

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Avaliação da ocorrência e impacto de *Trichomonas gallinae* em aves

Jenny Paola Hidalgo Martínez

Pelotas, 2022

Jenny Paola Hidalgo Martínez

Avaliação da ocorrência e impacto de *Trichomonas gallinae* em aves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Veterinária (área de concentração: Sanidade animal).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Raqueli Teresinha França

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Marlete Brum Cleff

Pelotas, 2022

M385a Martinez, Jenny Paola Hidalgo

Avaliação da ocorrência e impacto de *Trichomonas gallinae* em aves / Jenny Paola Hidalgo Martinez ; Raquel Teresinha França, orientadora ; Marlete Brum Cleff, coorientador. — Pelotas, 2022.

56 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Parasitas. 2. Aves silvestres. 3. Protozoários. 4. Tucano-de-bico-verde. I. França, Raquel Teresinha, orient. II. Cleff, Marlete Brum, coorient. III. Título.

CDD : 636.5089

Jenny Paola Hidalgo Martínez

Avaliação da ocorrência e impacto de *Trichomonas gallinae* em aves

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 02/03/2022

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Raqueli Teresinha França (Orientador)

Doutora em Medicina Veterinária e Patologia Clínica pela Universidade Federal de Santa Maria - RS

Prof.^a Dr.^a Luciana Laitano Dias de Castro

Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Paraná - PR

Prof.^a Dr.^a Camila Belmonte Oliveira

Doutora em Medicina Veterinária e Parasitologia pela Universidade Federal de Santa Maria - RS

Prof.^a Dr.^a Thirssa Helena Grando

Doutora em Medicina Veterinária e Parasitologia pela Universidade Federal de Santa Maria – RS

**Dedico este trabalho aos meus pais,
ao meu avô e minhas irmãs.**

Agradecimentos

Ao meus amados pais, pelo amor incondicional e grande motivação para que eu não desistisse dos meus sonhos.

As minhas queridas irmãs, pelo carinho e incentivo que me fazem continuar sempre.

Aos meus anjos de quatro patas, pelo amor incondicional e fazer de mim uma melhor pessoa e profissional.

Ao meu avó, pelo incentivo e nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

Ao pessoal do NURFS, pela paciência e dedicação para minhas coletas neste trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Protozoologia e Entomologia LAPEn, pela ajuda na identificação do objeto de estudo.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular Veterinária LABMol-VET, pela ajuda na extração de DNA e processo da PCR.

A minha orientadora Raqueli França, pela ajuda infinita, dedicação e guia em todo este processo.

Ao meus amigos no Brasil, pela ajuda infinita nesta travessia e por me mostrar as maravilhas deste país que tanto amo. E a Deus, por ter me concedido o privilégio de viver esta experiência maravilhosa no Brasil e realizar este grande desafio.

Obrigada.

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar” (William Shakespeare)

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível” (Charles Chaplin)

Resumo

HIDALGO, Jenny Paola. **Avaliação da ocorrência e impacto de *Trichomonas gallinae* em aves.** 2022. 56 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

A tricomoníase aviária é causada pelo protozoário *Trichomonas gallinae*, que tem como principais hospedeiros aves da família Columbidae, que apresentam alta prevalência do protozoário sem manifestar a doença. O contínuo crescimento da população de pombos e sua natureza cosmopolita fazem com que hoje exista uma distribuição mundial desta espécie, sendo responsável pela distribuição e manutenção da prevalência da tricomoníase em quase todo o mundo. A transmissão da doença pode ser por contato direto, ou indireto, por meio de alimentos ou água. Essa rota indireta é a razão pela qual uma grande variedade de ordens de aves pode ser infectada, muito diferente dos columbídeos, como falconiformes, strigiformes, passeriformes, piciformes, psittaciformes, gruiformes, galliformes ou anseriformes. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a presença de *T. gallinae* em passeriformes recebidos em um centro de triagem de animais silvestres, além de descrever um caso positivo de infecção por *T. gallinae* em um tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*). Para a realização deste estudo, foram coletadas e analisadas 300 amostras por conveniência, de swabs da mucosa oral de passáros da ordem Passeriforme, que correspondiam a 23 espécies diferentes recebidas no Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestres (NURFS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em estações distintas do ano, entre os meses de março a outubro de 2021. De todos os indivíduos foi realizado suabe da orofaringe, o material foi imediatamente acondicionado em tubo falcon contendo meio de cultura Trypticase-Yeast Extract-Maltose (TYM) e encaminhado ao Laboratório de Protozoologia e Entomologia (LAPEn) para incubação em estufa de crescimento bacteriológico e posterior identificação em lamina em montagem úmida no microscópio óptico em aumento de 40x do protozoário. A montagem úmida em lamina, foi feita em triplicata e analisada em sua totalidade. Das 300 aves avaliadas no cultivo *in vitro* para *T. gallinae*, 25 tiveram resultado inconclusivo e foram submetidas a análise de PCR, sendo negativas para *T. gallinae*. Embora não tenha sido encontrado nenhum Passeriformes positivo, o monitoramento da ocorrência desse protozoário deve continuar, pois sabe-se que

ele pode causar uma possível epidemia, levando a perdas para a fauna silvestre que possui aves ameaçadas de extinção.

Palavras-chaves: parasitas; aves silvestres; protozoários; tucano-de-bico-verde.

Abstract

HIDALGO, Jenny Paola. **Evaluation of the occurrence and impact of *Trichomonas gallinae* in birds.** 2022. 56 f. Dissertation (Masters in Veterinary Science) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Avian trichomoniasis is caused by the protozoan *Trichomonas gallinae*, whose main hosts are birds of the Columbidae family, which have a high prevalence of the protozoan without manifesting the disease. The continuous growth of the pigeon population and its cosmopolitan nature mean that today there is a worldwide distribution of this species, being responsible for the distribution and maintenance of the prevalence of trichomoniasis in almost the entire world. The transmission of the disease can be by direct contact, or indirect, through food or water. This indirect route is the reason why a wide variety of bird orders can be infected, very different from columbids such as falconiformes, strigiformes, passerines, piciformes, psittaciformes, gruiformes, galliformes or anseriformes. Thus, the aim of this study was to evaluate the presence of *T. gallinae* in passerines received at a wild animal screening center, in addition to describing a positive case of *T. gallinae* infection in a red-breasted toucan (*Ramphastos dicolorus*). For the accomplishment of this study, 300 samples were collected and analyzed for convenience, of swabs from the oral mucosa of birds of the Passeriforme order, which corresponded to 23 different species received at the Nucleus of Rehabilitation of Wild Fauna (NURFS) of the Federal University of Pelotas (UFPel), in different seasons of the year, between March and October 2021. From all individuals, an oropharyngeal swab was performed, the material was immediately placed in a falcon tube containing Trypticase-Yeast Extract-Maltose (TYM) culture medium and sent to the Laboratory of Protozoology and Entomology (LAPEn) for incubation in a bacteriological growth oven and subsequent identification on a slide in wet mounting under an optical microscope at 40x magnification of the protozoan. Wet mounting on a slide was performed in triplicate and analyzed in its entirety. Of the 300 birds evaluated in in vitro culture for *T. gallinae*, 25 had inconclusive results and were submitted to PCR analysis, being negative for *T. gallinae*. Although no positive Passeriformes were found, the monitoring of the occurrence of this protozoan should continue, as it is known that it can cause a possible epidemic, leading to losses for the wild fauna that has endangered birds.

