar e albergar a presença do agente. Foi detectada a presença de *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, uma espécie de *Ehrlichia* intimamente relacionada com *Ehrlichia canis* e uma espécie de *Ehrlichia* intimamente relacionada com *Ehrlichia* encontrada em felinos selvagens no Brasil, em amostras de sangue de aves carnívoras (MACHADO et al., 2012). Sacchi (2015), na PCR convencional baseada no gene 16S *rDNA* de Anaplasmataceae, oito aves (6,61%) foram positivas para *Ehrlichia* spp., sendo cinco na PCR para *E. chaffeensis* e três na PCR para *E. canis*. Na análise filogenética descrita no estudo realizado por Sacchi (2015), quatro amostras de *Ehrlichia* spp. posicionaram-se no mesmo ramo de *Ehrlichia* identificadas em animais selvagens no Brasil e de um isolado humano nos EUA. Com isso, demonstra-se que agentes erliquiais estão circulantes em aves brasileiras.

Uma amostra de *A. clamator*, amplificou produto de PCR para o gene 24Sα-*rDNA*, através de indicadores moleculares com especificidade para família Trypanosomatidae. Após o sequenciamento, foi possível verificar que se tratava de uma sequência com 91,60% de similaridade com *T. theileri*, porém, ressalta-se que o fragmento amplificado possuía aproximadamente 270 pb, sendo necessário a realização de outros genes para melhor caracterização do agente. Além disso, ao pesquisar no GenBank poucas sequências do gene 24Sα-*rDNA* de trypanosomatídeos estão depositadas, o que reflete diretamente nas análises filogenéticas que sejam realizadas a *posteriori*, demonstrando a necessidade de analisar a sequência positiva nesse estudo em outras reações moleculares com alvos genéticos, como o 18S *rDNA* que apresenta maior diversidade de sequências no banco de genes. É sabido que diferentes espécies de *Trypanosoma* podem infectar aves silvestres (BENNETT et al., 1994; DUARTE, 2020), sendo sugerido que a maior parte dos tripanossomatídeos transmitidos para aves de rapina são através dos mosquitos da família Simuliidae (LACINA; BIRD, 2000). O estudo realizado por Duarte, (2020) foi pioneiro, por acessar a diversidade molecular de parasitos do gênero *Trypanosoma* em aves no Brasil. Com isso, o autor conseguiu observar que as espécies *Turdus flavipes* e *Turdus albicollis* foram identificados como novos hospedeiros de *Trypanosoma* sp. filogeneticamente relacionada com a espécie *T. bennetti* e sete novas sequências do gene 18S *rDNA* de tripanosomas aviários foram adicionadas aos bancos de dados

públicos, favorecendo a identificação de *Trypanosoma* em aves. Além disso, *Tachyphonus coronatus* foi considerado hospedeiro de mais de uma linhagem de *Trypanosoma*, uma vez que estavam relacionadas filogeneticamente com *T. bennetti* e outra com *T. avium*. A espécie *Trypanosoma theileri* é associada a ruminantes e o percentual de identidade descrito no presente estudo demonstra que há distanciamento dessa espécie, inferindo que possa pertencer a outra espécie que não esteja ainda depositada com o gene 24Sα-*rDNA* ou se tratar de algo ainda não descrito na literatura, precisando avançar em mais estudos para a correta caracterização molecular deste agente encontrado em *A. clamator*.

Após análise de similaridade do gene *cytB* com sequências depositadas no GenBank, observou-se que houve um predomínio de infecção por *Plasmodium* sp. entre os animais positivos na reação visando a detecção de haemosporídeos quando comparados com *Haemoproteus* (9 animais positivos para *Plasmodium* sp. e apenas dois positivos para *Haemoproteus* sp.). Dentre os positivos, oito apresentaram similaridade com *P. juxtannucleare*. Destes oito animais, um deles corresponde a espécie *R. magnirostris* vindo do CRAS após resgate com lesão em asa, infectado por *P. juxtannucleare*. Os demais animais correspondem a ambientes de manutenção de espécimes sob cuidados humanos, sendo uma *A. ararauna* proveniente e seis *G. gallus domesticus* provenientes do Parque de Educação Ambiental. A presença de *P. juxtannucleare* em *G. gallus domesticus* se assemelha a diversos estudos que encontraram o agente infectando galinhas de criação domiciliar e galinhas de produção (PREZOTO et al., 2001; MOTA et al., 2000). O agente também foi descrito no estado do Rio de Janeiro por Massard (1976), demonstrando que o agente se encontra na região a um longo período de no mínimo 47 anos. Sua fase aguda pode ser altamente patogênica, levando a sinais clínicos como anemia, letargia, anorexia, penas arrepiadas, diarreia, paralisa total ou parcial, edema e sinais neurológicos (ATKINSON et al., 2008), e até levando a óbito, como ocorrido com *Crossoptilon crossoptilon* no Japão (MURATA et al., 2008). Além disso, trabalhos demonstram que a mesma linhagem do parasito e apresentando quase o mesmo sequenciamento de genoma mitocondrial completo se encontram em galinhas e passeriformes de vida livre, despertando a atenção para uma ameaça real para aves silvestres que possam ser infectadas pelo agente, levando ao desequilíbrio ecológico e prejuízo para espécies endêmicas da região que possuem o agente (FERREIRA-JUNIOR et al., 2018).

