UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Trichomonas gallinae* EM AVES SELVAGENS NO BRASIL

Amanda Garcia Pereira

Médica Veterinária

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Trichomonas gallinae* EM AVES SELVAGENS NO BRASIL

Amanda Garcia Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Karin Werther

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária

2024

P436d

Pereira, Amanda Garcia
Diversidade genética de Trichomonas gallinae em aves selvagens no Brasil / Amanda Garcia Pereira. -- Jaboticabal, 2024
123 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Karin Werther

1. Birds Diseases. 2. Veterinary parasitology. 3. Tricomoníase. 4. Passeriformes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Impacto potencial desta pesquisa

Duas espécies de tricomonadídeos são descritas em aves: *Trichomonas gallinae*, a qual tem grande importância na clínica de aves selvagens e acomete principalmente o trato digestório superior (orofaringe, esôfago e inglúvio) de diferentes espécies de aves; e *Tetratrichomonas gallinarum*, a qual ocorre no trato digestório inferior. Com o avanço das técnicas moleculares, inúmeros estudos vêm sendo realizados para avaliar a diversidade genética de tricomonadídeos em aves. A falta de estudos moleculares dificulta o entendimento da diversidade de genótipos e de espécies que circulam no país. O ensaio de PCR foi um dos métodos utilizados para identificar a positividade para *T. gallinae* em diferentes ordens de aves, e demonstrou ser a melhor ferramenta, para o diagnóstico e investigação epidemiológica da infecção por *T. gallinae.* A importância do estudo de *Trichomonas* assenta o fato de que a prevalência (total de casos existentes em um dado momento) e incidência (taxa de novos casos em um período especifico) desta patologia, estão aumentando em aves silvestres. O presente trabalho contribui para o entendimento da diversidade desse protozoário circulando em aves de diferentes ordens no país. Inclusive aves que fazem migração ressalta-se a importância de conhecer e monitorar esse protozoário em outras aves silvestres, evitando perdas importantes para a fauna brasileira.

Two species of trichomonads have been described in birds: *Trichomonas gallinae*, which is of great importance in the clinical treatment of wild birds and mainly affects the upper digestive tract (oropharynx, esophagus and ingulvium) of different bird species; and *Tetratrichomonas gallinarum*, which occurs in the lower digestive tract. With the advancement of molecular techniques, numerous studies have been carried out to evaluate the genetic diversity of trichomonads in birds. The lack of molecular studies makes it difficult to understand the diversity of genotypes and species that circulate in the country. The PCR assay was one of the methods used to identify positivity for *T. gallinae* in different orders of birds, and it proved to be the best tool for the diagnosis and epidemiological investigation of *T. gallinae* infection. The importance of studying *Trichomonas* is based on the fact that the prevalence (total number of cases at a given time) and incidence (rate of new cases in a specific period) of this pathology are increasing in wild birds. This study contributes to the understanding of the diversity of this protozoan circulating in birds of different orders in the country. Since

many are even migratory birds, it is important to understand and monitor this protozoan in other wild birds, avoiding significant losses to the Brazilian fauna.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Trichomonas gallinae* EM AVES SELVAGENS NO BRASIL

AUTORA: AMANDA GARCIA PEREIRA
ORIENTADORA: KARIN WERTHER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Medicina Veterinária, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KARIN WERTHER (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jabotic

Documento assinado digitalmente
gov.br KARIN WERTHER
Data: 26/08/2024 11:15:47-0300

Prof. Dr. JOÃO BATISTA DE PINHO (Participaçao Virtual)
Laboratório de Ecologia de Aves - Centro de Biodiversidade / IB Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) - Cuiabá/MT

Documento assinado digitalmente
gov.br JOAO BATISTA DE PINHO
Data: 29/08/2024 10:32:40-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCOS ROGERIO ANDRE
Data: 26/08/2024 11:53:55-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. JOÃO FABIO SOARES (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Clínica Veterinária / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Porto Alegre/RS

Documento assinado digitalmente
gov.br JOAO FABIO SOARES
Data: 27/08/2024 17:31:19-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br ROSANGELA ZACARIAS MACHADO
Data: 28/08/2024 14:56:58-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Jaboticabal, 23 de agosto de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Amanda Garcia Pereira, nascida em 26 de agosto de 1993, brasileira, natural da cidade de Franca, estado de São Paulo, Médica Veterinária, graduada pela Universidade de Franca - UNIFRAN, Franca, SP, em fevereiro de 2017. Foi bolsista de iniciação cientifica pela fundação de amparo à pesquisa de São Paulo (FAPESP) (processo número 15/22829-2) e Mestrado em Ciência Animal, com ênfase em oftalmologia pela mesma instituição (2020). Em 2021 tornou-se doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal – UNESP, com bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – CAPES. Teve auxílio FAPESP (processo número 2021/05961-5). Participa de eventos nacionais e internacionais de especialidades em Medicina Veterinária, publicando e apresentando trabalhos na área.

DEDICO esta dissertação à minha mãe e minha madrinha, mulheres guerreiras e de fibra que me ensinaram a sorrir e ter fé mesmo nos momentos de dor.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, assim como seus docentes e funcionários, pela estrutura e suporte para que esta pesquisa pudesse ser realizada e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado (Código Financeiro 001).

Ao suporte financeiro para a pesquisa processo nº 2021/05961-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A Deus pelo dom da vida, por me guiar e proteger.

A minha família, em especial minha mãe, Cíntia Valéria Garcia, e minha madrinha, Ana Paula Garcia, por acreditarem na educação, me dando todo apoio necessário. E por serem os maiores exemplos de vida e pessoas lutadoras, que eu admiro e amo muito.

Aos meus sobrinhos Arthur e Manuela, por toda alegria que me dão, por todo amor incondicional que tenho por vocês.

Agradeço aos membros da banca, por todo o carinho e atenção dedicados à leitura e às considerações feitas neste trabalho.

A professora doutora Karin Werther pela orientação e oportunidades de realizar esse projeto e de crescer na Patologia de Animais Silvestres. As suas críticas construtivas e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso.

A todos os funcionários, residentes, professores do departamento de patologia e amigos do doutorado, em especial a Ana Cláudia Calchi, pelos ensinamentos, conselhos, orientações e sobretudo pelo apoio, amizade e incentivo.

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

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA iii
CERTIFICADO DO SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE - SISBIO iii
RESUMO iii
ABSTRACT iii
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais 16
Introdução 16
Revisão bibliográfica 17
REFERÊNCIAS 20
CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Trichomonas gallinae* EM AVES SINANTRÓPICAS DE SÃO PAULO 24
INTRODUÇÃO 26
MATERIAL E MÉTODOS 28
Cultivo de *Trichomonas* spp. 29
Citologia dos esfregaços de suabes orofaríngeos 31
Reação de amplificação para o gene endógeno *β actina* aviária 31
Ensaios de PCR para *Trichomonas* spp. 32
Eletroforese de DNA em gel de agarose 34
Sequenciamento e análise pelo BLASTn 34
Análise filogenética 35
Análise de diversidade e rede de genótipos 35
RESULTADOS 35
Espécies de aves amostradas 35
Cultivo de *Trichomonas* spp. 38
Citologia dos esfregaços de suabes orofaríngeos 39
Extração do DNA e PCR para gene endógeno 40
PCR e análise das sequências das regiões ITS1/5.8S/ITS2 de *Trichomonas* spp. 41
PCR e análise das sequências do gene *Fe hidrogenase* de *Trichomonas* spp. 44
PCR e análise das sequências do gene 18S rRNA de *Trichomonas* spp. 48
Discussão 50
CONCLUSÃO 55
REFERÊNCIAS 56
CAPITULO 3 – Detecção e caracterização molecular de *Trichomonas* spp. em aves selvagens no Pantanal brasileiro 66
RESUMO 66
INTRODUÇÃO 68
MATERIAL E MÉTODOS 69

Área de estudo e aves capturadas 69
ESPÉCIES DE AVES AMOSTRADAS 70
Extração do DNA e PCR para gene endógeno 72
REAÇÃO DE AMPLIFICAÇAO PARA O GENE ENDÓGENO ACTB (*B ACTINA*) 72
TRIAGEM PARA *Trichomonas* spp. 73
CARACTERIZAÇÃO PARA *Trichomonas* spp. 73
ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE 75
SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE PELO BLASTN 76
ANÁLISE FILOGENÉTICA 76
ANÁLISE DE DIVERSIDADE E REDE DE GENÓTIPOS 77
RESULTADOS 77
DISCUSSÃO 81
CONCLUSÃO 83
REFERÊNCIAS 84
CAPÍTULO 4 – Considerações Finais 89
APÊNDICES 90
APÊNDICE A – Material suplementar ao capítulo II 90
APÊNDICE B – Material suplementar ao capítulo II 111

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Trichomonose em aves selvagens – aspectos etiológicos, moleculares e histopatológicos"**, protocolo nº 732/21, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Karin Werther, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 01 de abril de 2021.

Vigência do Projeto	01/04/2021 a 01/12/2023
Espécie / Linhagem	Aves Selvagens
Nº de animais	Variado
Peso / Idade	Variado
Sexo	Ambos (macho e fêmea)
Origem	Cativeiro (Zoológico, CRAS, CETAS, clínica veterinária)

Jaboticabal, 12 de abril de 2021.

Fabiana Pilarski

Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 7100 - www.fcavunesp.br

CERTIFICADO 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: 77538-1	Data da Emissão: 28/05/2021 14:06:27	Data da Revalidação*: 28/05/2022
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.		