Keywords: parasites; wild birds; protozoa; red-breasted toucan.

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Espécies de Passeriformes avaliados durante os meses de março a outubro do ano 2021.....	31
----------	------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de abreviaturas e siglas

%	Porcentagem
µL	Microlitro
µm	Micrometro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”
g/L	Grama por litro
LABMol-Vet	Laboratório de Biologia Molecular Veterinária
LAPEn	Laboratorio de Protozoologia e Entomologia
mg	Miligramas
mg/L	Miligramas por litro
Neg	Negativo
NURFS	Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”
Pos	Positivo
<i>R. dicolorus</i>	<i>Ramphastos dicolorus</i>
RNA	Ácido Ríbonucleico, do inglês “Ribonucleic acid”
<i>T. gallinae</i>	<i>Trichomonas gallinae</i>
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Artigos.....	17
2.1. Artigo 1.....	17
2.2. Artigo 2.....	34
3. Considerações finais.....	35
Referências.....	36
Anexos.....	42

1 Introdução

Tricomoniase aviária, causada pelo protozoário flagelado *Trichomonas gallinae*, é provavelmente a doença parasitária mais antiga conhecida na vida selvagem (FORRESTER & FOSTER, 2009). O *T. gallinae*, é um protozoário flagelado que pertence ao Domínio Eukaryota, Filo Protozoa, Sub-filo Sarcomastigophora, Superclasse Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Trichomonadida, Família Trichomonadidae, Gênero *Trichomonas*, Espécie *gallinae* (STABLER, 1954).

O trofozoítos de *T. gallinae* têm uma forma ovóide a piriforme com um tamanho de cerca de 7-11 µm. Possuem quatro flagelos anteriores livres e um quinto recorrente, que não se torna livre no pólo posterior, uma vez que se estende por apenas dois terços do comprimento do corpo (DE CARLI e TASCA, 2003; MEHLHORN *et al.*, 2009). A forma de reprodução do *T. gallinae* é fissão binária, sendo incapaz de formar cistos verdadeiros, embora estágios semelhantes a cistos - pseudocistos - tenham sido descritos (DE CARLI e TASCA, 2003; MEHLHORN *et al.*, 2009). Esses pseudocistos podem fornecer outra via de transmissão e um estágio ambientalmente resistente durante condições desfavoráveis (DE CARLI e TASCA, 2003; MEHLHORN *et al.*, 2009).

Os principais hospedeiros de *T. gallinae* são aves da família Columbidae (STABLER, 1954), que apresentam alta prevalência de tricomoniase sem manifestar a doença, embora uma grande variedade de espécies aviárias também possam ser infectadas. A transmissão da doença pode ocorrer por contato direto, ou indireto, por meio da ingestão de alimentos ou água contaminados com os trofozoítos do protozoário, tendo relevante importância a regurgitação da comida entre pais e seus filhos (ANDRÉ, 2005). Essa rota indireta é a razão pela qual uma grande variedade de Ordens de aves pode ser infectada, muito diferente dos columbídeos, como falconiformes, strigiformes, passeriformes, piciformes, psittaciformes, gruiformes, galliformes ou anseriformes. (COLE, 1999).

A forma clássica de apresentação da doença é a formação de placas caseosas na cavidade oral, faringe, esôfago e papo (figura 1) (STABLER, 1954; KRONE, 2002). Eventualmente as lesões podem envolver o canal auditivo, laringe e trato respiratório (KRONE; COOPER, 2002). Lesões traqueais e em sacos aéreos também já foram

descritas. O diagnóstico diferencial da tricomoníase deve incluir lesões da cavidade oral associadas à capilariose, candidíase, poxviruse e hipovitaminose A (SAMOUR; BAILEY; COOPER. 1995).



Figura 1: Aves com diagnóstico de *T. gallinae*: A) Quiri-quiri (*Falco sparverius*) e B) Jacurutu (*Bubo virginatus*) com lesão caseosa em cavidade oral .

A infecção inicia-se quando as tricomonas estão dispostas em paliçada na superfície epitelial da mucosa oral; nessa etapa não se observa inflamação. À medida que a doença progride, a infiltração de leucócitos pode ser vista abaixo da camada de tricomonas. Imediatamente após essa infiltração, a lesão torna-se macroscopicamente visível e a inflamação já pode ser observada. À medida que mais leucócitos invadem a mucosa e morrem, as lesões tornam-se maiores, com o protozoário permanecendo entre a área necrótica e o tecido normal. Leucócitos mortos fornecem substrato adequado para a multiplicação de tricomonas e o ciclo continua. Se as defesas celulares não puderem conter o parasita, a morte ocorre devido à destruição maciça do órgão (CALNEK, 1995)

O diagnóstico de tricomoníase é frequentemente complicado pela fragilidade do parasita. Para garantir resultados de teste válidos, é essencial coletar e manusear amostras da maneira correta antes da análise. Testes de cultivo, reação molecular para amplificação específica de parasitas, ou uma combinação de ambos os métodos de teste é o mais eficiente e a forma mais comumente usada para diagnosticar tricomonose em animais (COLLÁNTES-FERNÁNDEZ, 2018).

Em aves infectadas por *T. gallinae*, um diagnóstico imediato por microscopia direta de material coletado por meio de esfregação da cavidade oral durante o exame clínico ou necropsia é possível. Também em pássaros o uso de cultivo para a detecção de tricomonas é claramente superior em sensibilidade como em comparação com a microscopia direta (COOPER E PETTY 1988). A vantagem da microscopia direta como ferramenta de diagnóstico é a sua velocidade e o baixo custo do exame. Esta é a razão pela qual a microscopia direta é frequentemente usada por profissionais para o diagnóstico de *T. gallinae* em pássaros (FORRESTER E FOSTER 2008; AMIN *et al.*, 2014).

A gravidade da doença depende da suscetibilidade das aves infectadas em conjunto com o potencial patogênico da cepa incriminada e o estágio de infecção (COOPER e PETTY 1988; COLE e FRIEND 1999). A gravidade das lesões patológicas de *T. gallinae* no trato digestivo superior varia de uma inflamação leve da mucosa a caseosa áreas que bloqueiam o lúmen esofágico (STABLER 1954). Algumas cepas virulentas são capazes de criar membranas diftéricas - associadas a lesões fibrinosas em órgãos internos, como o fígado, pulmões e peritônio - resultando em alta mortalidade (NARCISI *et al.*, 1991). Cepas de virulência moderada são frequentemente associadas a abscessos caseosos na parte superior trato digestivo e região orofaríngea, enquanto nenhuma lesão apreciável é produzida por cepas avirulentas (COLE e FRIEND 1999). *In vitro*, a proliferação de *T. gallinae* foi associada com uma desintegração da monocamada celular, e *T. gallinae* geneticamente diferente isolados causaram diversas magnitudes de efeitos citopáticos em diferentes linhagens celulares (AMIN *et al.*, 2012a).

Amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do RNA ribossômico 5.8S (rRNA) e circundando as regiões espaçadoras transcritas internas 1 e 2 (ITS1, ITS2) tem sido cada vez mais usadas para confirmar a presença de infecção por *T. gallinae* (GASPAR DA SILVA *et al.*, 2007) e para identificar heterogeneidades genéticas (FELLEISEN, 1997; GERHOLD *et al.*, 2008; ANDERSON *et al.*, 2009). Análise de sequência da região ITS1 / 5.8S / ITS2 (doravante denominada região ITS) identificaram uma variação marcada entre sequências obtidas de uma ampla região geográfica e de diferentes taxa de hospedeiros, com

cerca de 15 Sequências da região ITS identificadas como ITS distintas tipos de região (GERHOLD *et al.*, 2008; ANDERSON *et al.*, 2009; SANSANO-MAESTRE *et al.*, 2009).