O achado de *R. magnirostris* infectado por *P. juxtannucleare* neste estudo contrapõe a investigação realizada por Brum et al. (2016) que buscou a ocorrência de parasitismo em aves silvestres residentes e migratórias da Ilha da Marambaia, no estado do Rio de Janeiro, e entre os 11 espécimes de *R. magnirostris* analisados, nenhum apresentou evidência de *Plasmodium* sp. no exame direto. A ausência de hemossporídeo em investigação com realização de esfregaços seriados realizada por Zwarg (2010) em *R. magnirostris* corrobora os achados de Brum et al. (2016). Em estudo sobre a infecção por *Plasmodium* spp. em aves da Mata Atlântica brasileira realizado por Tostes et al. (2015) foi detectado tanto por microscopia quanto por reação em cadeia da polimerase a presença de *Plasmodium* sp. em três *R. magnirostris* e um espécime de *A. ararauna* provenientes da sede do IBAMA de Juiz de Fora, em Minas Gerais, onde os animais são recebidos ou por resgates pela população ou apreensões em cativeiros ilegais. Contudo, nesse estudo o diagnóstico não alcançou o nível de espécie, mantendo-se somente em nível de gênero. Em contrapartida, em outro estudo realizado por Tostes et al. (2017) dando continuidade as pesquisas de protozoários em aves silvestres, de cinco espécimes de *R. magnirostris* provenientes do IBAMA localizado no município de Seropédica, RJ, um esteve infectado por *Plasmodium* (*Novyella*) *paranucleophilum*. Morel et al. (2021) com o objetivo de analisar dados da sequência *cytB* de parasitos hemossporídeos de aves de rapina selvagens de vida livre, detectou *Plasmodium* sp. em *R. magnirostris*, apresentando 96% de identidade com *Plasmodium* sp. linhagem PESA01 encontrada em *Calidris melanotos*, conhecido popularmente como maçarico-de-colete (ave limícola da família Scolopacidae originária dos

EUA). Esses achados evidenciam a alta diversidade de *Plasmodium* spp. em aves de rapina neotropicals (MOREL et al., 2021).

Estudos em aves mantidas sob cuidados humanos pelo Brasil, descrevem a ocorrência de *Plasmodium* spp. em psitacídeos (BELO et al., 2009), corroborando com o achado em *A. ararauna* do presente trabalho. Estudos envolvendo rapinantes da Itália demonstrou a presença de *Plasmodium* nesses indivíduos (SCAGLIONE et al., 2016), semelhante ao achado no estudo. Reconhecendo que o espécime *A. ararauna* em que foi detectado o DNA de *P. juxtannucleare* é mantida no mesmo Parque Ambiental de Educação onde foram encontrados seis *G. gallus domesticus* também infectados por *P. juxtannucleare*, reforça a associação de que as condições de cativeiro podem interferir na distribuição e prevalência de hemoparasitos (TOSTES et al., 2015). As aves são mantidas próximas, o que não reflete as condições naturais de muitas espécies, logo, facilitando a exposição das aves aos vetores do agente malariogênico, incluindo insetos dípteros hematófagos da família Culicidae, que são comuns em regiões tropicais (VALKIUNAS, 2005). Esses insetos também são encontrados perto de dos abrigos dos animais, e podem servir como criadouros para insetos que fazem a manutenção e transmissão de agentes patogênicos no ambiente de cativeiro (TOSTES et al., 2015).

Diante da análise dos sequenciamentos depositados no Genbank, *Plasmodium* sp. encontrado em *R. toco* foi similar a sequência encontrada e depositada neste banco de genes por Chagas et al. (2016) em indivíduos da mesma família (*R. toco* e *R. vitellinus*) do Zoológico de São Paulo. A presença do agente no presente estudo, corrobora com os achados, e desperta o interesse em novos estudos para entender a relação entre agente-hospedeiro e se realmente se trata de uma nova espécie de hemoparasito que infecta principalmente indivíduos da família Ramphastidae.

Ainda sobre o diagnóstico de Haemosporida nas amostras analisadas nesse estudo, foi confirmado que *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *paramultipigmentatus* tem uma estrita relação com aves da espécie *Columbina talpacoti*. *Haemoproteus paramultipigmentatus* foi descrito inicialmente por análises morfológicas e moleculares em 2013 infectando aves Columbiformes (*Columbina passerina socorrensis*) no México (VALKIUNAS et al., 2013). Posteriormente, a prevalência de *Haemoproteus* spp. em Columbiformes brasileiros foi analisada um estudo taxonômico integrativo alcançando o diagnóstico de espécie *Haemoproteus paramultipigmentatus* com alta prevalência em *Columbina talpacoti* (MATOSO et al., 2021), corroborando os achados do presente estudo.

Um indivíduo *S. leucogaster* foi positivo para ordem Piroplasmida na biologia molecular e o esfregaço sanguíneo apresentava inclusões intraeritrocitárias sugestivas de agentes da ordem Piroplasmida. Quillfeldt et al. (2013) utilizando aves marinhas de cinco espécies dentro de dois gêneros, de ilhas da costa brasileira, identificaram a presença de *Babesia* sp. em *S. leucogaster* e *Sula dactylatra* (Atobá-grande), sendo o primeiro relato na região. Bonsergent et al. (2022) detectaram a presença de *Babesia* sp. em PCR e lâminas de esfregaço, em filhotes de aves marinhas, de *Larus michahellis* (Gaivota-de-patas-amarelas) presentes no sul da França e Sgarioni et al. (2023) em pesquisa com animais vivos resgatados e carcaças encontradas ao longo da costa sul do Brasil de aves Procellariiformes, descreveram a presença de *Babesia* em uma fêmea adulta de *Thalassarche chlororhynchos* (albatroz-de-nariz-amarelo do Atlântico), sendo o isolado denominado *Babesia* sp. estirpe Albatroz. Estudos como esses despertam a atenção para a região de nidificação e aves marinhas que se encontram debilitadas em região costeira, visto que a presença do parasito sugere prejuízo na aptidão das aves (MERINO et al. 2000; MARZAL et al. 2005) e em fragatas a presença do parasito sugeriu a redução da cor da bolsa gular, fator importante para a reprodução do indivíduo em natureza (MADSEN et al. 2007).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que hemoparasitos apicomplexos e tripanosomatídeos estão presentes em aves silvestres no estado do Rio de Janeiro. Ressalta-se que animais provenientes de condições de *in situ* apresentaram uma maior diversidade de espécies de hemoparasitos em relação a aqueles mantidos em condições *ex situ* sob cuidados humanos.