SISBIO

Dados do titular

Nome: AMANDA GARCIA PEREIRA	CPF: 424.136.898-00
Título do Projeto: Trichomonose em aves selvagens ? aspectos etiológicos, moleculares e histopatológicos	
Nome da Instituição: UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta de suabe de mucosa gastroenterica	05/2021	07/2023
2	processamento laboratorial	03/2022	09/2022

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Alan Fecchio	ajudar nas coletas	033.149.189-33	Brasileira
2	JOAO BATISTA DE PINHO	ajudar nas coletas	177.363.231-00	Brasileira
3	karin werther	processamento de dados	532.920.309-00	Brasileira

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Trichomonas gallinae* EM AVES SELVAGENS NO BRASIL

RESUMO - A tricomonose aviária causada pelo protozoário *Trichomonas gallinae* é uma doença que afeta, sobretudo, o trato digestório superior das aves. Os principais hospedeiros naturais deste agente são as aves da ordem Columbiformes, Falconiformes e Strigiformes. As lesões orais, obstruindo os tratos digestórios e respiratórios superiores dificultam a alimentação e respiração e, frequentemente, causam a morte por fome, desidratação e asfixia/apneia. O estudo mais detalhado da tricomonose em aves se justifica visto que a patogenicidade do agente etiológico é variada. O objetivo do estudo foi investigar a ocorrência e diversidade genética de tricomonadídeos em diferentes espécies de aves selvagens no Brasil, a fim de investigar a possível associação entre genótipo do parasito, espécie de ave e presença ou ausência de lesões características da tricomonose aviária. Para tal, foram analisadas amostras biológicas de aves de vida-livre e de cativeiro pertencentes a grupos taxonômicos das ordens Accipritiformes, Anseriformes, Columbiformes, Falconiformes, Gruiformes, Passeriformes, Pisciformes, Psittaciformes, Strigiformes. Foram analisadas amostras de suabes orofaríngeos de aves vivas provenientes de cativeiro (zoológicos, clínicas veterinárias e centros de triagem) e de vida livre, assim como de aves mortas encaminhadas para necropsia. Das aves vivas de cativeiro foram colhidas amostras de suabe da mucosa de orofaringe e de inglúvio destinados para cultura em meio Diamond e para ensaios moleculares para tricomonadídeos a partir de prévia extração de DNA. Das aves vivas capturadas no Pantanal foram colhidas suabes de mucosa orofaringe utilizadas apenas para técnica molecular (PCR). Os ensaios moleculares tiveram como alvos fragmentos da região intergênica ITS1-5.8S-ITS-2, gene *Fe-hidrogenase* e 18S rRNA. As sequências obtidas foram submetidas a análises filogenéticas e de diversidade genotípica. Em conclusão, ITS-1/5.8S/ITS-2 parece ser um marcador importante para triagem molecular para *Trichomonas gallinae* e o *Fe hidrogenase* se mostrou melhor para diferenciar os genótipos. O ensaio de PCR foi um dos métodos utilizados para identificar as amostras positivas em diferentes ordens de aves, e demonstrou ser a melhor ferramenta, para o diagnóstico e investigação epidemiológica da infecção por *T. gallinae*. Conclui-se que a ordem Columbiformes é afetada pelo agente e que, de acordo com a literatura existente, é o principal reservatório do parasito em várias cidades do estado de São Paulo.

Palavras-chaves: Aves silvestres; Parasitos; Protozoários; Diversidade genética.

GENETIC DIVERSITY OF *TRICHOMONAS* GALLINAE IN WILD BIRDS IN BRAZIL

ABSTRACT - Avian trichomonosis caused by the protozoan *Trichomonas gallinae* is a disease that mainly affects the upper digestive tract of birds. The main natural hosts of this agent are birds of the orders Columbiformes, Falconiformes and Strigiformes. Oral lesions, obstructing the digestive and upper respiratory tracts, make feeding and breathing difficult and often cause death by starvation, dehydration and asphyxia/apnea. A more detailed study of trichomonosis in birds is justified since the pathogenicity of the etiological agent is varied. The objective of the study was to investigate the occurrence and genetic diversity of trichomonads in different species of wild birds in Brazil, in order to investigate the possible association between the genotype of the parasite, bird species and the presence or absence of lesions characteristic of avian trichomonosis. Biological samples from free-ranging and captive birds belonging to taxonomic groups of the orders Accipritiformes, Anseriformes, Columbiformes, Falconiformes, Gruiformes, Passeriformes, Pisciformes, Psittaciformes, and Strigiformes were analyzed. Oropharyngeal swabs were collected from live birds from captivity (zoos, veterinary clinics, and screening centers) and from free-ranging birds, as well as from dead birds sent for necropsy. Swab samples from the oropharyngeal mucosa and the ingulvium were collected from live captive birds for culture in Diamond medium and for molecular assays for trichomonads based on prior DNA extraction. Oropharyngeal mucosa swabs were collected from live birds captured in the Pantanal and used only for molecular techniques (PCR). The molecular assays targeted fragments of the ITS1-5.8S-ITS-2 intergenic region, *Fe-hydrogenase* gene and 18S rRNA. The sequences obtained were subjected to phylogenetic and genotypic diversity analyses. In conclusion, ITS-1/5.8S/ITS-2 appears to be an important marker for molecular screening for *Trichomonas gallinae* and *Fe hydrogenase* proved to be the best marker for differentiating genotypes. The PCR assay was one of the methods used to identify positive samples in different orders of birds, and proved to be the best tool for the diagnosis and epidemiological investigation of *T. gallinae* infection. It is concluded that the order Columbiformes is affected by the agent and that, according to the existing literature, it is the main reservoir of the parasite in several cities of the state of São Paulo.
Keywords: Wild birds; Parasites; Protozoa; Genetical diversity.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

%	Porcentagem
µL	Microlitro
µm	Micrometro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”
g/L	Grama por litro
mg	Miligramas
mg/L	Miligramas por litro
MT	Mato Grosso
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”
RNA	Ácido Ríbonucleico, do inglês “Ribonucleic acid”
SP	São Paulo
T. gallinae	*Trichomonas gallinae*

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

Introdução

Trichomonadídeos são protozoários flagelados pertencentes à família Trichomonadidae e ordem Trichomonadida. Possuem forma de pêra ou redonda, com cerca de 10 a 12,5µm de comprimento, um axóstilo, quatro flagelos anteriores ou livres e uma membrana ondulatória que se prolonga num flagelo posterior, que permite a locomoção dos protozoários. A reprodução destes parasitos é assexuada e acontece por fissão binária. São responsáveis por causarem tricomonoses, afecções no trato gastrointestinal ou urogenital, em humanos e animais de várias espécies (BRUGEROLLE & MÜLLER, 2000; AMIN et al., 2014).

A Tricomonose é também conhecida como “Canker” ou “Roup” em Columbiformes, Psitaciformes e outras aves, e “Frounce” em aves de rapina (RUPLEY, 1997).

Trichomonas gallinae é um organismo eucariota, pertencente ao Reino Protista, Filo Protozoa, Sub-filo Sarcomastigophora, Classe Mastigophora, Ordem Trichomonadida, Família Trichomonadidae e Gênero *Trichomonas* (URQUHART et al., 1996; GASPAR DA SILVA et al., 2007). Possui distribuição mundial e já foi descrito infectando aves das ordens Accipitriformes, Anseriformes, Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Passeriformes, Pscittaciformes, Strigiformes (GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2022), e Ratitas (MASSI et al., 1995). Os hospedeiros naturais de *T. gallinae* são as aves, sendo o pombo comum (*Columba livia*) o principal hospedeiro do protozoário (STABLER, 1954), embora outras espécies de columbiformes também são frequentemente infectadas. *Trichomonas gallinae* pode afetar uma ampla gama de famílias de aves, como os rapinantes (diurnos e noturnos) especialmente aquelas espécies que se alimentam de pombos ou mesmo de carcaças de outras aves contaminadas (KRONE et al., 2005). A infecção em aves geralmente ocorre por via oral, sendo que a forma mais frequente de transmissão é principalmente pelo contato direto, no qual o parasito é transmitido entre adultos por ocasião da

corte e acasalamento e entre adultos e filhotes durante a alimentação. Além disso a ingestão de água e alimentos contaminados também foi identificado como uma importante via de transmissão (KOCAN, 1970; ANDERSON et al., 2009; McBURNEY et al., 2015).

Revisão bibliográfica

Trichomonas gallinae tem um ciclo de vida monoxênico, no qual há um único estágio parasitário, o trofozoíto. Ele se reproduz por fissão binária e não origina a formação de cistos verdadeiros. A gravidade da trichomonose varia com a imunidade da ave e a patogenicidade do isolado infectante, podendo haver casos assintomáticos a severos, culminando em óbito (McBURNEY et al., 2015). Os parasitos podem causar inflamação severa nos tecidos, culminando em erosões, ulcerações e granulomas necróticos caseosos no epitélio do trato digestório. Essas lesões são responsáveis por causar obstruções parciais da faringe, sistema digestório e sistema respiratório superior (coana, entrada da traqueia) tendo como consequência sinais clínicos de sialorreia, anorexia, disfagia, regurgitação e vômitos, dispneia eriçamento de penas, perda de peso, aumento do consumo de água. A acentuada dispneia e disfagia podem culminar com a morte por inanição (NARCISI et al., 1991; AMIN et al., 2014).

No exame físico, podem ser encontrados presentes depósitos amarelados, necróticos firmemente aderidos a mucosa oral. As aves acometidas exalam um odor pútrido característico. A acentuada dispneia e disfagia podem culminar com a morte por inanição (ECHENIQUE et al., 2020; Forrester & Foster, 2008). Pequenas placas amareladas, circunscritas e elevadas podem ser encontradas especialmente nas áreas palatina e faríngea. Estas placas são membranas diftéricas que cobrem pequenas úlceras ou erosões, as quais aumentam e podem obstruir a abertura do esôfago. As lesões podem se espalhar para os seios da face, conjuntiva, fígado, e outros órgãos (SALEEM et al., 2008).

Um método simples de comprovação microscópica do parasito seria o esfregaço da mucosa afetada, utilizando um suabe umedecido com solução fisiológica (BONDURANT E HONIGBERG, 1994). Os esfregaços podem ser corados com Giemsa, prata ou Panótico, porém tal técnica pode resultar em

falsos negativos, dependendo da quantidade de parasitos que as aves abrigam (KAUFMAN et al., 2004).