O tratamento consiste na administração de medicamentos derivados de nitromazóides (ronidazol, metronidazol, carnizadol, etc). Estes são de amplo espectro e também atuam contra outros protozoários e algumas bactérias anaeróbicas. Seu mecanismo de ação é modificar o DNA formando radicais livres. Tem excreção renal e sua toxicidade é baixa (GIRONES, 2016).

A tricomoníase aviária é muito provável de ocorrer em qualquer área onde estejam presentes pombos ou rolas (COLE, 1999). Segundo os estudos realizado por (LAWSON *et al.*, 2012), uma cepa clonal de *T. gallinae* surgiu como a causa de uma doença epidêmica de tentilhões na Europa. O surto desta doença em passeriformes já foi descrito em outros países, como no norte e centro da Alemanha (FORZAN *et al.*, 2010; LAWSON *et al.*, 2012; QUILLFELDT P. *et al.*, 2018), Ilhas britânicas (CHI J. F., 2013), Fennoscandinavia (FORZAN *et al.*, 2010; LAWSON *et al.*, 2012), Reino Unido (LAWSON *et al.*, 2012; GANAS P. *et al.*, 2013), Áustria (GANAS P. *et al.*, 2013), Eslovênia (ZADRAVEC *et al.*, 2012) e América do norte (ANDERSON *et al.*, 2009). No Brasil, esse protozoário foi descrito por ECCO *et al.* (2012) no Estado de Minas Gerais, parasitando um exemplar da família Ramphastidae, tucano-toco (*Ramphastos toco*). No Estado do Rio Grande do Sul há relatos da tricomoníase em pombos domésticos e em rapinantes (DE CARLI e TASCA 2003; ECHENIQUE *et al.*, 2019). Desta forma, o objetivo desta dissertação foi avaliar a presença de *T. gallinae* em passeriformes recebidos no Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestres da Universidade Federal de Pelotas, e relatar a ocorrência da doença em um tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*).

2 Artigos

2.1 Artigo 1

DIAGNOSIS OF *Trichomonas gallinae* IN PASSERINES

Jenny Paola Hidalgo Martínez; Alexia Brauner de Mello, Marjorie de Giacometti;
Rodrigo Casquero Cunha; Camila Belmonte Oliveira, Marlete Brum Cleff, Raqueli
Teresinha França

Submetido à revista Semina: Ciências Agrárias

Diagnosis of *Trichomonas gallinae* in passerines

Diagnóstico de *Trichomonas gallinae* em passeriformes

Highlights

1. *T. gallinae* is the only species with a pathogenic potential for birds.
2. Direct contact transmission is the most efficient route to establish an infection.
3. The migratory habit, favors the spread of microorganisms.
4. The diagnosis of trichomonosis is often complicated by the fragility of the parasite.

ABSTRACT

Trichomoniasis, caused by the protozoan *Trichomonas gallinae*, has as main hosts birds of the Columbidae family, which have a high prevalence of the protozoan without manifesting the disease. The continuous growth of the pigeon population and its cosmopolitan nature mean that today there is a worldwide distribution of this species, being responsible for the distribution and maintenance of the prevalence of trichomoniasis in almost the entire world. The transmission of the disease may be by direct contact, or indirect, through food or water. This indirect route is the reason why such a wide range of bird orders can be infected, very different from columbids such as falconiformes, strigiformes, passerines, piciformes, psittaciformes, gruiformes, galliformes or anseriformes. Thus, the objective of this study was to evaluate the presence of *T. gallinae* in passerines received at a Wild Animal Screening Center. In order to carry out this study, 300 birds of the order Passerine corresponding to 23 different species were analyzed, received at the Wild Fauna Rehabilitation Center (NURFS) of the Federal University of Pelotas (UFPel), in different seasons of the year between the months of March to October 2021. Samples of swabs from the oropharynx were collected from all individuals, the material was immediately placed in a falcon tube containing Trypticase-Yeast Extract-Maltose (TYM) culture medium and sent to the Laboratory of Protozoology and Entomology (LAPEn), for incubation

in a bacteriological growth greenhouse and subsequent identification of the protozoan on a slide in wet mounting under an optical microscope in a 40X objective. Wet mounting on a slide was performed in triplicate and analyzed in its entirety. Of the 300 birds evaluated in *in vitro* culture for *T. gallinae*, 25 had inconclusive results and were submitted to PCR analysis, being negative for *T. gallinae*. Although no positive Passeriformes was found, the monitoring of the occurrence of this protozoan must continue, as it is known that it may easily cause a possible epidemic, leading to losses for the wild fauna that has endangered birds.

Keywords: Parasites. Protozoa. Wild birds.

RESUMO

Tricomoníase, causada pelo protozoário *Trichomonas gallinae*, tem como principais hospedeiros aves da família Columbidae, que apresentam alta prevalência do protozoário sem manifestar a doença. O contínuo crescimento da população de pombos e sua natureza cosmopolita fazem com que hoje exista uma distribuição mundial desta espécie, sendo responsável pela distribuição e manutenção da prevalência da tricomoníase em quase todo o mundo. A transmissão da doença pode ser por contato direto, ou indireto, por meio de alimentos ou água. Essa rota indireta é a razão pela qual uma gama tão ampla de ordens de aves pode ser infectada, muito diferente dos columbídeos, como falconiformes, strigiformes, passeriformes, piciformes, psittaciformes, gruiformes, galliformes ou anseriformes. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a presença de *T. gallinae* em passeriformes recebidos em um Centro de Triagem de Animais Silvestres. Para a realização deste estudo foram analisados 300 aves por conveniência da ordem Passeriforme correspondente a 23 espécies diferentes recebidos no Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestres (NURFS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em estações distintas do ano compreendidas entre os meses de março a outubro de 2021. De todos os indivíduos foram colhidas amostra de suabe da orofaringe, o material foi imediatamente acondicionado em tubo falcon contendo meio de cultura Tripticase-Yeast Extract-Maltose (TYM) e encaminhado ao Laboratório de Protozoologia e Entomologia (LAPEn), para incubação em estufa de crescimento bacteriológico e

posterior identificação em lamina em montagem úmida no microscópio óptico em objetivo de 40X do protozoário. A montagem úmida em lamina, foi feita em triplicata e analisada em sua totalidade. Das 300 aves avaliadas no cultivo *in vitro* para *T. gallinae*, 25 tiveram resultado inconclusivo e foram submetidas a análise de PCR, sendo negativas para *T. gallinae*. Embora não tenha sido encontrado nenhum Passeriformes positivo, o monitoramento da ocorrência desse protozoário deve continuar, pois sabe-se que ele pode causar uma possível epidemia facilmente, levando a perdas para a fauna silvestre que possui aves ameaçadas de extinção.

Palavras-chaves: Aves silvestres. Parasitas. Protozoários.

INTRODUCTION

Trichomoniasis is a parasitic disease caused by the flagellate protozoan *Trichomonas gallinae* that mainly affects columbiformes and birds of prey, and occasionally, galliformes, passerines, piciformes and psittaciformes (Grave, 1996). Pigeons (*Columba livia*) and other species of the Columbidae family are the main hosts of *Trichomonas gallinae* (Stabler, 1954). In the host, the parasites are found in the upper digestive tract: oral cavity, pharynx, esophagus and crop (Stabler, 1954). Transmission from one bird to another does not require an intermediate host or vector, occurring through direct contact through the ingestion of contaminated food and water, with the regurgitation of food between parents and their children being relevant (André 2005).