Este estudo faz a primeira descrição científica de agente da ordem Piroplasmida em *S. leucogaster* de vida livre com a detecção molecular e observação de merozoítos intraeritrocitários no estado do Rio de Janeiro.

O percentual de identidade genética encontrado para a espécie de *Trypanosoma* em *A. clamator* indica que mais estudos devem ser realizados a fim de caracterizar molecularmente e morfolologicamente este protozoário.

A espécie *H. paramultipigmentatus* infecta aves columbiformes, especialmente a espécie *C. talpacoti*, e este é o primeiro relato nessa ave no estado do Rio de Janeiro.

P. juxtannucleare apesar de comumente infectar galinhas domésticas, também tem capacidade de infectar aves silvestres mantidas em condições de cativeiro, como *A. ararauna*. Este estudo relata a primeira descrição de *R. magnirostris* naturalmente infectado por *P. juxtannucleare*.

Todos esses achados demonstram a diversidade hemoparasitária em aves silvestres na região sudeste do Brasil, e como a forma de manutenção dessas espécies, incluindo as condições *ex situ* podem interferir na propagação de agentes patogênicos e inter-relações ecológicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABINPET. Mercado Pet Brasil. 2019. In: **ABINPET - Associação Brasileira da Indústria de Produtos Para Animais de Estimação**, São Paulo, 2019. Disponível em: chromeextension://efaidnbmninnibpcapjpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fabinpet.org.br%2Fwpcontent%2Fuploads%2F2019%2F10%2Fabinpet_folder_2019_draft5.pdf&clen=3780692&chunk=true. Acesso em: 20 JAN. 2024.

ABINPET. Mercado Pet Brasil 2020. In: **ABINPET - Associação Brasileira da Indústria de Produtos Para Animais de Estimação**, São Paulo, 2020. Disponível em: chromeextension://efaidnbmninnibpcapjpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fabinpet.org.br%2Fwpcontent%2Fuploads%2F2020%2F06%2Fabinpet_folder_2020_draft3.pdf&clen=9838982&chunk=true. Acesso em: 20 JAN. 2024.

ABINPET. Mercado Pet Brasil 2021. In: **ABINPET - Associação Brasileira da Indústria de Produtos Para Animais de Estimação**, São Paulo, 2021. Disponível em: chromeextension://efaidnbmninnibpcapjpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fwww.abinpet.org.br%2Fdownload%2Fabinpet_folder_2021.pdf&clen=992733&chunk=true. Acesso em: 20 JAN. 2024.

ABRASE, Associação Brasileira de Criadores e Comerciantes de Animais Silvestres e Exóticos. **Relatório do Mercado Nacional de Fauna Silvestre e Exótica – Segmento Pet 2012**. Rio de Janeiro e São Paulo: ABRASE, 46 p. 2012.

ADEOLU, M.; GUPTA, R.S. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.105, p.1049-1072, 2014.

AGUIAR, D.M.; PESSOA ARAÚJO JUNIOR, J.; NAKAZATO, L.; BARD, E.; AGUILAR-BULTET, L.; VORIMORE, F.; ... & CABEZAS-CRUZ, A. Isolation and characterization of a novel pathogenic strain of *Ehrlichia minasensis*. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 528, 2019.

ALMEIDA, A. P. **Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo**. [Tese] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.

ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A.O. **Patologia Clínica**. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, p. 939-966. 2007.

ALVES, N. N. N. et al. Identificação e caracterização de hemoparasitos em *Gallus gallus domesticus* na região de Porto Velho, RO. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, p. e145111536814-e145111536814, 2022.

ATKINSON, C.T.; VAN RIPER, C. **Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, and *Leucocytozoon***. In: LOYE, J.E.; ZUK, M. Bird-parasite interactions: ecology, evolution and behaviour, Oxford University Press: London, p.19-47, 1991.

ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; WOODS, K. L.; IKO, W. M. J. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. **J. Wildl. Dis.** v.36, p.197-204, 2000.

ATKINSON, C. T. Avian Malaria. In: ATKINSON, C. T, THOMAS, N. J, HUNTER, D. B. Parasitic diseases of wild birds. Ames: Wiley-Blackwell Publishing. p. 35-53, 2008.

BARBOSA, C. B. F., SANCHES, L. A., FREIRE, M. R. **Zoonoses transmitidas por animais silvestres oriundos do tráfico**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 9p. 2014.

BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Biology of *Borrelia* species. **Microbiol. Rev.** v. 50, n. 4, p. 381- 400. 1986.

BARBOUR, A.G.; ADEOLU, M.; GUPTA, R.S. Division of the genus *Borrelia* into two genera (corresponding to Lyme disease and relapsing fever groups) reflects their genetic and phenotypic distinctiveness and will lead to a better understanding of these two groups of microbes (Margos et al. (2016) There is inadequate evidence to support the division of the genus *Borrelia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*) **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.67, p.2058-2067, 2017.

BELO, N.O. et al. Malária aviária em psitacídeos em cativeiro: detecção por microscopia e amplificação do gene 18S rRNA. **Medicina veterinária preventiva** , v. 88, n. 3, p. 220–224, 2009.

BENCKE, G. A. 2001. **Lista de referência das aves do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (Publicações Avulsas FZB, 10). 102p, 2001.

BENNETT, G. F. On the specificity and transmission of some avian trypanosomes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 39, p. 17–33, 1961.

BENNETT, G.F.; PEIRCE, M.A.; ASHFORD, R.W. Avian haematozoa: mortality and pathogenicity. **Journal of Natural History**, v. 27, p.993 –1001, 1993.

BENNETT, G. F.; EARLE, R. A.; SQUIRES-PARSONS, D. Trypanosomes of some sub-Saharan birds. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 263–271, 1994.

BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; OSTMAN, O.; HANSSON, B.; WESTERDAHL, H., PINHEIRO, R. T. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Biological sciences**, n. 267, v. 1452, p.1583–1589, 2000.