Com o avanço das técnicas moleculares, inúmeros estudos vêm sendo realizados para avaliar a diversidade genética de tricomonadídeos em aves. Diferentes linhagens e genótipos de *T. gallinae* e novas espécies vem sendo descritas e relacionadas a sinais clínicos, dentre elas: *Trichomonas vaginalis-like* detectada nos Estados Unidos da América (EUA) em rolinha-cinzenta (*Columbina passerina*) e no Brasil em coruja-orelhuda (*Asio clamator*) (GERHORLD et al., 2008; ECCO et al., 2012); *Trichomonas tenax* – like em pombo-correio (*Columba livia domestica*) na Áustria, em rola-brava (*Streptoplia turtur*), em pombo-bravo (*Columba oena*) no Reino Unido (LENNON et al., 2013); *Trichomonas gypaetinii* em abutre-barbudo (*Gypaetus barbutus*) na República Tcheca, em águias de cabeça-branca (*Haliaeetus leucocephalus*) no Canadá, e abutres-do-Egito (*Neophron percnopterus*) na Espanha (KELLY-CLARK et al., 2013; MARTÍNEZ-DÍAZ, et al., 2015); *Trichomonas stlaberi* e *Trichomonas blagburni-like* em pombas-de-coleira-branca (*Patagioenas fasciata*) nos EUA (GIRARD et al., 2014); *Trichomonas canistomae-like* em rola-brava (*Streptopelia turtur*) e em açor (*Acciptes gentilis*) na Espanha (MARTÍNEZ-DÍAZ, et al., 2015), e *Trichomonas* sp. em rola-brava e pombos domésticos na Espanha (MARTINÉZ-HERRERO et al., 2017).

Em um estudo retrospectivo sobre tricomonose oral em rapinantes realizado na Universidade Federal de Pelotas, no Rio Grande do Sul, sete ximangos (*Milvago chimango*) apresentaram lesões semelhantes àquelas causadas por trichomonadídeos. O diagnóstico foi confirmado por exame direto (ECHENIQUE et al., 2020).

Em Belo Horizonte, Andery et al. (2013) realizaram a necropsia de aves pertencentes às ordens Falconiformes, Strigiformes e Cathartiformes que vieram a óbito no CETAS-BH; destas, 9,1% (10/109) apresentavam lesões condizentes à tricomonose, confirmada por meio de exame direto de esfregaços da cavidade oral, orofaringe, cavidade nasal e sino infraorbital, por meio de suabes.

Em estudo publicado por Martinéz-Herrero et al. (2020), os autores detectaram, por meio de análises moleculares baseadas na região ITS1/5.8S/ITS2, cinco genótipos circulando em aves na Espanha, sendo que

dois foram descritos pela primeira vez nesse estudo. Por meio de análises estatísticas foi possível relacionar os genótipos à espécie de hospedeiro, lesões e dieta. Os genótipos ITS-OBT-Tg-1 e ITS-OBT-Tg-2 foram os mais frequentes e estavam relacionados com o hospedeiro, uma vez que ocorria mais em aves predadoras e presas, respectivamente. Adicionalmente, o primeiro genótipo também estava associado com a presença de lesões. Além disso, os autores conseguiram estabelecer uma relação entre a dieta das aves de rapina e a presença de lesões, sendo que aves ornitófagas não-estritas tinham maior risco de desenvolver lesões graves quando comparadas àquelas estritas. Para os referidos autores, a explicação para tal fato pode estar relacionada à história evolutiva da ave, uma vez que as aves ornitófagas estritas poderiam desenvolver uma resposta imune que as protegeria da alta virulência dos protozoários em questão.

Até o momento, a diversidade genética dos tricomonadídeos no Brasil é pouco estudada, uma vez que poucos estudos objetivaram a análise filogenética dos isolados (ECCO et al., 2012). De fato, a maioria dos estudos conduzidos em território brasileiro utilizou técnicas de exame direto citológico e histopatológico, com diagnóstico realizado com base na morfologia do agente.

REFERÊNCIAS

Amin, A.; Bilic, I.; Liebhart, D.; Hess, M. Trichomonads in birds–a review. **Parasitology**, v. 141, n. 6, p. 733-747, 2014.

Anderson, N. L. R. A.; Grahn, K.; Van Hoosear, R. H. Bondurant. 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**, v. 161, n. 3-4, p. 178–186, 2009.

Andery, D. D. A.; Ferreira Junior, F. C.; de Araújo, A. V.; Vilela, D. D. R.; Marques, M. V. R.; Marin, S. Y.; Martins, N. D. S. Health assessment of raptors in triage in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, p. 247-256, 2013.

Bondurant, R. H.; Honigberg, B. M. Trichomonads of veterinary importance. In: Parasitic protozoa. Academic Press, 1994. p. 111-188.

Brugerolle, G.; Muller, M. Amitochondriate flagellates. **Systematics Association Special Volume**, v. 59, p. 166-189, 2000.

Echenique, J. V.; Soares, M. P.; Albano, A. P. N.; Bandarra, P. M.; Schild, A. L. Diseases of wild birds in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 121-128, 2020.

Forrester, D.J.; Foster, D.W. Trichomonosis. In C.T. Atkinson, N.J. Thomas, & D.B. Hunter (Eds.). Parasitic Diseases of Wild Birds. p.120–153. Ames: Wiley-Blackwell. 2008.

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**, v. 7, n. 4, p. 433-440, 2007.

Gerhold, R. W.; Yabsley, M. J.; Smith, A. J.; Ostergaard, E.; Mannan, W.; Cann, J. D.; Fischer, J. R. Molecular characterization of the *Trichomonas gallinae*

morphologic complex in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1335-1341, 2008.

Girard, Y. A.; Rogers, K. H.; Gerhold, R.; Land, K. M.; Lenaghan, S. C.; Woods, L. W.; Johnson, C. K. *Trichomonas stableri* n. sp., an agent of trichomonosis in Pacific Coast band-tailed pigeons (Patagioenas fasciata monilis). International Journal for Parasitology: **Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 1, p. 32-40, 2014.

Gómez-Muñoz, M. T.; Gómez-Molinero, M. Á.; González, F.; Azami-Conesa, I.; Bailén, M.; García Piqueras, M.; Sansano-Maestre, J. Avian Oropharyngeal Trichomonosis: Treatment, Failures and Alternatives, a Systematic Review. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2297, 2022.

Kaufman, S. C.; Musch, D. C.; Belin, M. W.; Cohen, E. J.; Meisler, D. M.; Reinhart, W. J.; Van Meter, W. S. Microscopia confocal: um relatório da Academia Americana de Oftalmologia. Oftalmologia , v. 111, n. 2, pág. 396-406, 2004.

Kelly-Clark, W. K.; McBurney, S.; Forzán, M. J.; Desmarchelier, M.; Greenwood, S. J. Detection and characterization of a *Trichomonas* isolate from a rehabilitated bald eagle (Haliaeetus leucocephalus). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 4, p. 1123-1126, 2013.

Kocan, R. M.; Knisley, J. O. Challenge infection as a means of determining the rate of disease resistant *Trichomonas gallinae*-free birds in a population. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 6, n. 1, p. 13-15, 1970.

Krone, O.; Altenkamp, R.; Kenntner, N. Prevalence of *Trichomonas gallinae* in northern goshawks from the Berlin area of northeastern Germany. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 2, p. 304-309, 2005.

Martínez-Díaz, R. A.; Ponce-Gordo, F.; Rodríguez-Arce, I.; del Martínez-Herrero, M. C.; González, F. G.; Molina-López, R. Á.; Gómez-Muñoz, M. T. *Trichomonas gypaetinii* n. sp., a new trichomonad from the upper gastrointestinal tract of scavenging birds of prey. **Parasitology Research**, v. 114, p. 101-112, 2015.

Martínez-Herrero, M. C.; Garijo-Toledo, M. M.; Liebhart, D.; Ganas, P.; Martínez-Díaz, R. A.; Ponce-Gordo, F.; Gómez-Muñoz, M. T. (Novel avian oropharyngeal

trichomonads isolated from European turtle doves (Streptopelia turtur) and racing pigeons (Columba livia): genetic and morphometric characterisation of clonal cultures. **Infection**, **Genetics and Evolutio**n, v. 55, p. 93-103, 2017.

Martínez-Herrero, M. C.; Sansano-Maestre, J.; Ortega, J.; González, F.; López-Márquez, I.; Gómez-Muñoz, M. T.; Garijo-Toledo, M. MOral trichomonosis: Description and severity of lesions in birds in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109196, 2020.

Massi, P.; Dottorini, M.; Pavesi, M.; Silimbani, E. Osservazioni sulla patologia dello struzzo (Struthio camelus) e prime indagini di laboratorio in provincia di Forlı. **Zootecnica International**, February, p. 76-77, 1995.

Mcburney, S.; Kelly-Clark, W. K.; Forzan, M. J.; Lawson, B.; Tyler, K. M.; Greenwood, S. J. Molecular characterization of *Trichomonas gallinae* isolates recovered from the Canadian Maritime provinces' wild avifauna reveals the presence of the genotype responsible for the European finch trichomonosis epidemic and additional strains. **Parasitology**, v. 142, n. 8, p. 1053-1062, 2015.

Mehlhorn, H.; Al-Quraishy, S.; Aziza, A.; Hess, M. Fine structure of the bird parasites *Trichomonas gallinae* and *Tetratrichomonas gallinarum* from cultures. **Parasitology research**, v. 105, p. 751-756, 2009.

Narcisi, E. M.; Sevoian, M.; Honigberg, B. M. Pathologic changes in pigeons infected with a virulent *Trichomonas gallinae* strain (Eiberg). **Avian Diseases**, p. 55-61, 1991.

Rupley, A.E. Gastrointestinal Signs. In: Manual of Avian Practice (1ªEdição, pp.91-108). Filadélfia: Saunders. 1997.

Saleem, M. H.; Khan, M. S.; Chaudry, A. S.; Samad, H. A. Prevalence of trichomoniasis in domestic and wild pigeons and its effects on hematological parameters. Pakistan Vet. J, v. 28, n. 2, p. 89-91, 2008.