Given the strong seasonal trends in the prevalence of infection, the age range of the population during peak transmission and pathogenesis in adults appears to be driven by environmental factors, physiological and behavioral changes that accompany the annual cycle of birds. As observed in other avian pathogens, the energy load and stress of migration, or even pre-migration activity, is linked to impaired host immunity, with increased susceptibility to infections (Lloyd, 1995; Altizer *et al.*, 2011). The trichomoniasis is also an emerging infectious disease of passerine birds that are likely to become exposed to *T. gallinae* in artificial feed and water sources shared by pigeons (Forzan *et al.*, 2010; Neimanis *et al.*, 2010; Zadavec *et al.*, 2012).

Trichomoniasis in chaffinches emerged in Great Britain in 2005, causing a significant decline in the breeding populations of White-tailed Woodpecker (*Carduelis chloris*) and Chaffinch (*Fringilla coelebs*) (Robinson *et al.*, 2010; Lawson *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2013). In 2008, the *T. gallinae* epidemic in Great Britain spread to southern Fennoscandia, causing multiple mortality events over a two-year period (Lawson *et al.*, 2012; Neimanis *et al.*, 2010;). In 2007 and 2008, multiple outbreaks of trichomoniasis were identified in Canada involving purple finches (*Carpodacus purpureus*) and goldfinches (*Carduelis tristis*) (Forzan *et al.*, 2010).

Trichomonosis epidemics in pigeons have been recorded since 1945, with morbidity and mortality involving thousands of individuals, often in winter or during spring migration (Cole, 1999; Stabler and Braun, 1979; Stromberg *et al.*, 2008; USGS, 2013). In this context, the objective of this study was to evaluate the presence of *T. gallinae* in passerines received at the Wild Fauna Rehabilitation Center (NURFS) of the Federal University of Pelotas (UFPel) during the months of March to October 2021.

METHODOLOGY

We analyzed 300 samples of adult birds of the Passerine order, received at the Wild Fauna Rehabilitation Center (NURFS) of Federal University of Pelotas (UFPel), municipality of Capão do Leão, Pelotas, State of Rio Grande do Sul. Samples were collected between March and October 2021, of which thirteen samples were collected in summer, eighty-seven in autumn, one hundred and sixty-eight in winter, and thirty-two in spring (Table 1). All sample collection procedures were performed in strict accordance with the recommendations of SISBIO 78754-3 and Comissão de Ética em Experimentação Animal 160/2021.

Initially, the animals underwent clinical evaluation, any clinical sign observed during the evaluation was recorded in an individualized form. To collect the swab from the oropharynx, the birds were physically restrained, the beak was opened and a swab was introduced into the oropharynx, the material was immediately placed in a falcon tube containing Trypticase-Yeast Extract-Maltose (TYM) culture medium, content 10 % inactivated bovine serum, antibiotic (streptomycin) and antifungal

(amphotericin) at pH 7.2 (Diamond, 1957); which was kept at a temperature of 37 °C in a water bath until sent to the laboratory (Sansano *et al.*, 2009). The animals that presented lesions in the oral cavity and the samples considered inconclusive at the time of reading, which presented a structure similar to *T. gallinae*, were submitted to PCR, totaling 25 samples.

Laboratory evaluation:

After collection, the material was sent to the Laboratory of Protozoology and Entomology (LAPEn), where the falcon tubes with the culture medium and the oropharyngeal samples were placed in a bacteriological growth oven at 37°C. Reading was performed 24 and 48 hours after collection. The tubes were centrifuged at 1500 rpm for 10 min and then an aliquot of the sediment was analyzed under an optical microscope at 40x magnification on a wet mounting slide which was made in triplicate and the reading was performed in the entire area where contained a sample and the result was recorded by the presence or absence of trophozoite, being positive for presence and negative for absence (Seddiek *et al.*, 2014).

Twenty-five samples were chosen where the result of the parasitological reading under the microscope was not sure, the medium was centrifuged to separate the aliquot of the parasite and later exchange of the culture medium to keep it in freezing and continue with the DNA separation to perform the PCR.

To confirm the identity of *T. gallinae*, DNA was extracted from 300 µL of the culture, using Brazol® reagent (Invitrogen, UK), according to the manufacturer's instructions, and diluted in 100 µL of endonuclease-free water. The concentration of the extracted DNA was quantified by reading in a spectrophotometer (NanoDrop Lite) with an absorbance of 260 nm. The extracted DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized using UV transillumination. DNA sample, ITS rDNA, (370 bp) and using oligonucleotide sequences TFR 1 (5'-TGCTTCAGCTCAGCGGGTCTTCC-3') and TFR 2 (5'-CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG-3') were amplified by conventional PCR using ITS1F and ITS1R primers. The PCR reaction was performed in a final volume of 25 µL containing 0.5 µM of each primer, 0.8 mM of dNTP, 2.0 mM of MgCl₂, 2.5 U of Taq

DNA Polymerase (Ludwig Biotecnologia Ltda, RS , Brazil) and 100-150 ng of the DNA template. DNA amplification consisted of a denaturation step carried out at 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 60 seconds, 56°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, and an extension final at 72°C for 10 min. Positive and negative control reactions were included in the assay. The amplicons were analyzed by agarose gel electrophoresis (2%) and visualized by ethidium bromide staining to confirm their specificity and size.

RESULTS AND DISCUSSION

T. gallinae is the only species of the order Trichomonadida with a clear pathogenic potential for birds (Bondurant and Honigberg 1994; Amin *et al.*, 2014). Direct contact transmission appears to be the most efficient route to establish an infection, for example, through food, or during feeding of infected parent birds to chicks (Stabler 1954). In this study, 300 birds of 23 species of Passeriformes were analyzed, of these samples, 32 were collected in spring, 13 in summer, 87 in autumn and 168 in winter. It was expected to demonstrate that the passerines apprehended and taken to the Wild Fauna Rehabilitation Center (NURFS) of the Federal University of Pelotas (UFPel), were carriers of the protozoan *Trichomonas gallinae* and a potential reservoir for co-infection in birds of prey, being important for monitoring the biological cycle of this protozoan. However, the evaluated birds were not positive for the protozoan.

The literature describes that most sick birds are adults (Girard, 2014; Begum *et al.*, 2008; Jaafar, 2014; Fadhil, 2019). In contrast, in the study carried out by Eman (2005) and Al-Sadi and Hamodi (2011), the highest frequency of positive animals was in young pigeons. Regarding seasonality, Fadhil (2019) reports a higher incidence of the protozoan in spring compared to winter. In spring, the highest transmission is due to mating, in spring and summer, parental transmission is greater by feeding, and by the decrease in food amounts. Stress, nutritional deficiency, efforts and strains in the search for food may also be added, as well as changes of all kinds, which make birds more susceptible to the presentation of the parasite and the disease (Villanúa *et al.*, 2006). The animals evaluated in our study were adult birds from illegal wildlife

trafficking. Most of the evaluated birds arrived in the winter period, followed by autumn, periods in which there is a shortage of food. It is also important to point out that our study was carried out between the months of March and October, it was not possible to collect birds in all of some seasons such as summer and spring, which is why our data differ a little from the reports in the bibliography such as those reported by Fadhil, 2019, where the highest incidence of the protozoan was in spring and summer.