BERNARDES, L. P. Coinfecção por *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cão diagnosticado através da Sorologia: relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 16, n. 2, p. 1-11, 2022.

BLANCO, L. F. V. O. Hemoparasitos em aves de rapina da mesorregião do Triângulo Mineiro Uberaba, MG. Dissertação (mestrado). Universidade de Uberabada. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006.

BRASIL. MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE) Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003. Lista das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 de maio de 2003.

BRUM, W. M.; DA COSTA PEREIRA, M. A. V.; VITA, G. F.; FERREIRA, I.; MELLO, E.R.; AURNHEIMER, R. C. M.; SANAVRIA, A.; PADUA, E.D. Parasitismo em aves silvestres residentes e migratórias da Ilha da Marambaia, Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.36, n.11, p.1101-1108. 2016.

BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; MENEZES, R. M. T.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; LIMA, G. F. M.C.; ARAÚJO, R.A. S.; GUIDA, F. J. V.; KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p.123–127, 2010

CALCHI, A. C., VULTÃO, J. G., ALVES, M. H., YOGUI, D. R., DESBIEZ, A. L. J., DE SANTI, M., ANDRÉ, M. R. *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in *Xenarthra* mammals from Brazil, with evidence of novel ‘*Candidatus Anaplasma* spp.’. **Scientific RepoRtS**, v. 10, n. 1, p. 12615, 2020.

CALIC, S.B.; GALVÃO, M.A.; BACELLAR, F. et al. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. **Braz J Infect Dis**. v.8, p.259–262, 2004.

CAMPBELL, T.W. **Hematologia de Aves**. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. São Paulo: Roca, p. 205-238. 2014.

CARLI, E et al. *Cytauxzoon* sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 343-352, 2012.

CECÍLIO, P., SILVA, A. C., OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* Parasites. **Communications biology**, v. 5, n. 1, p. 305, 2022.

CHIAPPE, L. M.; VARGAS, A. Emplumando dinosaurios: la transición evolutiva de terópodos a aves. **El hornero**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2003.

COIMBRA, D. P. **Investigação de hemoparasitas de saguis do gênero *Callithrix* (Primates: Callithrichidae) de vida livre e cativeiro da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Dissertação, Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, 2020.

COLWELL, D.D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. **Vet. Parasitol.**, v.182, n.1, p. 14-21, 2011.

CORDEIRO, M. D.; ARAÚJO, I. M.; SILVA, C. B. da; GUTERRES, A.; FONSECA, A. H. da; BAÊTA, B. de A. Hemoparasitos em *Didelphis aurita* capturados em Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 2403–2414, 2022.

COSTA, P. S.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D. B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among the healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v.100, p.853–859, 2005.

COSTA, A. C. D., ROCHA, E. A., SILVA FILHO, J. D. D., FIDALGO, A. S. O. D. B. V., NUNES, F. M. M., VIANA, C. E. M., OLIVEIRA, M. D. F. Prevalência da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Doadores de Sangue. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, p. 1082-1091, 2021.

COX, F.E.G. The evolutionary expansion of the Sporozoa. **International Journal of Parasitology**, v. 24, p. 1301-1316, 1994.

CUNHA, M. A. C. R. **Investigação de borrelia sp. na reserva biológica de duas bocas, área de interesse epidemiológico no estado do Espírito Santo, Brasil**. 2019. 95 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância e Controle de Vetores) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

D'AVILA-LEVY, C. M.; BOUCINHA, C.; KOSTYGOV, A.; SANTOS, H. L.; MORELLI, K. A.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; DUVAL, L.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; GRELLIER, P.; LUKEŠ, J. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, p. 956–965, 2015.

DANIELS, T.J.; BATTALY, G.R.; LIVERIS, D., et al. Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v.8, p. 1524–1525, 2002.

DANILEWSKY, B. Zur Parasitologie des Blutes. **Biologisches Zentralblatt, Leipzig**, v.5, p.529-537, 1886.

DAVIES, A. J.; JOHNSTON, M. R. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. **Adv. Parasitol.**, v.45, p.1-107, 2000.

DE ALEXANDRIA PAGANO, I. S., DE SOUSA, A. E. A. B., WAGNER, P. G. C., & DA COSTA RAMOS, R. T. Aves depositadas no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA na Paraíba: uma amostra do tráfico de aves silvestres no estado. **Ornithologia**, v. 3, n. 2, p. 132-144, 2010.

DINIZ, P. P. V.; DE AGUIAR, D. M. Ehrlichiosis and Anaplasmosis: An Update. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 1225-1266, 2022.

DOBSON, S. R.; SÁNCHEZ, P. J. SYPHILIS. In: **Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. [s.l.] Elsevier, p. 1826–1846, 2009.

DOLZ, G., ÁBREGO, L., ROMERO, L. E., CAMPOS-CALDERÓN, L., BOUZA-MORA, L., & JIMÉNEZ-ROCHA, A. E. Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. **Acta Médica Costarricense**, v. 55, p. 34-40, 2013.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C. et al. Detection of Medically Important *Ehrlichia* by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

DUARTE, R. G. **Caracterização molecular de novas linhagens de Trypanosoma em aves no Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG) e na Zona da Mata Mineira (MG), Brasil**. 2021. 62 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

DUNEAU, D. et al. Prevalence and diversity of Lyme borreliosis bacteria in marine birds. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 8, n. 3, p. 352–359, 2008.

FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E.; RICKLEFS, R. E. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the Lesser Antilles. **The American Naturalist**, v. 165, n.4, p.466-480, 2005.

FAYET, G. **Canine leishmaniasis in Europe**; Part 2: Pathogenesis – Clinical signs – Diagnosis, Meril Biological Technical Bulletin, 1999.

FECCHIO, A.; MARINI, M. A.; BRAGA, E. M.; Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no cerrado brasileiro. **Neotrop. Biol. Conserv**, v.2, p.127-135, 2007.