Stabler, R. M. *Trichomonas gallinae*: a review. **Experimental parasitology**, v. 3, n. 4, p. 368-402, 1954.

Tasca, T.; De Carli, G. A. Scanning electron microscopy study of *Trichomonas gallinae*. **Veterinary parasitology**, v. 118, n. 1-2, p. 37-42, 2003.

Urquhart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L.; Dunn, A.M.; Jennings, F.W. Parasitologia Veterinária. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Trichomonas gallinae* EM AVES SINANTRÓPICAS DO SUDESTE DO BRASIL

Esse capitulo corresponde à publicação que será submetida ao periódico Experimental Parasitology

RESUMO

A tricomonose aviária é causada pelos protozoários flagelados *Trichomonas gallinae* e *Tetratrichomonas gallinarum*, que podem ser encontrados nos tratos digestivos anterior e posterior das aves, respectivamente. O primeiro agente é frequentemente detectado na cavidade oral de Columbiformes, que são considerados os principais reservatórios do parasita. Com o objetivo de investigar a ocorrência e a diversidade genética de *Trichomonas* spp. em 262 aves cativas pertencentes a 12 diferentes ordens de aves mantidas em cativeiro no sudeste do Brasil, swabs da mucosa da orofaringe e do inglúvio foram submetidos à cultura em meio Diamond, ensaios moleculares e esfregaços corados pelo Giemsa. Das 276 aves analisadas, 76 (27,54%; 76/276) foram positivas na PCR de triagem baseada na região intergênica ITS1-5.8S-ITS-2 de *Trichomonas* spp. Em ensaios adicionais de PCR para caracterização molecular, 85,53% (65/76) e 65/76 foram positivos para os genes *Fe hidrogenase* e 18S rRNA, respectivamente. Das 172 amostras submetidas à cultura em meio Diamond, 70 (40,69%) apresentaram estruturas semelhantes aos trofozoítos de *Trichomonas* sp., com movimentação característica. A análise filogenética baseada nas sequências ITS1/5.8S/ITS2 de *Trichomonas* spp. posicionou as 36 sequências (correspondentes a 2 genótipos diferentes) obtidas no presente estudo em dois clados distintos dentro do clado *T. gallinae*. As 65 sequências de *Fe hidrogenase* (correspondentes a 6 genótipos diferentes) detectadas em aves neste estudo foram posicionadas em cinco clados distintos de *T. gallinae*. Na análise filogenética baseada no gene 18S rRNA, as 7 sequências obtidas (correspondentes a 3 genótipos diferentes) foram posicionadas em quatro clados distintos de *T. gallinae*. Apenas 6/262 (2,29%) swabs apresentaram estruturas morfologicamente semelhantes aos trofozoítos de *Trichomonas* sp. em esfregaços corados por Giemsa. Ensaios moleculares foram usados para detectar *Trichomonas* spp. em diferentes ordens de aves, o que provou ser uma ferramenta útil para o diagnóstico e investigação epidemiológica da infecção por *T. gallinae*.

Palavras-chave: Aves selvagens; Columbiformes; Cultura; Filogenia; Protozoários; *Trichomonas gallinae*.

OCCURRENCE AND GENETIC DIVERSITY OF *Trichomonas gallinae* IN SYNANTHROPIAN BIRDS FROM SOUTHEASTERN BRAZIL

ABSTRACT

Avian trichomonosis is caused by the flagellate protozoa *Trichomonas gallinae* and *Tetratrichomonas gallinarum*, which can be found in the anterior and posterior digestive tracts of birds, respectively. The first agent is frequently detected in the oral cavity of Columbiformes, which are considered the main reservoirs of the parasite. In order to investigate the occurrence and genetic diversity of *Trichomonas* spp. in 262 captive birds belonging to 12 different bird orders kept in captivity in southeastern Brazil, swabs of the oropharynx and ingluvium mucosa were subjected to Diamond medium-based culture, molecular assays and Giemsa-stained smears. Of the 276 birds analyzed, 76 (27.54%; 76/276) were positive in the screening PCR based on the ITS1-5.8S-ITS-2 intergenic region of *Trichomonas* spp. In additional PCR assays for molecular characterization, 85.53% (65/76) and 65/76 were positive for the *Fe hydrogenase* and 18S rRNA genes, respectively. Of the 172 samples submitted to culture in Diamond medium, 70 (40.69%) presented structures similar to *Trichomonas* sp. trophozoites, with characteristic movement. Phylogenetic analysis based on the ITS1/5.8S/ITS2 sequences of Trichomonas spp. positioned the 36 sequences (corresponding to 2 different genotypes) obtained in the present study into two distinct clades within *T. gallinae* clade. The 65 Fe hydrogenase sequences (corresponding to 6 different genotypes) detected in birds in this study were positioned into five *T. gallinae* distinct clades. In the phylogenetic analysis based on the 18S rRNA gene, the 7 sequences obtained (corresponding to 3 different genotypes) were positioned in four *T. gallinae* distinct clades. Only 6/262 (2.29%) swabs showed structures morphologically similar to *Trichomonas* sp. trophozoites in Giemsa-stained smears. Molecular assays were used to detect *Trichomonas* spp. in different orders of birds, which proved to be a useful tool for the diagnosis and epidemiological investigation of *T. gallinae* infection.
Keywords: Wild birds; Columbiformes; Culture; Phylogeny; Protozoa; *Trichomonas gallinae*.

INTRODUÇÃO

Duas principais espécies de *Trichomonas* spp. são descritas em aves: *Trichomonas gallinae*, a qual possui grande importância na clínica de aves selvagens e acomete principalmente o trato digestório superior (orofaringe, esôfago e inglúvio) de diferentes espécies de aves, e *Tetratrichomonas gallinarum*, a qual ocorre no trato digestório inferior, sendo mais encontrado no ceco de galináceos e anseriformes (CHOU et al., 2022; MEHLHORN et al., 2009; AMIN et al., 2014).

Trichomonas gallinae, embora parasita o trato digestivo superior de aves, principalmente faringe, esôfago e papo, também pode atingir, por via hematogênica, os pulmões, o fígado, os sacos aéreos, o pâncreas, os ossos e os seios do crânio (Gupta et al., 2023). O protozoário é transmitido às aves através de várias rotas, tais como: por meio do “leite do papo”, comportamentos de corte e acasalamento, contato direto com uma ave infectada ou indiretamente através de alimentos ou água contaminadas e consumo de presas infectadas. Dessa forma, uma grande variedade de ordens de aves pode ser infectada, podendo ou não apresentar sinais clínicos (Grunenwald et al., 2018) (Forzán et al., 2010).

As lesões iniciais em pombos, os quais atuam como principais hospedeiros e disseminadores de *T. gallinae*, são caracterizadas como pequenas manchas brancas a amareladas na cavidade oral, se a infecção for grave pode ser fatal em aves, principalmente jovens. Em pombos a mortalidade pode chegar a 80-90% ou mais (Gupta et al., 2023).

Embora o diagnóstico direto da tricomonose por meio de esfregaços corados de suabes orofaríngeos seja frequentemente complicado pela fragilidade do parasito, técnicas moleculares têm sido empregadas para aumentar a sensibilidade do diagnóstico e estabelecer relações filogenéticas entre os isolados. Baixas quantidades de parasitos de *Trichomonas* spp. podem ser detectados devido à maior sensibilidade da reação em cadeia da polimerase (PCR). Vários alvos gênicos, incluindo a região espaçadora transcrita interna (ITS) e os genes 18S rRNA e *Ferro hidrogenase*, provaram serem eficazes na identificação do agente e na diferenciação de genótipos (Mcburney et al. 2015).

As regiões espaçadoras transcritas internas 1 e 2 (ITS1, ITS2) têm sido cada vez mais usadas para confirmar a presença de infecção por *T. gallinae* (Da Silva et al., 2007).

No Brasil, os primeiros estudos foram realizados no Rio Grande do Sul por De Carli et al. (1979) e por Tasca e De Carli (1999), os quais descreveram uma prevalência de 62,3% (104/167) e 26,47% (18/68) de *T. gallinae* em pombos, respectivamente. Ambos os estudos realizaram cultura em meio de tripticase-extrato de levedura-maltose (TYM), a partir de amostras de esfregaços corados de suabes de mucosa da cavidade oral e orofaringe das aves. A espécie foi confirmada com base nas características morfológicas do protozoário.

Arenales et al. (2014) relataram um caso de tricomonose em um pombo-comum (*Columba livia*) atendido no Hospital Veterinário da UNESP de Araçatuba. O animal veio a óbito durante o exame clínico e uma massa branca-amarelada com superfície irregular, friável e de odor pútrido foi encontrada na mucosa do palato duro. Protozoários morfologicamente semelhantes a *T. gallinae* foram encontrados em exame citológico. Joppert (2007), em um estudo realizado com rapinantes de vida livre que estavam internados e vieram a óbito na Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre de São Paulo, notaram a presença de lesões orais características da infecção por tricomonadídeos. Tais lesões foram observadas em Falconiformes, sendo quatro (10% [4/40]) carcará - *Caracara planctos* e oito (10,81% [8/74]) quiriquiri - *Falco sparverius* e 4,25% (2/47) Strigiformes (corujinha-do-mato - *Megascops choliba* e jacururu - *Bubo virginianus*). O diagnóstico foi comprovado por meio de exame direto de extensões das lesões com solução salina. Ainda em São Paulo, Godoy et al. (2010) encontraram lesões compatíveis com tricomonose em carcaças de 1,66% (6/360) Passeriformes enviadas para o Centro de Reabilitação de Animais Selvagens do Parque Ecológico do Tietê.