It is important to note that some of the evaluated species are migratory birds, such as *Tachycineta leucorrhoa*, *Sporophila palustris*, *Sporophila caerulescens*, *Saltator aurantiirostris*, *Turdus rufiventris*, *Sicalis luteola* e *Molothrus bonariensis* (Timm and Timm, 2021). These habits are presented at the beginning of winter, when they look for warmer weather and greater possibilities of food, or it coincides with the breeding season. This migratory habit favors the spread of microorganisms that may not be occurring in a given region (Timm and Timm, 2021; Ramos and González, 2014).

As can be seen, most birds in our study have similar eating habits, such as eating seeds and fruits, and some being insectivores (Timm and Timm, 2021). The shared consumption of fruits and seeds could favor contamination in the case of an infected bird. Most of the evaluated birds inhabit rural areas. Birds living in urban areas could be more exposed to the agent, since in most cities there are a large number of pigeons (*Columbia livia*). The importance of the prevention and surveillance of this disease is due to the presence of pigeons worldwide, only not being found in the poles. Pigeons are the main hosts of *Trichomonas spp.*, the transmission of these birds to others of different species and families is easy, harming the world fauna, as already evidenced by the outbreak that occurred in Europe in 2005, which caused a mortality of 35% of the passerine population. Or the outbreak that happened in North America in 2012, with the collar and flock pigeons.

Of the animals evaluated, four samples came from animals that presented lesions in the clinical examination, but negative to the microscopic test and negative to the PCR. Trichomoniasis is characterized by lesions with a caseous appearance that can be located in the oral cavity, pharynx and esophagus (Krone; Cooper, 2002). Occasionally the lesions may involve the ear canal, larynx and respiratory tract

(Krone; Cooper, 2002). Tracheal and air sac injuries have also been described (Stabler, 1954). The severity of the disease depends on the susceptibility of the infected birds together with the pathogenic potential of the incriminated strain and the stage of infection (Cooper and Petty 1988; Cole and Friend , 1999).

The diagnosis of trichomonosis is often complicated by the fragility of the parasite. To ensure valid test results, it is essential to collect and handle samples correctly, avoiding pre-analytical errors. Culture tests, parasite-specific amplification, or a combination of both test methods is the most efficient and the most commonly used way to diagnose trichomonosis in animals (Collántes-Fernandez, 2018). In birds the use of culture for the detection of trichomonas is clearly superior in sensitivity as compared to direct microscopy (Cooper and Petty, 1988; Bunbury *et al.*, 2005). In our study, the lack of positive results in the microscopic examination and subsequent PCR may be due to the climate, since most of the samples were collected in winter, which makes it difficult for the protozoan to appear. It would also be important to perform PCR on all study samples in order to reduce false negative reading errors and be sure of this result.

CONCLUSION

In our study, no positive samples were found. However, monitoring *T. gallinae* in passerines and other orders of birds other than columbiformes or raptors is essential given the high probability of transmission, in addition to the high losses that may occur to the fauna.

ACKNOWLEDGMENTS

I thank the NURFS / CETAS team for their help in collecting Passeriformes, and the staff at the LAPEn laboratory for their help in reading the samples.

This study was supported by the Bolsas Brasil Program – PAEC OEA/GCUB, Public Notice OEA/GCUB n' 001/2019, within the scope of the Cooperation Agreement between the Organization of American States (OAS) and the Coimbra Group of Brazilian Universities (CGUB), concluded on May 20, 2011.

REFERENCES

- Al-Sadi, H.I., Hamodi, A. Z. (2011). Prevalence and pathology of trichomoniasis in free - living urban pigeons in the city of Mosul, Iraq. *Veterinary World*. 4(1), 12–14.
- Altizer, S., Bartel, R., Han, B. A. (2011). Animal migration and infectious disease risk. Carmel Valley, California, Winter 2006–2007. *Wilson Journal Ornithology*. 120, 603–606.
- Amin, A., Bilic, I., Liebhart, D., Hess, M. (2014). Trichomonads in birds - a review. *Parasitology*. 141 (6), 733–47.
- André Jean Pierre. (2005). Chapter 19 Maladies parasitaires. *Guide pratique de maladies de oiseaux de cages et de volieres*. Editions Med' Com. Paris. 184 – 197.
- Begum, N., Mamun, M. A. A., Rahman, S. A., Bari, A. S. M. (2008). Epidemiology and pathology of *Trichomonas gallinae* in the common pigeon (*Columba livia*). *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 6(1), 301-306.
- Bunbury, N., Jones, C.G., Greenwood, A.G., Bell, D.J. (2005). *Trichomonas gallinae* in Mauritian columbids: implications for an endangered endemic. *Journal of Wildlife Diseases*. 43, 399–407.
- Chi Jean F., Lawson Becki, Durrant Chris, Beckmann Katie, John Shinto, Alrefaei Abdulwahed F., Kirkbride Kim, Bell Diana J., Cunningham Andrew A., Tyler Kevin M. (2013). The finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae* is predominant in British non-passerines. *Parasitology*. Cambridge University. Page 1-12.

- Cole, R., Friend, M. (1999). Trichomoniasis. *Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds*. Chapter 25, Trichomoniasis. In: Friend M., Franson J. C., editors. Washington, DC. USGS-National Wildlife Health Center. p. 201–206.
- Collántes-Fernández Esther, Fort Marcelo C., Ortega-Mora Luis M., Schares Gereon. (2018). Trichomonas. In: Florin-Christensen M., Schnittger L. *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Springer International Publishing. Page 313 – 188.
- Cooper, J. E., Petty, S. J. (1988). Trichomoniasis in free-living goshawks (*Accipiter gentilis gentilis*) from Great Britain. *Journal Wildlife Diseases*. 24(1), 80–7.
- Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology*, v. 43, n. 3, p. 488-490.
- Eman, M. A. E. (2005). Some studies on trichomoniasis in pigeons in Sharkia province. M.V.Sc. Thesis, Zagazig. *University, Egypt*. pp155.
- Fadhil, L. T., Faraj, A. A. (2019). Survey of *Trichomonas gallinae* isolates in pigeons by microscopy and PCR. *Journal of Veterinary Research*. Volume 23, (4), 321-329.
- Forzan, M. J., Vanderstichel, R., Melekhovets, Y. F., Mcburney, S. (2010). Trichomoniasis in finches from the Canadian Maritime provinces – an emerging disease. *Canine Veterinary Journal*. 51, 391–396.
- Girard, Y. A., Rogers, K. H., Woods, L. W., Chouicha, N., Miller, W. A., Johnson, C. K. (2014). Dual-pathogen etiology of avian trichomonosis in a declining band-tailed pigeon population. *Infection Genetics and Evolution*. 24, 146–156.