FELDMAN, R.; FREED, L.; CANN, R. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. **Molecular Ecology**, v. 4, n. 6, p. 663-674, 1995.

FERMINO, B. R. et al. Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 3, p. 368–378, 2015.

FERREIRA-JUNIOR, F. C.; DE ANGELI DUTRA, D.; SILVEIRA, P.; PACHECO, R. C.; WITTER, R.; DE SOUZA RAMOS, D. G. et al. A new pathogen spillover from domestic to wild animals: *Plasmodium juxtanucleare* infects free-living passerines in Brazil. **Parasitology**, v.145, n. 14, p.1949- 1958, 2018;

FERREIRA, R. F. **Caracterização e análise da diversidade dos genes codificadores das proteínas GP19 e GP36 de Ehrlichia canis (Donatien e Lestoquard, 1935) detectada em sangue total de cães (Canis familiaris) naturalmente infectados**. 2012. 106f. Tese (Clínica e Reprodução Animal), Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2012.

GARNHAM, P. C. C. **Malaria parasites and other Haemosporidia**. Blackwell, Oxford. 1114p, 1966.

GEIGER, A. et al. Adult blood-feeding tsetse flies, trypanosomes, microbiota and the fluctuating environment in sub-Saharan Africa. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v. 9, p. 1496–1507, 2015.

GENCHI, C. Human babesiosis, an emerging zoonosis. **Parasitologia**, v. 49, n. 1, p. 29-31. 2007.

GOFTON, A.W.; LOH, S.M.; BARBOSA, A.D.; PAPARINI, A.; GILLET, A.; MACGREGOR, J.; OSKAM, C.L.; RYAN, U.M.; IRWIN, P.J. A novel *Ehrlichia* species in blood and *Ixodes ornithorhynchi* ticks from platypuses (*Ornithorhynchus anatinus*) in Queensland and Tasmania, Australia. **Ticks Tick. Dis**, v.9, p.435–442, 2018.

HAAG, J. O'H UIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Mol Bioch Parasitol.** v.91, p.37-49, 1998.

HALLA, U., et al. Blood parasites in reptiles imported to Germany. **Parasitol. Res.**, v. 113, n.12, p. 4587-4599, 2014.

HELLGREN O., WALDENSTRÖM J., BENSCH S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **Journal Parasitology**, n.90, p.797–802, 2004.

HILDEBRANDT, A.; FRANKE, J.; MEIER, F. et al. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. ticks. **Tick Borne Diseases**, v.1, p.105–107, 2010.

HOARE, C. A. The trypanosomes of mammals: A Zoological Monograph. Blackwell, Oxford, 749p., 1972.

HODGKINSON, J. E. Molecular diagnosis and equine parasitology. **Veterinary parasitology**, v. 136, n. 2, p. 109-116, 2006.

HÖFLING, E.; CAMARGO, H. F. A. **Aves no Campus**. 3º ed. São Paulo. Ed. da Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. 168pp. 2002.

HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S. R.; KRAUSE, P. J.; PERSING, D. H. Babesiosis. **Clin. Microbiol. Rev.** v.13, p. 451–469, 2000.

HUNFELD, K.P. et al. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. **Int. J. Parasitol.** v.38, p.1219–1237, 2008.

IBGE. 2004. **Indicadores de desenvolvimento sustentável: dimensão ambiental – biodiversidade**. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=24323> Acesso em: 02 jan 2024.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2018. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume III –Aves. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 709p, 2018. Disponível em: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol3.pdf

IUCN 2011. Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Reino Unido. Disponível em < www.iucnredlist.org/ > .

JALOVECKA, M. et al. Babesia life cycle - when phylogeny meets biology. **Trends in parasitology**, v. 35, n. 5, p. 356–368, 2019.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; IRWIN, P.J. PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 20–27, 2007.

JORDAN, B. E. et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia lonestari* in birds in Tennessee. **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 1, p. 131–138, 2009.

KARSHIMA, S. N.; KARSHIMA, M. N.; AHMED, M. I. Animal reservoirs of zoonotic Babesia species: A global systematic review and meta-analysis of their prevalence, distribution and species diversity. **Veterinary parasitology**, v. 298, n. 109539, p. 109539, 2021.

KUCERA, J. Incidence and some ecological aspects of avian trypanosomes in Czechoslovakia. **Folia parasit. (Praha)** v.30, p.209-222, 1983.

KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., AND TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v.35, p.1547-1549, 2018.

LACINA, D.; BIRD, D.M. **Endoparasites of raptors – a review and update**. In: LUMEIJ, J. T.; REMPLE, J.D.; REDIG. P.T.; LIERZ, M.; COOPER, J. E. Raptor biomedicine III, Lake Worth: Zoological Education Network, cap.9, p 65-100, 2000

LAHA, R.; DAS, M.; SEN, A. Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. **Tropical Parasitology**, v. 5, n. 2, p. 94-100, 2015.

LEMPEREUR, L. et al. Guidelines for detection of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 51-65, 2017.

LI, Y.; YANG, J.; CHEN, Z.; QIN, G.; LI, Y.; LI, Q.; LIU, J.; LIU, Z.; GUAN, G.; YIN, H.; LUO, J.; ZHANG, L. *Anaplasma* infection of Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) and ticks in Xinjiang, China. **Parasit Vectors**, v. 10, n. 8, p. 313, 2015.

LISBÔA, R. S. Estudo da transmissão experimental de *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) por *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 e avaliação comparativa de parâmetros clínicos e hematológicos em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2006.

LOTTA-ARÉVALO, I. A.; GONZÁLEZ, A. D.; GAMBOA-SUÁREZ, B.A.; PACHECO, M.A.; ESCALANTE, A.A.; MORENO, C.; ... MATTA, N.E. Haemosporidians in Non-Passerine Birds of Colombia: An Overview of the Last 20 Years of Research. **Diversity**, v.15, n.1, p.57, 2023.