Em Minas Gerais, Ecco et al. (2012) investigaram a presença de tricomonadídeos em amostras de tecidos parafinados (língua, orofaringe, esôfago, papo, proventriculo e moela), onde todas as seis aves (2 corujas-orelhudas - *Asio clamator*, 1 quiriquiri - *Falco sparverius*, 2 Trinca-ferro - *Saltator similis* e 1 tucano-toco - Ramphastos toco) foram positivas nos ensaios de PCR para *Trichomonas* spp. baseados na região intergênica (ITS1) e na região parcial

5.8S rRNA. As sequências alocaram-se em dois clados distintos, sendo que o primeiro foi composto por sequências detectadas em uma coruja-orelhuda e em um quiriquiri, juntamente com sequências de *T. gallinae*. Uma sequência de trinca-ferro agrupou-se em um clado juntamente com uma sequência de *Simplomonas*. A outra sequência de trinca-ferro e uma sequência de coruja-orelhuda alocaram-se sozinhas, formando dois novos clados. Segundo os autores, pode ter ocorrido uma falha da resolução do posicionamento desses isolados na análise filogenética; mais tarde, essas sequências dos genes 18S rRNA e α-tubulina de um clado distinto foram associadas a *T. vaginalis-like* baseada na região 5.8S-ITS2 (Gerhold et al., 2008). No Rio Grande do Sul, Bruni et al. (2019) detectou a presença de *T. gallinae* em um ximango (*Milvago chimango).* O animal apresentava lesões características e a presença do agente patogênico foi confirmado por meio de cultura seguida de PCR com base na região intergênica ITS1.

O presente estudo tem como objetivo investigar a ocorrência e a diversidade genética de tricomonadídeos em diferentes espécies de aves sinantrópicas de cativeiro de São Paulo para entender a distribuição do patógeno e o alcance do hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

As amostras de suabes orofaríngeos utilizadas neste estudo foram colhidas entre julho de 2022 e janeiro de 2023, de aves selvagens provenientes de cativeiro de diferentes cidades do estado de São Paulo: Franca/SP (Latitude: -20.5418, Longitude: -47.4197) (121 aves), Ribeirão Preto/SP (Latitude: -21.170888, Longitude: -47.799273 (51 aves), Jundiaí/SP (Latitude, -23,185705. Longitude, -46,897812) (58 aves), Botucatu/SP (Latitude: -22.8904, Longitude: -48.4553 22) (32 aves) e Jaboticabal (Latitude: -21.2554, Longitude: -48.3224) (19 aves da rotina do SEPAS - Serviço de Patologia de Animais Selvagens) (Figura 1). Em 262/281 aves, foram coletados três suabes orofaríngeos: (i.) o primeiro suabe foi armazenado em meio de cultivo Diamond, para avaliação do crescimento de tricomonadídeos; (ii.) o segundo para as confecções de

esfregaços em lâminas; (iii.) o terceiro para extração do DNA para utilização nos ensaios moleculares. As outras 19 aves, foram da rotina do SEPAS, em que as aves já estavam mortas e congeladas, portanto não foi realizado o exame de cultura em meio Diamond e citologia corada com Giemsa. Todos os procedimentos foram autorizados por meio do CEUA (n°732/21) e do SISBIO (n° 77538-1).

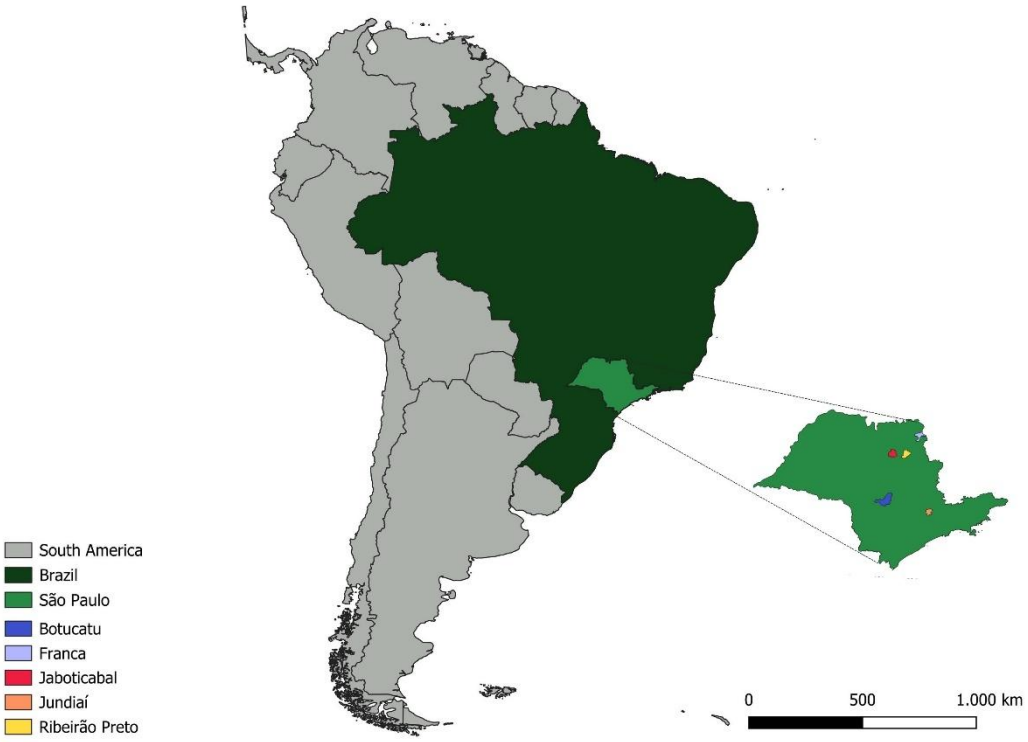

Figura 1. Locais de coleta evidenciando a América latina, Brasil, o estado de São Paulo com destaque para as cidades de Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Jundiaí e Botucatu.

Cultivo de *Trichomonas* spp.

Para cultivo de *Trichomonas* spp. foram utilizados as amostras dos suabes de marca Absorve, de aves mantidas em cativeiro oriundas de um criatório em Franca/SP, do Zoológico em Ribeirão Preto/SP, de um CRAS (Centro de Reabilitação de Animais Selvagens) em Jundiaí/SP e do CEMPAS (Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Silvestres) de Botucatu/SP. Não foi realizado cultivo das amostras de suabes orofaríngeos de aves amostradas em Jaboticabal/SP, por serem amostras que ja haviam sido coletadas previamente

durante rotina do SEPAS. Os suabes de cavidade orofaríngeo, colhidos para a realização da cultura, foram armazenados imediatamente em meio de cultivo Diamond, com composição do meio TYM (Trypticase-Yeast-Extract-Maltose) Diamond (1957) modificado: 20g de *Tryptone* (Difco), 10g de Extrato de levedo (Difco), 5g de Maltose (C12 H22 O11) (DIFCO), 1 g de L-cisteina cloreto (C3 H7 NO2 S.HC1), 0,2g de Ácido ascórbico (C8 H8 O8), 0,8g de Hidrogenofosfato dipotássico (K2 HPO4), 0,8g de Dihidrogenofosfato de potássio (KH2 PO4) Ágar (Difco Bacto) e 962,2 ml de Água destilada-deionizada, com pH de 7,2 do meio.

As amostras de suabes em meio Diamond foram incubadas em estufa a 37°C, durante três dias. A cada 24 horas, os cultivos foram avaliados quanto à turbidez e microscopicamente a fim de verificar a presença de trofozoítos de *Trichomonas* spp., observando-se morfologia e movimento característico. Para isso, o meio de cultura foi centrifugado a 8.000 rpm por 15 minutos, formando um pellet de sedimentação (Figura 2). Uma alíquota de 10 µL do pellet foi pipetada sobre lâminas para observação sob microscópio de luz (Nikon eclipse E200) em aumentos de 4 a 100 vezes. Os pellets ressuspendidos da cultura que mostraram um crescimento foram transferidos para criotubos e armazenados a -20°C até a extração de DNA seguida dos ensaios de PCR para detecção e caracterização de *Trichomonas* spp.

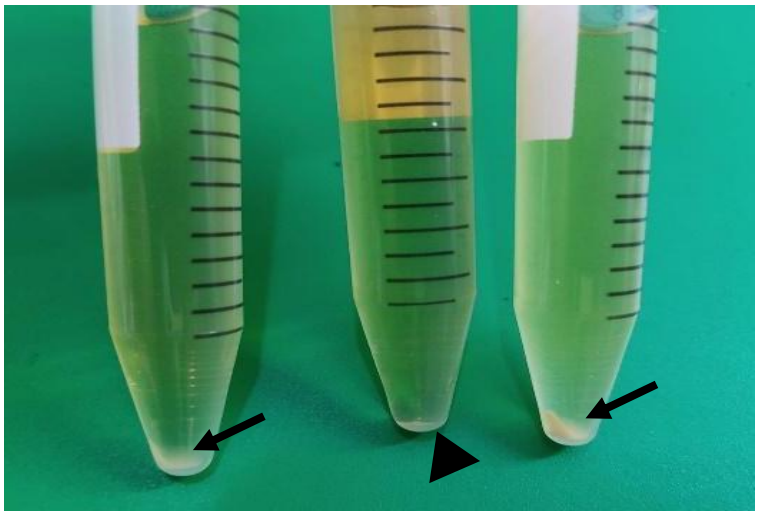

Figura 2. Imagem mostrando pellet formado após a centrifugação (seta preta), e um tubo cônico ao meio após a centrifugação sem a formação de pellet (cabeça da seta). Arquivo pessoal.

Citologia dos esfregaços de suabes orofaríngeos

Das aves cativas, examinadas no zoológico de Ribeirão Preto (n=51), em Franca (n=121), Jundiaí (n=58), Botucatu (n=32), foram confeccionados, a partir dos suabes orofaríngeos um esfregaço em lâminas de microscopia previamente limpas e desengorduradas. Os esfregaços foram feitos com movimentos circulares, a partir do centro da lâmina e de forma homogênea. Após secagem em temperatura ambiente, foi realizada a fixação em metanol absoluto por 3 minutos. Posteriormente, as lâminas foram coradas utilizando uma solução Giemsa (Interlab). A lâmina era corada por 40 minutos na posição horizontal com a face da amostra para baixo, utilizando-se aproximadamente 5 mL por lâmina. Em seguida, a lâmina foi lavada em água corrente e secada em posição vertical por 30 minutos para a posterior análise (Soulsby, 1986).