- Grave, J. H. (1996). Gastrointestinal parasites. In: Roskopf, W., Woerpel, R. *Diseases of cage and aviary birds*. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkings. cap. 47, p. 613-619.
- Jaafar, H. E. (2014). Prevalence of some epidemiological study of *Trichomonas gallinae* in domestic pigeons in Baghdad. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. 38, 1-4.
- Krone, O., Cooper, J. E. (2002). Parasitic diseases. In: Cooper, J. E. *Birds of preys: health & disease*. 2. edition. Oxford: Blackweel Science. cap. 7, p 105-120.
- Lawson Becki, Robinson Robert A., Colvile Katie, M., Peck Kirsi, M., Chantrey Julian, Pennycott Tom W., Simpson Victor R., Toms Mike P., Cunningham Andrew A. (2012). The emergence and spread of finch trichomonosis in the British Isles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 367, 2852–2863.
- Lloyd, S. (1995). Environmental influences on host immunity. In: Grenfell, B.T., Dobson, A.P. (Eds.), *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 327–361.
- Neimanis, A.S., Handeland, K., Isomursu, M., Agren, E., Mattsson, R., Hamnes, I.S., Bergsjo, B., Hirvela-Koski, V. (2010). First report of epizootic trichomoniasis in wild finches (family Fringillidae) in southern Fennoscandia. *Avian Disease*. 54, 136– 141.
- Ramos Melo, J. J. y González del Campo, P. (2014). Cambio climático y migración de aves en la región de Souss Massa Drâa e Islas Canarias. *Instituto Tecnológico de Canarias (ITC)*. 82 pp.
- Robinson, R. A., Lawson, B., Toms, M. P., Peck, K. M., Kirkwood, J. K., Chantrey, J., Clatworthy, I. R., Evans, A. D., Hughes, L. A., Hutchinson, O. C., John, S. K., Pennycott, T. W., Perkins, M. W., Rowley, P. S., Simpson, V. R., Tyler, K. M.,

- Cunningham, A. A. (2010). Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds. *PLoS ONE* 55, e12215.
- Sansano-Maestre, J., Garijo-Toledo, M. M., & Gómez-Muñoz, M. T. (2009). Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. *Avian Pathology*. 38:3, 201-207
- Seddiek, A. *et al.* (2014). The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. *Parasitology Research*, v. 113, n. 4, p. 1319-1329.
- Stabler R. M. (1954). *Trichomonas gallinae*: a review. *Experimental Parasitology*. 3(4), 368–402.
- Stabler, R.M., Braun, C.E. (1979). Effects of a California-derived strain of *Trichomonas gallinae* on Colorado band-tailed pigeons. *California Fish and Game*. 65, 56–58.
- Stromberg, M. R., Koenig, W. D., Walters, E. L., Schweisinger, J. (2008). Estimate of *Trichomonas gallinae*-induced mortality in band-tailed pigeons. *Upper Science*. 331, 296–302.
- Timm, C. D., Timm, V. F. (2021). Avifauna gaúcha: guia de identificação. *USEB*. 408
- United States Geological Survey (USGS). (2013). National Wildlife Health Center Quarterly Mortality Reports: http://www.nwhc.usgs.gov/publications/quarterly_reports/. Accessed Sep 02, 2021.
- Villanúa, D., Hofle, U., Perez-Rodriguez, L., Cortazar, C. (2006). *Trichomonas gallinae* in wintering common wood pigeons *Columba palumbus* in Spain. *Lbis*. 148, 641-648.

Zadravec, M., Marhold, C., Slavec, B., Rojs, O. Z., Racnik, J. (2012). Trichomonosis in finches in Slovenia. *Veterinary Record*. 171, 253–254.

Table 1. Passerines species evaluated during the months of March to October of the year 2021.

Species	No. tested (n/%)	Migratory habit	Hábitat	Food	Prevalence (%)
<i>Paroaria coronata</i>	66	No	Rural	Seeds and arthropods	22
<i>Cyanocompsa brissonii</i>	51	No	Rural	Seeds, fruits and insects	17
<i>Sicalis flaveola</i>	39	No	Rural	Seeds	13
<i>Saltator similis</i>	34	No	Rural and urban	Omnivorous	11.3
<i>Saltator aurantiirostris</i>	25	Yes	Rural and urban	Fruits and seeds	8.4
<i>Cacicus haemorrhous</i>	21	No	Rural	Omnivorous	7
<i>Sporophila caerulescens</i>	20	Yes	Rural and urban	Seeds and grasses	6.8
<i>Stephanophorus diadematus</i>	7	No	Rural	Fruits	2.3
<i>Coryphospingus pileatus</i>	7	No	Rural	Seeds, insects, arthropods and fruits	2.3
<i>Sporophila collaris</i>	5	No	Rural	Seeds	1.8

<i>Pitangus sulphuratus</i>	4	No	Rural and urban	Insects, fruits, carnivore, arachnid	1.3
<i>Spinus magellanicus</i>	4	No	Rural and urban	Seeds	1.3
<i>Saltator fuliginosus</i>	3	No	Rural	Fruits and seeds	1
<i>Zonotrichia capensis</i>	3	No	Urban	Fruits, insects and seeds	1
<i>Tachycineta leucorrhoa</i>	2	Yes	Rural	Insects	0.7
<i>Sicalis luteola</i>	2	Yes	Rural and urban	Seeds	0.7
<i>Sporophila palustres</i>	1	Yes	Rural	Seeds	0.3
<i>Amblyramphus holosericeus</i>	1	No	Rural	Seeds, arthropods, fruits	0.3
<i>Cyclarhis gujanensis</i>	1	No	Urban	invertebrates, carnivore	0.3
<i>Sturnella superciliaris</i>	1	No	Rural and urban	Larvae, insects and seeds	0.3
<i>Turdus rufiventris</i>	1	Yes	Urban	Larvae, insects, invertebrates, fruit and dog food	0.3

<i>Tangaragona sayaca</i>	1	No	Rural	Fruits, berries and insects	0.3
<i>Molothrus bonariensis</i>	1	Yes	Rural and urban	Omnivorous	0.3
Total	300				100

2.2 Artigo 2

Infection caused by *Trichomonas spp* (Ordem: Trichomonadida) im red-breasted-Tucan (*Ramphastos dicolorus*)

Jenny Paola Hidalgo Martínez, Alexia Brauner de Mello, Marjorie de Giacometi, Rodrigo Casquero Cunha, Mauro P Soares, Camila Belmonte Oliveira, Raqueli Teresinha França

Será submetido à revista Research, Avian Pathology

3 Considerações Finais

As formas de transmissão do *T. gallinae* favorecem o aparecimento de tricomoníase em muitas espécies não columbiformes, como os passeriformes e piciformes apresentados nesta dissertação. Essas aves podem servir como reservatório para a coinfeção em aves de rapina, sendo importante para vigilância do ciclo biológico desse protozoário, uma vez que são aves que fazem migração. Ressalta-se a importância de monitorar esse protozoário em outras aves silvestres, evitando perdas importantes para a fauna brasileira, conforme já foi descrito em outros países.

No relato do caso positivo em Tucano-de-bico-verde, sugere-se que o filhote possa ter se infectado com *T. gallinae* ao ser alimentado pela mãe. Além disso, os indivíduos jovens são mais susceptíveis ao parasita, devido ao status imunológico, nutrição, estresse, desgastes e mudas, além da patogenicidade do isolado.