MACHADO, R. Z. et al. Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species? **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 12, n. 8, p. 705–708, 2012.

MACPHERSON, C. N. L. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1319-1331, 2005.

MADSEN, V.; VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; MERCADE, C.; SANCHEZ, M.; OSORNO, J. L. Testosterone levels and gular pouch coloration in courting magnificent frigatebird (*Fregata magnificens*): variation with age- class, visited status and blood parasite infection. **Hormones and Behavior**, v. 51, p. 156–163, 2007.

MAGALHAES, R. B. **Pesquisa de agentes da família Anaplasmataceae em carrapatos de animais silvestres do estado de Mato Grosso**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal). Universidade de Cuiabá. 2020.

MARGOS, G.; FINGERLE, V.; CUTLER, S.; GOFTON, A.; STEVENSON, B.; ESTRADA-PEÑA, A. Controversies in bacterial taxonomy: The example of the genus *Borrelia*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, p. 101335, 2020.

MAROTTA, C.R.; DOS SANTOS, P.N.; CORDEIRO, M.D.; BARROS, J.H.D.S.; BELL-SAKYI, L.; FONSECA, A.H. *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) ticks in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology open**, v. 4, 2018.

MARCHOUX, E.; SALIMBENI, A. **La spirillose des poules**. Annales de l'Institut Pasteur Lille, v. 17, p. 569-580, 1903.

MARZAL, A.; DE LOPE, F.; NAVARRO, C.; MØLLER, A. P. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. **Oecologia**, n. 142, p. 541–545, 2005.

MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos biológicos do Plasmodium (Novyella) juxtannuale Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 3, p. 3-23, 1981.

MATOSO, R.V.; CEDROLA, F.; BARINO, G.T.M.; DIAS, R.J.P.; ROSSI, M.F.; D'AGOSTO, M. New morphological and molecular data for *Haemoproteus* (*H.*) *paramultipigmentatus* in the Atlantic Forest of Brazil. **Parasitol Int.**, v.84, p.1-8, 2021.

MC GHEE, R.B.; WERNSDORFER, W.H.; GREGOR, MC.I. Major animal models in malaria research. **Avian Malaria: Principles and Practice of Malariology**, v. 2, p. 1545-1567, 1988.

McNEIL, E.; HINSHAW, W. R.; KISSLING, R. E. A study of *Borrelia anserina* infection (spirochetosis) in turkeys. **Journal of Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 191-206, 1949.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: “A long story in short” or “Robert Koch has seen it”. **Eur. J. Protistol.** v. 29, p. 279–293, 1993.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1984.

MELO, A. L. T.; WITTER, R.; MARTINS, T. F.; PACHECO, T. A.; ALVES, A. S.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 1, p. 112–116, 2016.

MERINO, S.; MORENO, J.; SANZ, J. J.; ARRIERO, E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 267, p. 2507–2510, 2000.

MOLYNEUX, D. H. Vector relationships in the Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v. 15, p. 1–82, 1977.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. Ed 2. Ed ROCA. Rio de Janeiro. 2018.

MOREL, A.P.; WEBSTER, A.; PRUSCH, F.; ANICET, M.; MARSICANO, G.; TRAININI, G.; STOCKER, J.; GIANI, D.; BANDARRA, P.M.; ROCHA, M.I.S.; ZITELLI, L.C.; UMENO, K.A.; SOUZA, U.A.; DALL'AGNOL, B.; RECK, J. Molecular detection and phylogenetic relationship of Haemosporida parasites in free-ranging wild raptors from Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.23, p.1-7, 2021.

MUÑOZ-LEAL, S. et al. Novel *Ehrlichia* sp. detected in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) and in the seabird tick *Ixodes uriae* from Magdalena Island, southern Chile. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 6, p. 101256, 2019.

MURATA, K.; NII, R.; SASAKI, E.; ISHIKAWA, S.; SATO, Y.; SAWABE, K, et al. *Plasmodium* (*Bennettinia*) *juxtannucleare* infection in a captive white eared-pheasant (*Crossoption crossoptilon*) at a Japanese zoo. **J Vet Med Sci.** v. 70, n. 2, p. 203-5, 2008.

NASCIMENTO-CARVALHO, É. S. **Monitoramento e Controle de Simulídeos (Insecta: Diptera) no Sistema Único de Saúde - Biodiversidade, Diagnóstico Situacional em Três Regiões Brasileiras e Proposta de Estratégias de Ação**. Doutorado em Biodiversidade e Saúde (Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Rio de Janeiro, RJ), 2016.

NORTE, A. C. et al. Patterns of tick infestation and their *Borrelia burgdorferi* s.l. infection in wild birds in Portugal. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 6, p. 743-750, 2015.

NUNES, V.F.P. Pombos urbanos: o desafio de controle. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.89-92, 2003.

OGDEN, N. H.; LINDSAY, L. R.; HANINCOVA, K.; BARKER, I. K.; BIGRAS-POULIN, M.; CHARRON, D. F.; HEAGY, A.; FRANCIS, C. M.; O'CALLAGHAN, C. J.; SCHWARTZ, I.; THOMPSON, R. A. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v.74, n.6, p.1780–1790, 2008.

OLSEN, O. W. **Animal Parasites, Their Life Cycles and Ecology**. Dover Publications Inc., Mineola, NY, 564p. 1974.

PALTRINIERI, S.; RAVICINI, S.; ROSSI, G.; ROURA, X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v.186, n.3, p.393-395, 2010.

PENZHORN, B. L. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 11-21, 2006.

PERKINS, S.; OSGOOD, S.; SCHALL, J. Use of PCR for detection of subpatent infections of lizard malaria: implications for epizootiology. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 11, p. 1587- 1590, 1998.

PIETROBELLI, M.; CANCRINI, G.; MORETTI, A.; TAMPIERI, M.P. Animal babesiosis: an emerging zoonosis also in Italy? **Parassitologia**, v. 49, n. 1, p. 33-38. 2007.