Extração de DNA

Os suabes foram acondicionados em PBS pH 7,2 autoclavado e posteriormente congelados a -20°C. Para extração de DNA, as amostras foram previamente aquecidas em banho seco a 40°C por 15 minutos, o excesso de PBS foi removido, deixando no microtubo um volume de aproximadamente 300 microlitros. Após esse pré-preparo e ainda com o suabe dentro do microtubo, foi adicionada a proteinase K e tampão de lise fornecido pelo kit comercial utilizado (Biopur Mini Spin Plus,MoBius Life Science, Paraná, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. O suabe só foi removido antes de transferir o conteúdo para a coluna de centrifugação. Todos os demais passos foram seguindo o protocolo do fabricante.

Reação de amplificação para o gene endógeno *β actina* aviária

Com o objetivo de eliminar resultados falsos negativos em virtude da presença de inibidores, as amostras de DNA obtidas a partir dos suabes foram submetidas a uma PCR convencional objetivando a amplificação do gene endógeno *β-actina*. Para tal, foram utilizados como oligonucleotídeos iniciadores β-actin-F (5'-ATCTCGTCTTGTTTTATGCG-3') e β-actin-R (5'-TATCCGTAAGGATCTGTATG-3') (VAN BORM et al., 2007). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25 µL,

contendo uma mistura de 5 µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p.

As sequências térmicas e as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritas no quadro 1. Água esterilizada ultrapura foi utilizada como controle negativo em todos os ensaios de PCR. DNA de aves do Pantanal brasileiro (Alabí Córdova et al., 2024) foi utilizado como controle positivo nos ensaios de PCR para *β-actina*.

Ensaios de PCR para *Trichomonas* spp.

As amostras positivas para o gene endógeno *β-actina* e na cultura líquida foram triadas para pesquisa de DNA de tricomonadídeos por meio de uma PCR convencional baseada nas regiões ITS1/5.8S rRNA/ITS2 (369 pb) (Felleisen, 1997). Posteriormente, as amostras positivas e as amostras positivas da cultura, para o referido ensaio de PCR foram caracterizadas por meio de ensaios de PCR que amplificam os genes 18S rRNA (aproximadamente 1.500 pb) (Ganas et al., 2014) e *Fe-hidrogenase* (aproximadamente 1.000 pb) (Lawson et al., 2011). As reações de amplificação foram realizadas utilizando uma reação com volume total final de 25 µL, contendo uma mistura com 5 µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeos, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 0,75 U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultrapura esterilizada q.s.p. 25 µL.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores a as sequências térmicas utilizadas estão representados na Quadro 1. Água esterilizada ultrapura foi utilizada como controle negativo em todos os ensaios de PCR. DNA de *Trichomonas gallinae* (amostra Jaboticabal de uma ave de rapina *Falco peregrinus*) foi utilizado como controle positivo nos ensaios de PCR para *Trichomonas* spp.

REGIÃO INTERGÊNICA	SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIAS TÉRMICAS	REFERENCIAS	TAMANHO DO FRAGMENTO
GENE ENDÓGENO				
β actinF	5’-CCTCATGAAGATCCTGACAGA3’	95°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos a 95°C por 30s, 54°C por 30s e 72 °C por 1min e extensão final a 72°C por 5 min	Van Borm et al., 2007)	700bp
β actinR	5’-TCTCCTGCTCYAAYTCCA-3’			
ITS1/5.8S/ITS2				
TRF1	(5’ -TGCTTCAGCTCAGCGGGTCTTCC-3’)	94°C por 2 min seguidos de 40 ciclos a 94°C por 20s, 66°C por 20s e 72 °C por 30s, extensão final a 72°C por 5 min	Felleisen, (1997)	369bp
TRF2	(5’ - CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG-3’)			
18S rRNA				

Hm-Long-f	(5′-AGGAAGCACACTATGGTCATAG-3′)	95 °C por 15 min, seguidos de 40 ciclos94 °C por 30s, 55°C por 1 min e 72 °C por 2 min, extensão final a 72 °C por 10 min	Ganas et al., (2014)	1500bp
Hm-Long-r	(5′-CGTTACCTTGTTACGACTTCTCCTT-3′)			
Fe-hidrogenase				
TrichhydFOR	(5’- GTTTGGGATGGCCTCAGAAT-3’)	95°C por 10 min seguidos de 36 ciclos a 96° por 5s, 53° por 3s e 68° por 15s, e extensão final a 72°C por 10s.	Lawson et al., 2011	1000bp
TrichhydREV	(5’- AGCCGAAGATGTTGTCGAAT-3’)			

Quadro 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e sequências térmicas utilizadas nos ensaios de PCR convencional para os genes endógenos e *Trichomonas* spp.

Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados nos ensaios de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 100 V/ 150mA durante 50 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®). Os resultados foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc MP Imaging System, BIO RAD®).

Sequenciamento e análise pelo BLASTn

Os produtos amplificados nos ensaios de PCR foram purificados utilizando-se Wizard® SV Gel (Promega, Fitchburg,WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado pelo método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems®) no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO -FCAV - UNESP).

Para a obtenção de uma sequência de melhor qualidade e maior tamanho para o gene 18S rRNA foram desenhados primers adicionais (F: 2: CAAGGGCGAGAGTAGGAGTA e R: ACCGAGTCATCCAATCGGTA) que foram enviados para o sequenciamento juntamente com os primers utilizados na amplificação do gene.

O programa Phred-Phrap versão 23 (Ewing & Green, 1998) foi utilizado para construção de sequências-consenso dos marcadores moleculares previamente descritos, analisando ambas as fitas “forward” e “reverse” sequenciadas da mesma amostra, respeitando-se o valor mínimo de 20 de qualidade de cada nucleotídeo para determinar a sequência de nucleotídeos. O programa BLAST (Altschul et al., 1990) foi utilizado afim de comparar as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Análise filogenética

As sequências foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado retiradas do banco de dados (GenBank), utilizando o software ClustalW (Thompson et al., 1994) via Bioedit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Foram realizadas análises Bayesiana utilizando o software MrBayes 3.2.2 on XSEDE (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) via portal CIPRES (Miller et al., 2010). A análise Bayesiana foi realizada com 10^6 gerações e números de classes de substituição variando conforme o modelo evolutivo encontrado para cada conjunto de dados. O modelo evolutivo foi encontrado utilizando o software jModelTest 2 (Darriba et al., 2012). A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56- 381 beta (Stover e Muller, 2010).

Análise de diversidade e rede de genótipos

Para calcular a diversidade de nucleotídeos (π), nível de polimorfismo (diversidade de haplótipo – [dh]), número de haplótipos (h) e a média do número de diferenças nucleotídicas (K) entre as sequências obtidas, foi utilizado o programa DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). Adicionalmente, as sequências foram submetidas à análise de TCS network (BANDELT et al., 1999) utilizando o programa Population Analysis with Reticulate Trees (popART) (Leigh & Bryant, 2015). Tal análise foi utilizada para verificar a diversidade de genótipos com base nos diferentes alvos gênicos entre as aves selvagens amostradas.

RESULTADOS

Espécies de aves amostradas

Durante o período de estudo, aves pertencentes às seguintes ordens foram amostradas: Accipitriformes, Anseriformes, Cathartiformes, Columbiformes, Cuculiformes, Falconiformes, Galbuliformes, Nyctibiiformes, Passeriformes, Pelecaniformes, Piciformes, Psittaciformes e Strigiformes, presente no quadro 2.

Quadro 2. Descrição das diferentes ordens de aves que foram amostradas em Jaboticabal, Franca, Ribeirão Preto, Botucatu e Jundiaí (SP, Brasil) para pesquisa de *Trichomonas* spp. em suabes orofaríngeos.

CIDADE	QUANTIDADE	ORDEM	QUANTIDADE/ESPÉCIE
Jaboticabal	12	Columbiformes	1 *Columba livia*
	3	Piciformes	3 *Ramphastos toco*
	1	Strigiformes	1 *Tyto furcata*
	2	Psittaciformes	1 *Ara araúna,* 1 *Forpus xanthopterygius*
	1	Passeriforme	*1 Vanellus chilensis*
Franca	121	Columbiformes	121 *Columba livia*
Ribeirão Preto	5	Accipitriformes	4 *Rupornis magnirostris* e 1 *Falco sparverius*
	5	Cathartiformes	5 *Coragyps atratus*
	10	Columbiformes	10 *Columbina talpacoti*
	1	Nyctibiiformes	1 *Nyctibius griseus*
	10	Passeriformes	3 *Saltator similis*, 1 *Cacicus cela*, 3 *Turdus rufiventris*, 1 *Thraupis sayaca*, 1 *Mimus saturninus*, 1 *Pitangus sulphuratus*
	2	Piciformes	2 *Ramphastos toco*
	8	Psittaciformes	1 *Ara arauna*, 3 *Aratinga auricapillus*, 1 *Eupsittula aurea*, 3 *Pyrrhura frontalis*
	10	Strigiformes	5 *Tyto furcata*, 4 *Athene cunicularia*, 1 *Megascops choliba*

Botucatu	19	Passeriformes	1 *Sicalis flaveola*, 2 *Oryzoborus maximiliani*, 2 *Cyanocompsa brissonii*, 2 *Coryphospingus cucullatus*, 1 *Oryzoborus angolensis*, 1 *Saltator similis*, 1 *Gnorimopsar chopi*, 3 *Sporophila caerulescens*, 2 *Pitangus sulphuratus*, 2 *Tachornis squamata*, 1 *Thraupis sayaca* e 1 *Guira guira*
	2	Columbiformes	2 *Zenaida auriculata*
	3	Piciforme	3 *Ramphastos toco*
	1	Psittaciformes	1 *Brotogeris chiriri*
	1	Anseriforme	1 *Anas bahamensis*
	6	Strigiformes	4 *Ciccaba virgata*, 1 *Tyto furcata* e 1 *Athene cunicularia*
Jundiaí	11	Piciformes	11 *Ramphastos toco*
	1	Nyctibiiformes	1 *Nyctibius griseus*
	10	Strigiformes	6 *Ciccaba virgata*, 2 *Athene cunicularia*, 1 *Asio clamator*, 1 *Pulsatrix perspicillata*
	11	Columbiformes	2 *Zenaida auriculata*, 3 *Columba livia*, 6 *Columbina talpacoti*
	12	Falconiformes	2 *Caracara plancus*, 7 *Falco sparverius*, 1 *Ictinia*

			plumbea, 2 *Rupornis magnirostris*
	4	Cathartiformes	4 *Coragyps atratus*
	2	Pelecaniformes	1 *Tigrisoma lineatum*, 1 *Ardea cocoi*
	1	Tinamiformes	1 *Rhynchotus rufescens*
	6	Psittaciformes	4 *Psittacara leucophthalmus*, 1 *Brotogeris tirica* e 1 *Amazona aestiva*

Cultivo de *Trichomonas* spp.