Refêrencias

- AL-SADI, H.I., HAMODI, A. Z. Prevalence and pathology of trichomoniasis in free living urban pigeons in the city of Mosul, Iraq. **Veterinary World**. 4(1), 12–14. 2011.
- ALTIZER, S., BARTEL, R., HAN, B. A. Animal migration and infectious disease risk. Carmel Valley, California, Winter 2006–2007. **Wilson Journal Ornithology**. 120, 603–606. 2011.
- ALVARENGA, H. M. F. **Tucanos das Américas**. Rio de Janeiro: M. Pontual Edição e Arte. 2004.
- AMIN, A., LIEBHART, D., WEISSENBOCK, H., HESS, M. Experimental infection of turkeys and chickens with a clonal strain of *Tetratrichomonas gallinarum* induces a latent infection in the absence of clinical signs and lesions. **Journal of Comparative Pathology**. 144(1), 55–62. 2011.
- AMIN, A., BILIC I., BERGER, E., HESS, M. *Trichomonas gallinae*, in comparison to *Tetratrichomonas gallinarum*, induces distinctive cytopathogenic effects in tissue cultures. **Veterinary Parasitology**. 186 (3-4), 196–206. 2012a.
- AMIN, A., BILIC, I., LIEBHART, D., HESS, M. Trichomonads in birds - a review. **Parasitology**. 141 (6), 733–47. 2014.
- ANDERSON, N. L., GRAHN, R. A., VAN HOOSEAR, K., BONDURANT, R. H. Studies of trichomonad protozoa in free ranging songbirds: prevalence of *Trichomonas gallinae* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and corvids and a novel trichomonad in mockingbirds (*Mimus polyglottos*). **Veterinary Parasitology**. 161, 178–186. 2009.
- ANDRE JEAN PIERRE. Chapter 19 Maladies parasitaires. **Guide pratique de maladies de oiseaux de cages et de volieres**. Editions Med' Com. Paris. 184 –197. 2005.
- BEGUM, N., MAMUN, M. A. A., RAHMAN, S. A., BARI, A. S. M. Epidemiology and pathology of *Trichomonas gallinae* in the common pigeon (*Columba livia*). **Journal of the Bangladesh Agricultural University**. 6(1), 301-306. 2008.
- BUNBURY, N., JONES, C.G., GREENWOOD, A.G., BELL, D.J. *Trichomonas gallinae* in Mauritian columbids: implications for an endangered endemic. **Journal of Wildlife Diseases**. 43, 399–407. 2005.
- CALNEK. **Enfermedades de las aves**. Editorial Manual Moderno, México DF. 1995.
- CHI JEAN F., LAWSON BECKI, DURRANT CHRIS, BECKMANN KATIE, JOHN SHINTO, ALREFAEI ABDULWAHED F., KIRKBRIDE KIM, BELL DIANA J., CUNNINGHAM ANDREW A., TYLER KEVIN M. The finch epidemic strain of

Trichomonas gallinae is predominant in British non-passerines. **Parasitology**. Cambridge University. Page 1-12. 2013.

COLE, R., FRIEND, M. Trichomoniasis. **Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds**. Chapter 25, Trichomoniasis. In: Friend M., Franson J. C., editors. Washington, DC. USGS-National Wildlife Health Center. p. 201–206. 1999.

COLLANTES-FERNANDEZ ESTHER, FORT MARCELO C., ORTEGA-MORA LUIS M., SCHARES GEREON. Trichomonas. In: Florin-Christensen M., Schnittger L. **Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets**. Springer International Publishing. Page 313 – 188. 2018.

COOPER, J. E., PETTY, S. J. Trichomoniasis in free-living goshawks (*Accipiter gentilis gentilis*) from Great Britain. **Journal Wildlife Diseases**. 24(1), 80–7. 1988.

DE CARLI G. A., TASCA, T. *Trichomonas gallinae*: a possible contact-dependent mechanism in the hemolytic activity. **Veterinary Parasitology**. 106(4), 277–83. 2003.

DIAMOND, L. S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **The Journal of Parasitology**, v. 43, n. 3, p. 488-490. 1957.

ECCO, R., PREIS, I. S., VILELA, D. A., LUPPI, M. M., MALTA, M. C., BECKSTEAD, R. B., STIMMELMAYR, R., GERHOLD, R.W. Molecular confirmation of *Trichomonas gallinae* and other parabasalids froms Brazil using the 5.8S and ITS-1 rRNA regions. **Veterinary Parasitology**, Volume 190, Issues 1–2, Pages 36-42. 2012.

ECHENIQUE, J. V. Z., SOARES, M. P., BRUNI, M., FARIAS, N. A., MORETTI, V. D., BANDARA, P. M., ALBANO, A. P. N., SCHILD, A. L. Oral trichomoniasis in raptors in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 39(12), 983-988. 2019.

ECKELBERRY, D. R. A note on the toucans of northern Argentina. **The Wilson Bulletin**. 76 (1) 5. 1964.

EMAN, M. A. E. Some studies on trichomoniasis in pigeons in Sharkia province. M.V.Sc. Thesis, Zagazig. **University, Egypt**. pp155. 2005.

FADHIL, L. T., FARAJ, A. A. Survey of *Trichomonas gallinae* isolates in pigeons by microscopy and PCR. **Journal of Veterinary Research**. Volume 23, (4), 321-329. 2019.

FELLEISEN, R. S. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. **Parasitology**. 115(2), 111-119. 1997.

FORRESTER, D. J., FOSTER, G. W. Trichomonosis. *In*: Atkinson, C.T., Thomas, N.J. & Hunter, D.B. (Eds.), **Parasitic Diseases of Wild Birds**. 1^a Edition, Oxford, UK: Wiley-Blackwell. pp.120-153. 2009.

FORZAN, M. J., VANDERSTICHEL, R., MELEKHOVETS, Y. F., MCBURNEY, S. Trichomoniasis in finches from the Canadian Maritime provinces – an emerging disease. **Canine Veterinary Journal**. 51, 391–396. 2010.

GANAS PETRA, JASKULSKA BARBARA, LAWSON BECKI, ZADRAVEC MARKO, HESS MICHAEL, BILIC IVANA. Multi-locus sequence typing confirms the clonality of *Trichomonas gallinae* isolates circulating in European finches. **Parasitology**. Cambridge University Press. 1-10. 2013.

GASPAR DA SILVA, D., BARTON, E., BUNBURY, N., LUNNESS, P., BELL, D. J., TYLER, K.M. Molecular identity and heterogeneity of trichomonad parasites in a closed avian population. **Infection Genetics and Evolution**. 7(4), 433–40. 2007.

GERHOLD, R.W., YABSLEY, M.J., SMITH, A.J., OSTERGAARD, E., MANNA, W., CANN, J.D., FISCHER, J.R. Molecular characterization of the *Trichomonas gallinae* morphologic complex in the United States. **Journal of Parasitology**. 94, 1335–1341. 2008.

GIRARD, Y. A., ROGERS, K. H., GERHOLD, R., LAND, K. M., LENAGHAN, S. C., WOODS, L. W., HABERKERN, N., HOPPER, M., CANN, J. D., JOHNSON, C. K. *Trichomonas stablerin*. sp., an agent of trichomonosis in Pacific Coast band-tailed pigeons (*Patagioenas fasciata monilis*). **International Journal for Parasitology, Parasites and Wildlife**. 3(1), 32–40. 2013.

GIRARD, Y. A., ROGERS, K. H., WOODS, L. W., CHOUICHA, N., MILLER, W. A., JOHNSON, C. K. Dual-pathogen etiology of avian trichomonosis in a declining band-tailed pigeon population. **Infection Genetics and Evolution**. 24, 146–156. 2014.

GIRONÉS BARBERO, ELENA. Tricomoniasis. relevancia clínico-patológica en aves silvestres del centro de recuperación de La Alfranca. **Facultad de Veterinaria Universidad de Zaragoza**. 1-35. 2016.

GRAVE, J. H. Gastrointestinal parasites. *In*: Roskopf, W., Woerpel, R. **Diseases of cage and aviary birds**. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkings. cap. 47, p. 613-619. 1996.