PINTO, C. S., ALVES, V. R., SANTOS, W. S., GARCEZ, L. M. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) vetores de *Leishmania* spp., em área endêmica para a leishmaniose tegumentar no nordeste do Pará, Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 15, n. 10, p. e11038-e11038, 2022.

PODLIPAEV, S. A. Catalogue of world fauna trypanosomatidae (Protozoa). **Proceedings of the zoological Institute of the Russian Academy of Sciences**. Leningrad. v. 217, p 1-177. 1990.

PREZOTO, H. H. S. et al. Aspectos do parasitismo de Plasmodium (Novyella) juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L., 1758 em criação rústica no município de Santa Bárbara do Tugúrio - MG. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 65–67, 2001.

PRUM, R. O. Why ornithologists should care about the theropod origin of birds. **The auk**, v. 119, n. 1, p. 1–17, 2002.

QUINN P.J.; CARTER, M.E., MARKEY, B.K. & CARTER G.R. Clinical Veterinary Microbiology. First Edition. **Wolfe Publishing**, p.292-303. 1994.

RAR, V.; GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus* Neoehrlichia” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. **Infect. Genet. Evol.** v. 11, p. 1842–1861, 2011.

INEA. Resolução nº 157, de 19 de outubro de 2018. **Dispõe sobre as categorias de uso e manejo da fauna silvestre, nativa e exótica em cativeiro, no território do Estado do Rio de Janeiro**. Diário Oficial do Estado, Rio de Janeiro, RJ, 2018.

RENTAS. 1º Relatório Nacional Sobre o Tráfico de Fauna Silvestre. 2001. Disponível em: www.rentas.org.br/pt/trafico/rel_rentas.asp

REY, L. **Parasitologia**. 2 ed Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 731p, 1991.

RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C.; MARINI, M. A.; VAGO, A. R.; BRAGA, E. M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, v. 130, p. 261- 267, 2005.

RIBEIRO, V., GUEDES, L. B. S., CAVALCANTE, W. S., CAPARROZ, R. Diversidade de endoparasitos presente na comunidade de aves silvestres no Distrito Federal. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Goiás. Arquivo avulso. 2019. Disponível em:< www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pibic/trabalhos/VIVIAN_R.PDF>.

RIBEIRO, C. R.; GONÇALVES, C. A.; CRUZ, L. M.; GALERA, P. D. Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal–Brasil. **Ciência animal brasileira**, v. 20, p. 1-8, e-49589, 2019.

RICHARD, F. A.; SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I et al. A comparative analysis of PCRbased detection methods for avian malaria. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 819- 822, 2002.

ROCHA, F. M. Tráfico de animais silvestres no Brasil – Fundo Mundial para a Natureza (WWF). Documento para discussão WWF, 48p. 1995.

SACCHI, A. B. V. **Diagnóstico sorológico e molecular de agentes transmitidos por artrópodes em aves carnívoras**. 2015. ix, 75 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2015.

SANTOS, T., DE OLIVEIRA, J. B., VAUGHAN, C., & SANTIAGO, H. Health of an ex situ population of raptors (Falconiformes and Strigiformes) in Mexico: diagnosis of internal parasites. **Revista de Biologia Tropical**, v. 59, n.3), p.1265-1274, 2011.

SANTOS, A. V. P. D. **Detecção molecular de Bartonella spp., Mycoplasma spp. e Borrelia spp. em Leontopithecus chrysomelas (Kuhl, 1820) de vida livre e alterações hematológicas associadas a infecção**. 71 f. Tese (Doutorado em Clínica e Reprodução Animal), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018.

SANTOS, K. B., MARTINS, M. B., CARVALHO, A. V. Levantamento dos casos de Leishmaniose Visceral (calazar) em cães e humanos no município de Guaraí, Tocantins entre 2015-2020. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e311101624204-e311101624204, 2021.

SANTOS, L. C.; CUBAS, P. H. Colheita e Conservação de Amostras Biológicas. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, p. 930-938, 2007.

SCAGLIONE, F. E.; CANIZO, F. T.; CHIAPPINO, L. SERENO, A. RIPEPI, M. SALAMIDA, S. et al. *Plasmodium* spp. in a captive raptor collectin of a safaripark in northwest Italy. **Res Vet Sci**. v. 104, p. 123-125, 2016.

SCHEER, S. et al. Molecular analysis on protozoa in wild mammals run over in southern Rio Grande do Sul, Brazil. Análise molecular de protozoários em mamíferos silvestres atropelados no Sul do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 7037–7046, 2022.

SEBAIO, F. et al. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 21, n. 1, p. 7–15, 2012.

SEHGAL, R. N. M. et al. Spatially explicit predictions of blood parasites in a widely distributed African rainforest birds. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 278, p. 1025–

SEHGAL, R. N.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. **Molecular ecology**, v. 10, n. 9, p. 2319–2327, 2001.

SERRA FREIRE N M, MASSARD C L. *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, parasita de *Gallus gallus* L., *Meleagris gallopavo* L. e *Crysolophus* spp. na região do Pantanal do estado do Mato Grosso do Sul. **Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**; v. 20, p. 45-8, 1979.

SERVICE, M.W. Medical Entomology for Students. 3a Ed., London: Cambridge University Press. 302p., 2004.

SGARIONI, A. Z. et al. A novel variant of *Babesia* sp. (Piroplasmida) as a hemoparasite in procellariiform seabirds. **Parasitology research**, v. 122, n. 8, p. 1935–1941, 2023.

SMITH, A.; CLARK, P.; AVERIS, S.; LYMBERY, A.J.; WAYNE, A.F.; MORRIS, K.D.; THOMPSON, R.C. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). **Parasitology**, v. 135, p. 1329, 2008.

SOUTO, R. P., VARGAS, N., ZINGALES, B. "*Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene", **Experimental Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 306–314, 1999.