Das 262 amostras coletadas (de Franca, Ribeirão Preto, Botucatu e Jundiaí), 70 (26,71%) amostras apresentaram estruturas similares a trofozoítos de *Trichomonas* sp. observados em microscopia de luz, com movimento característico (Figura 9).

Logo após a avaliação microscópica das amostras, foi realizada a extração de DNA Sambrook com o kit DNAeasy Blood e Tissue (Qiagen, Valencia, CA, EUA) para a realização dos ensaios de PCR para detecção e caracterização do *Trichomonas* sp, quadro 1.

Na PCR para a região ITS1/5.8S/ITS2, tivemos apenas uma amostra positiva de *C. livia* de Franca. Já, dois espécimes de Columbiformes amostras do mesmo hospedeiro e localidade foram positivas para o gene *Fe hidrogenase* e nenhuma positiva para o gene de 18S rRna.

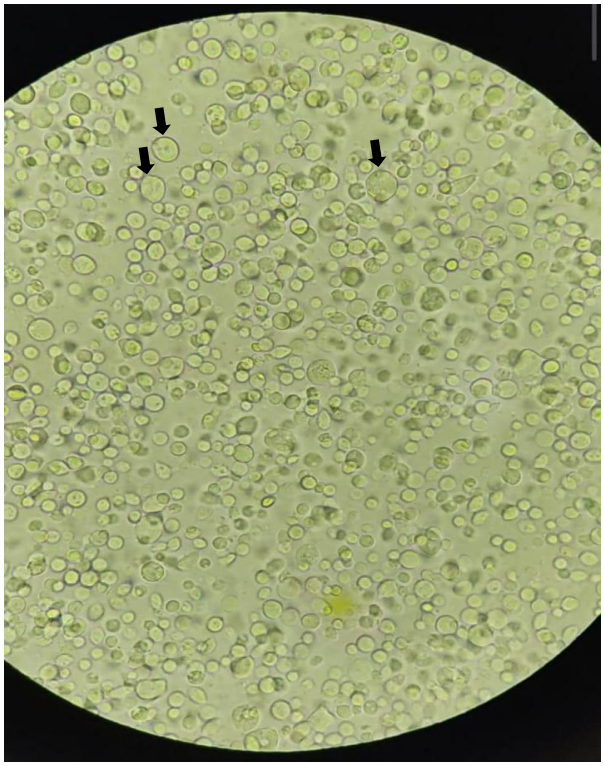

Figura 3. Exame microscópico a fresco da cultura de *Trichomonas* sp., (40x), na seta apresentando pseudocistos de *Trichomonas* sp.

Citologia dos esfregaços de suabes orofaríngeos

Dos 262 esfregaços analisados, somente seis amostras (2,29%) de columbiformes de Franca, apresentaram pseudocistos de *Trichomonas* sp. (Figura 4). Estas amostras foram negativas na cultura.

O restante das amostras apresentou discreta a acentuada quantidade de células escamosas anucleadas e nucleadas. Apenas sete amostras (2,67%) apresentaram moderada quantidade de hemácias, além de células escamosas anucleadas e nucleadas.

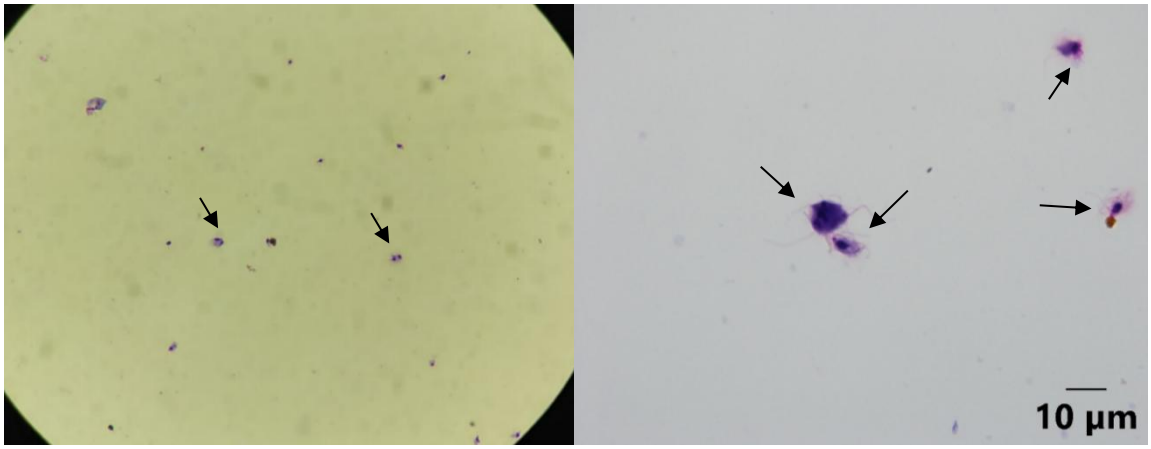

Figura 4. Trofozoítos de *Trichomonas* sp. (seta preta) em preparações de coloração Giemsa (40x A e 100x B).

Extração do DNA e PCR para gene endógeno

No total, foi extraído DNA de 281 suabes orofaríngeos obtidos a partir das aves mantidas em cativeiro. Das 281 amostras extraídas, 276 (98,57%) foram positivas para o gene endógeno *β- actina* de aves.

Na cidade de Franca, todas as amostras (n=121) de DNA extraído a partir dos suabes de pombas mostraram-se positivas para o referido gene. Em Jaboticabal, 18 (94,74% [18/19]) amostras foram positivas, das quais: 12/12 *C. livia*, 2/3 *R. toco,* 1/2 *F. xanthopterygius*, 1/1 *A. ararauna,* 1/1 *A. cunicularia* e 1/1 *V. chilensis.* De Jundiai, 56 (96,5% [56/58]) amostras mostraram-se positivas, sendo 11/11 *R. toco*), 1/1 *N. griséus,* 1/1 *P. perspicillata*, 1/1 *A. clamator*, 2/2 *A. cunicularia*, 6/6 *C. virgata*, 6/6 *C. talpacoti,* 2/2 *Z. auriculata*, 3/3 *C. livia*, 1/1 *R. rufescens*, 4/4 *P. leucophthalmus*, 1/1 *A. aestiva*, 1/1 *B. tirica*, 2/2 *R. magnirostris*, 7/7 *F. sparverius*, 2/2 *C. plancus*, 1/1 *A. cocoi*, 1/1 *T. lineatum* e 3/4 *C. atratus*.

De Botucatu foram 31 (96,87% [31/32]) amostras positivas, 1/1 *S. flaveola*, 2/2 *O, maximiliani*, 2/2 *C. brissonii*, 2/2 *C. cucullatus*, 1/1 *O. angolensis*, 1/1 *S. similis*, 1/1 *G. chopi*, 3/3 *S. caerulescens*, 2/2 *P. sulphuratus*, 2/2 *T. squamata*,1/1 *T. sayaca*, 1/1 *G. guira*, 2/2 *Z. auriculata* 3/3 *R. toco*, 1/1 *B. chiriri*, 4/4 *C. virgata*, 1/1 *T. furcata* e 1/1 *A. cunicularia*.

Por fim, foram positivas 50 (98% [50/51]) amostras oriundas de Ribeirão Preto sendo: 10/10 *C. talpacoti*, 3/3 *S. similis*, 1/1 *C. cela*, 3/3 *T. rufiventris*, 1/1 *P. sulphuratus*, 4/4 *A. cunicularia*, 1/1 *M. choliba*, 5/5 *T. furcata*, 1/1 *N. griséus*, 5/5 *C. atratus*, 2/2 *R. toco*, 3/3 *P. frontalis*, 3/3 *A. auricapillus*, 1/1 *E. aurea*, *, 1*/1 *A. ararauna*, 4/4 *R. magnirostris*, 1/1 *F. sparverius* e 1/1 *M. saturninus*.

PCR e análise das sequências das regiões ITS1/5.8S/ITS2 de *Trichomonas* spp.

Das 276 amostras positivas para o gene endógeno *β- actina* de aves, 76 (27,54%) amostras mostraram-se positivas no ensaio de PCR baseado nas regiões ITS1/5.8S/ITS2 de *Trichomonas*, sendo: 72/121 pombas de Franca, 1/5 *C. atratus* de Ribeirão Preto e 3/12 pombas de Jaboticabal.

Das 76 amostras positivas, foram sequenciados 36 amplicons que mostraram bandas de maior intensidade em gel de agarose. A análise pelo BLASTn mostrou que as sequências de ITS1/5.8S/ITS2 obtidas tinham identidades variando de 93,73% a 100% com sequências de *T. gallinae* detectado em *C. livia* na Espanha (EU881912) e *C. livia* na China (MH733819) (Quadro 3).