HOYO, J., A. ELLIOTE, J. SARGATAL. **Handbook of the birds of theWorld**. Lynx. Edicions. Barcelona. vol. 7. Jacamars to Woodpeckers. 2002.

JAAFAR, H. E. Prevalence of some epidemiological study of *Trichomonas gallinae* in domestic pigeons in Baghdad. **The Iraqi Journal of Veterinary Medicine**. 38, 1-4. 2014.

KRONE, O., COOPER, J. E. Parasitic diseases. In: Cooper, J. E. **Birds of preys: health & disease**. 2. edition. Oxford: Blackweel Science. cap. 7, p 105-120. 2002.

LAWSON BECKI, ROBINSON ROBERT A., COLVILE KATIE, M., PECK KIRSI, M., CHANTREY JULIAN, PENNYCOTT TOM W., SIMPSON VICTOR R., TOMS MIKE P., CUNNINGHAM ANDREW A. The emergence and spread of finch trichomonosis in the British Isles. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. 367, 2852–2863. 2012.

LIEBHART, D., WEISSENBOCK, H., HESS, M. In-situ hybridization for the detection and identification of *Histomonas meleagridis* in tissues. **Journal Comparative Pathology**. 135(4), 237–42. 2006.

LLOYD, S. Environmental influences on host immunity. In: Grenfell, B.T., Dobson, A.P. (Eds.), **Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 327–361. 1995.

MOSTEGL, M. M., WETSCHER, A., RICHTER, B., NEDOROST, N., DINHOPL, N., WEISSENBOCK, H. Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic in situ hybridization. **Veterinary Parasitology**. 183(3-4), 209–14. 2012.

MEHLHORN, H., AL-QURAI SHY, S., AZIZA, A., HESS, M. Fine structure of the bird parasites *Trichomonas gallinae* and *Tetratrachomonas gallinarum* from cultures. **Parasitology Research**. 105(3), 751–6. 2009.

NARCISI, E. M., SEVOIAN, M., HONIGBERG, B. M. Pathologic changes in pigeons infected with a virulent *Trichomonas gallinae* strain (Eiberg). **Avian Diseases**. 35(1), 55–61. 1991.

NEIMANIS, A.S., HANDELAND, K., ISOMURSU, M., AGREN, E., MATTSSON, R., HAMNES, I.S., BERGSJO, B., HIRVELA-KOSKI, V. First report of epizootic trichomoniasis in wild finches (family Fringillidae) in southern Fennoscandia. **Avian Disease**. 54, 136– 141. 2010.

NWHC. 1983–2006. Epizootic Files. **United States Geological Survey, National Wildlife Health Center**, Madison, WI, USA. 2002.

PENNYCOTT, T. W., LAWSON, B., CUNNINGHAM, A. A., SIMPSON, V., CHANTREY, J. Necrotic ingluvitis in wild finches. **Veterinary Record**. 157(12), 360. 2005.

RHYAN, J. C., WILSON, K.L., BURGESS, D. E., STACKHOUSE, L. L, QUINN, W. J. Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 7(1), 98–101. 1995.

RAMOS MELO, J. J. Y GONZÁLEZ DEL CAMPO, P. Cambio climático y migración de aves en la región de Souss Massa Drâa e Islas Canarias. **Instituto Tecnológico de Canarias (ITC)**. 82 pp. 2014.

ROBINSON, R. A., LAWSON, B., TOMS, M. P., PECK, K. M., KIRKWOOD, J. K., CHANTREY, J., CLATWORTHY, I. R., EVANS, A. D., HUGHES, L. A., HUTCHINSON, O. C., JOHN, S. K., PENNYCOTT, T. W., PERKINS, M. W., ROWLEY, P. S., SIMPSON, V. R., TYLER, K. M., CUNNINGHAM, A. A. Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds. **PLoS ONE** **55**, e12215. 2010.

QUILLFELDT, P., SCHUMM, Y. R., MAREK, C., MADER, V., FISCHER, D., MARXM. Prevalence and genotyping of *Trichomonas* infections in wild birds in central Germany. **PLOS ONE** **13**(8), e0200798. 2018.

SAMOUR, J. H., BAILEY, T. A., COOPER, J. E. Trichomoniasis in birds of prey (Order Falconiformes) in Bahrain. **Veterinary Record**. v.136, p. 358-362. 1995.

SANSANO-MAESTRE, J., GARIJO-TOLEDO, M. M., & GÓMEZ-MUÑOZ, M. T. Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. **Avian Pathology**. **38**:3, 201-207. 2009.

Seddiek, A. The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. **Parasitology Research**, v. 113, n. 4, p. 1319-1329. 2014.

SICK, H. Ornitologia brasileira. Edição Revisada e Ampliada por J. F. Pacheco. Rio de Janeiro, **Nova fronteira**. 1997.

STABLER R. M. *Trichomonas gallinae*: a review. **Experimental Parasitology**. **3**(4), 368–402. 1954.

STABLER, R.M., BRAUN, C.E. Effects of a California-derived strain of *Trichomonas gallinae* on Colorado band-tailed pigeons. **California Fish and Game**. **65**, 56–58. 1979.

STROMBERG, M. R., KOENIG, W. D., WALTERS, E. L., SCHWEISINGER, J. Estimate of *Trichomonas gallinae*-induced mortality in band-tailed pigeons. **Upper Science**. **331**, 296–302. 2008.

TIMM, C. D., TIMM, V. F. Avifauna gaúcha: guia de identificação. **USEB**. 408. 2021.

United States Geological Survey (USGS). National Wildlife Health Center Quarterly Mortality Reports: http://www.nwhc.usgs.gov/publications/quarterly_reports/. Accessed Sep 02, 2021. 2013.

VILLANÚA, D., HOFLE, U., PEREZ-RODRIGUEZ, L., CORTAZAR, C. *Trichomonas gallinae* in wintering common wood pigeons *Columba palumbus* in Spain. **Lbis**. 148, 641-648. 2006.

YAEGER, M. J., GOOKIN, J. L. Histologic features associated with *Tritrichomonas foetus*-induced colitis in domestic cats. **Veterinary Pathology**. 42(6), 797–804. 2005.

ZADRAVEC, M., MARHOLD, C., SLAVEC, B., ROJS, O. Z., RACNIK, J. Trichomonosis in finches in Slovenia. **Veterinary Record**. 171, 253–254. 2012.

Anexos

Anexo I - xxxx

02/05/22, 20:57

SEI/UFPel - 1541279 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

160/2021/CEUA/REITORIA
23110.013042/2021-00

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Construção de isoscapes multi-isotópicas de tecidos animais na região sul do Rio Grande do Sul”**, registrada com o nº 23110.013042/2021-00, sob a responsabilidade de **Raquel Teresinha França** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes no filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, em reunião de quatorze de dezembro de 2021.

Finalidade	(x) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	Início = 01/01/22	Término = 01/08/2023
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	78754-3	
Nº de animais	200	
Atividade (s)	- Coleta de amostras de passeriformes - Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ - Processamento de dados e construção de isoscapes - Preparação das amostras e análise laboratorial	
Espécie/Grupos Taxonômicos	Passeriformes	
Local (is)	Núcleo de Reabilitação de Fauna Silvestre e Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Pelotas (NURFS/CETAS - UFPel)	

Código para cadastro nº CEUA 013042/2021-00

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior/Adjunto**, em 16/12/2021, às 12:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orcao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1541279** e o código CRC **BBB2E007**.