SOUZA, C. P., ALVES, V. R., SANTOS, W. S., GARCEZ, L. M. DE SOUZA PINTO, Claudeth et al. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) vetores de *Leishmania* spp., em área endêmica para a leishmaniose tegumentar no nordeste do Pará, Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 15, n. 10, p. e11038-e11038, 2022.

STOCCO, N. V. **Estudo Hematológico e Molecular da Infecção por Hemosporídeos e Agentes da Família Anaplasmataceae em Arara-canindé (*Ara ararauna*) e Papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) Mantidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-RJ)**, 2021. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

- STROMDAHL, E. WILLIAMSON, P.C., KOLLARS, T.M., EVANS, S.R., BARRY, R., VINCE, M.A., DOBBS, N. Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5557-5562, 2003.
- TATE, C.M.; HOWETH, E.W.; MEAD, D.G.; DUGAN, V.G.; LUTTRELL, M.P.; SAHORA, A.I.; MUNDERLOH, U.G.; DAVIDSON, W.R.; YABSLEY, M.J. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Ticks and Tick-borne Diseases**. [s. l.], v.4, p.110-119, 2013.
- TELFORD III S.R.; GORENFLOT, A.; BRASSEUR, P.; SPIELMAN, A. Babesial infections in humans and wildlife. In: Creier JP (Ed), **Parasitic Protozoa**, v. 5, p. 1-47. 1993.
- THEKISOE, O.M.; HONDA, T.; FUJITA, H.; BATTSETSEG, B.; HATTA, T.; FUJISAKI, K.; INOUE, N. A trypanosome species isolated from naturally infected *Haemaphysalis hystricis* ticks in Kagoshima Prefecture, Japan. **Parasitology**, v. 134, n. 7, p. 967-974, 2007.
- TORINA, A., BLANDA, V., ANTOCI, F., SCIMECA, S., D'AGOSTINO, R., SCARIANO, E., PIAZZA, A., GALLUZZO, P., GIUDICE, E. AND CARACAPPA, S. A Molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 125-130, 2013.
- TOSTES, R.; VASHIT, U.; SCOPEL, K. K. G.; MASSARD, C. L.; DAEMON, E.; D'AGOSTO, M. Plasmodium spp. and *Haemoproteus* spp. infection in birds of the Brazilian Atlantic Forest detected by microscopy and polymerase chain reaction. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 67- 74, 2015.
- TOSTES, R.; DIAS, R.J.P.; MARTINELE, I.; SENRA, M.V.X.; D'AGOSTO, M.; MASSARD, C. L. Multidisciplinary re-description of *Plasmodium* (*Novyella*) *paranucleophilum* in Brazilian wild birds of the Atlantic Forest kept in captivity. **Parasitology Research**. v.116, p.1887-1897, 2017.
- URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 273p, 1998.
- VALKIUNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 p. 2005.
- VALKIUNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; EVANS, E.; CARLSON, J.S.; MARTÍNEZ CÓMEZ, J. E.; SEHGAL, R. N. M. Two New *Haemoproteus* Species (Haemosporida: Haemoproteidae) from Columbiform Birds. **Journal of parasitology**, v. 99, n. 3, p. 513-521, 2013.
- VIRGILIO, L.; TEIXEIRA, G.; ALMEIDA, L.; MELO, H.; PROLO, S.; MENEGUETTI, D.; ... & TAKEMOTO, R. Trypanosomatids of four Loricariidae fish species in western Amazon rivers. **Conjecturas**, v. 21, n. 1, p. 30-43, 2021.

WEL, V.A.; KOCKEN, C.H.; ZEEMAN, A.M.; THOMAS, A.W. Detection of new *Babesia* microti-like parasites in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) with a suppressed *Plasmodium cynomolgi* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 643-645. 2008

WILHELMSSON, P., PAWELCZYK, O., JAENSON, T. G. T., WALDENSTRÖM, J., OLSEN, B., FORSBERG, P., LINDGREN, P. E. Three *Babesia* species in *Ixodes ricinus* ticks from migratory birds in Sweden. **Parasites & vectors**, v.14, n.1, p.183, 2021.

ZWARG, T. 2010. Hematologia, pesquisa de hemoparasitos e mensuração da atividade de colinesterases plasmáticas em Falconiformes e Strigiformes do estado de São Paulo, Brasil. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, USP. Brasil.

ANEXO I

Protocolo de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), para execução do trabalho.



Estácio

**Universidade Estácio de Sá
Comissão de Ética no Uso de Animais**

Certificamos que o protocolo de ensino nº022/2019 da pesquisa “OCORRÊNCIA DE HEMOPARASITOS EM ANIMAIS SILVESTRES RECEBIDOS PELO CENTRO DE REABILITAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES DA UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE SÁ (CRAS-UNESA)”, sob a responsabilidade do professor **Adilton Pacheco de Oliveira**, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estácio de Sá, Campus Vargem Pequena, está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 28 de maio de 2019. Este certificado é válido por um ano.

Rio de Janeiro, 28 de maio de 2019

Luciana de Paula Lima Schmidt de Andrade
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estácio de Sá

ANEXO II

Protocolo de aprovação do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por meio do Sistema de Autorização e informação em Biodiversidade (Sisbio)



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: 69103-2	Data da Emissão: 17/05/2019 14:27:34	Data da Revalidação*: 17/05/2020
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: ADLILTON PACHECO DE OLIVEIRA	CPF: 984.976.772-34
Nome da Instituição: Sociedade de Ensino Superior Estacio de Sá Ltda	CNPJ: 34.075.739/0001-84

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras dos animais silvestres	08/2019	07/2020
2	Análise das amostras	08/2019	07/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Marcos Pereira da Silva Junior	Estudante de graduação - auxiliar na execução	162.554.187-23	Brasileira
2	Laura Acerb Cordioli	Estudante de graduação - auxiliar na execução	013.823.891-08	Brasileira

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exige 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, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
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 nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 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	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 www.mma.gov.br/cgen .

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).

Código de autenticação: 0691030220190517

Página 1/5