A análise filogenética pelo método Bayesiano e modelo evolutivo TIM2+G baseada em um alinhamento de 399 pb das regiões ITS1/5.8S/ITS2 (Figura 5) de *Trichomonas* spp. posicionou as 36 sequências de *T. gallinae* obtidas no presente estudo em dois clados distintos. Todas as sequências obtidas de pombas de Franca e uma de Jaboticabal se alocaram em um clado único com índice de suporte de clados de 85% juntamente com sequências de *T. gallinae* detectadas em Columbiformes amostrados na China, Turquia, Iraque, Egito, EUA, Espanha, Italia, Alemanha e Irã, em Accipitridae (*H. fasciatus* e *B. buteo*) amostrados na Espanha e em um Passeriforme (*S. canaria*) do Irã. Já uma sequência obtida também em pomba oriunda de Jaboticabal foi alocada em um clado formado apenas por ela, próximo a um clado formado por uma sequência detectada em tucano no Brasil.

Trichomonas gallinae, Columba livia, Iraq (OR074524)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Iraq (OR074523)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Iraq (OR074520)
Trichomonas gallinae, Hieraaetus fasciatus, Spain (EU881914)
Trichomonas gallinae, Buteo buteo, Spain (KM246599)
Trichomonas gallinae, Columba livia, China (MH733822)
Trichomonas gallinae, Columba livia, China (MH733821)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Turkey (MN446018)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Iran (KT869156)
Trichomonas gallinae, Spilopelia senegalensis, Iran (KT869153)
Trichomonas gallinae, Columba livia, China (MH733816)
Trichomonas gallinae, Streptopelia turtur, Spain (KX459499)
Trichomonas gallinae, Streptopelia turtur, Spain (KX459498)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Spain (EU881912)
Trichomonas gallinae, Columba palumbus, Germany (KX459475)
Trichomonas sp., Streptopelia turtur, United Kingdom (MT632478)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Iraq (MK418243)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Iraq (MK418258)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Iraq (MK418257)
Trichomonas gallinae, Columba livia, China (MH733819)
Trichomonas gallinae, Columba livia-81, Franca-Brazil (PQ736456)
Trichomonas gallinae, Columba livia-82, Franca-Brazil (PQ740175)
Trichomonas gallinae, Columba livia - 962, Jaboticabal-Brazil (PQ740181)
Trichomonas gallinae, Columba livia-10, Franca-Brazil (PQ740186)
Trichomonas gallinae, Columba livia-22, Franca-Brazil (PQ740191)
Trichomonas gallinae, Columba livia-74, Franca-Brazil (PQ740204)
Trichomonas gallinae, Columba livia-1, Franca-Brazil (PQ740182)
Trichomonas gallinae, Columba livia-6, Franca-Brazil (PQ740183)
Trichomonas gallinae, Columba livia-7, Franca-Brazil (PQ740184)
Trichomonas gallinae, Columba livia-15, Franca-Brazil (PQ740189)
Trichomonas gallinae, Columba livia-17, Franca-Brazil (PQ740190)
Trichomonas gallinae, Columba livia-36, Franca-Brazil (PQ740195)
Trichomonas gallinae, Columba livia-66, Franca-Brazil (PQ740203)
Trichomonas gallinae, Columba livia-70, Franca-Brazil (PQ740206)
Trichomonas gallinae, Columba livia-37, Franca-Brazil (PQ740196)
Trichomonas gallinae, Columba livia-84, Franca-Brazil (PQ740177)
Trichomonas gallinae, Columba livia-41, Franca-Brazil (PQ740197)
Trichomonas gallinae, Columba livia-75, Franca-Brazil (PQ740205)
Trichomonas gallinae, Columba livia-9, Franca-Brazil (PQ740185)
Trichomonas gallinae, Columba livia-12, Franca-Brazil (PQ740187)
Trichomonas gallinae, Columba livia-29, Franca-Brazil (PQ740193)
Trichomonas gallinae, Columba livia-46, Franca-Brazil (PQ740198)
Trichomonas gallinae, Columba livia-48, Franca-Brazil (PQ740199)
Trichomonas gallinae, Columba livia-13, Franca-Brazil (PQ740188)
Trichomonas gallinae, Columba livia-30, Franca-Brazil (PQ740194)
Trichomonas gallinae, Columba livia-62, Franca-Brazil (PQ740201)
Trichomonas gallinae, Columba livia, China (KJ721784)
Trichomonas gallinae, Columba livia-50, Franca-Brazil (PQ740200)
Trichomonas gallinae, Columba livia-83, Franca-Brazil (PQ740176)
Trichomonas gallinae, Columba livia-19 cul, Franca-Brazil (PQ740179)
Trichomonas gallinae, Columba livia-88, Franca-Brazil (PQ740178)
Trichomonas gallinae, Columba livia-58, Franca-Brazil (PQ740180)
Trichomonas gallinae, Columba livia-23, Franca-Brazil (PQ740192)
Trichomonas gallinae, Columba livia, USA (EU215362)
Trichomonas gallinae, Columba palumbus, Germany (KX459477)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Turkey (MN453786)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Egypt (LC136936)
Trichomonas gallinae, Columba livia, China (MH733818)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Iran (OQ689969)
Trichomonas gallinae, Columba livia, Iran (OQ689967)
Trichomonas gallinae, Serinus canaria, Iran (KT869152)
Trichomonas gallinae, Columba livia-1.2, Franca-Brazil
Trichomonas gallinae, Columba livia-19.2, Franca-Brazil
Trichomonas gallinae, Columba livia-63, Franca-Brazil
Trichomonas gallinae, Streptopelia turtur, Italy (KX459505)
Trichomonas gallinae, Streptopelia turtur, Italy (KX459513)
Trichomonas gallinae, Aquila pennata, Spain (KP900042)
Trichomonas gallinae, Carduelis carduelis, Austria (OL678503)
Trichomonas gallinae, Fringilla montifringilla, Austria (OL678502)
Trichomonas gallinae, Chloris chloris, Austria (OL678495)
Trichomonas gallinae, Chloris chloris, Netherlands (MN385401)
Trichomonas gallinae, Asio otus, Spain (KF993704)
Trichomonas gallinae, Melopsittacus undulatus, Iran (OQ689973)
Trichomonas gallinae, Serinus canaria f. domestica, Slovenia (KX584000)
Trichomonas gallinae, Melopsittacus undulatus, Japan (MZ128144)
Trichomonas gallinae, Patagioenas fasciata monilis, USA (KC215388)
Trichomonas gallinae, Streptopelia turtur, Malta (KX844984)
Trichomonas sp., Streptopelia turtur, Spain (KX459487)
Trichomonas sp., Streptopelia turtur, Italy (KX459502)
Trichomonas sp., Spilopelia senegalensis, Senegal (OM417014)
Trichomonas tenax, Streptopelia turtur, Italy (KX459501)
Trichomonas tenax, Columba palumbus, Germany (KX459456)
Trichomonas tenax, Columba palumbus, Germany (KX459457)
Trichomonas sp., Spilopelia senegalensis, Senegal (OM417015)
Trichomonas gallinae, Streptopelia turtur, Malta (KX844989)
Trichomonas gallinae, Columba oenas, Germany (KX459450)
Trichomonas gallinae, Streptopelia turtur, Italy (KX459507)
Trichomonas gallinae, Columba oenas, Germany (KX459448)
Trichomonas gallinae, Streptopelia turtur, Spain (KX459494)
Trichomonas gallinae, Streptopelia turtur, Italy (KX459514)
Trichomonas sp., Columbina passerina, USA (EU215359)
Trichomonas sp., Zenaida macroura, USA (KC215391)
Trichomonas sp., Columba livia - 889, Jaboticabal-Brazil (PQ740207)
Trichomonas vaginalis, human, Turkey (KP861812)
Trichomonas vaginalis, human, Iraq (ON753730)
Trichomonas vaginalis, human, Turkey (KP987799)
Trichomonas vaginalis, human, Turkey (KP861811)
Tetratrichomonas gallinarum, chicken, Netherlands (MK496870)
Tetratrichomonas gallinarum, Alectoris rufa, United Kingdom (LK031731)
Pentatrichomonas hominis (AY758392)
Pentatrichomonas hominis (ON311004)

Figura 5. Análise filogenética inferida pelo método Bayesiano e modelo evolutivo TIM2+G de um alinhamento de 399 pb de sequências ITS1/5.8S/ITS2 de *Trichomonas* spp. *Pentatrichomonas hominis* foram utilizadas como grupo externo.

Em relação a análise de diversidade genética, foram analisadas um total de 96 sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e obtidos 18 genótipos diferentes dos quais, dois representados por sequências detectadas nas aves amostradas no presente estudo (genótipos #4 e #14). Os resultados dos cálculos de diversidade estão presentes no Quadro 3.

O genótipo #4 foi separado dos genótipos #2 e #5 por apenas um evento mutacional e composto por todas as sequências detectadas em Franca juntamente com uma sequência de Jaboticabal e com outras sequências detectadas em *C. livia, S. turtur, C. palumbus* e *H. fasciatus* amostradas no Irã, China, Reino Unido, Espanha, Turquia e Egito. Já o genótipo #14 separou-se do genótipo #15 por apenas um evento mutacional, e foi composto por uma sequência de Jaboticabal e uma sequência detectada em Pelotas, RS em *Ramphastos dicolorus* (Figura 6).

Gene	**bp**	**N**	**VS**	**GC %**	**G**	**gd (mean ± SD)**	**π (mean ± SD)**	**K**
Região intergênica ITS1-5.8S-ITS2	321	96	100	34	18	0.588±0.059	0.03375±0.00705	9.75417
Fe hidrogenase	851	118	107	53.9	27	0.893±0.013	0.02159±0.00305	17.40417
18S rRNA	1,351	45	98	48.9	13	0.804±0.040	0.00927±0.00302	11.80

N= número de sequências analisadas; VS= número de variáveis de sítio; GC%= conteúdo de G+C; g= número de genótipos; gd= diversidade de genótipos; SD=

desvio padrão; π= diversidade de nucleotídeos (por sítio); K= número de diferença de nucleotídeos.

Quadro 3. Diversidade genética e polimorfismo das sequências ITS, *Fe hidrogenase* e 18S rRNA de *Trichomonas* sp.

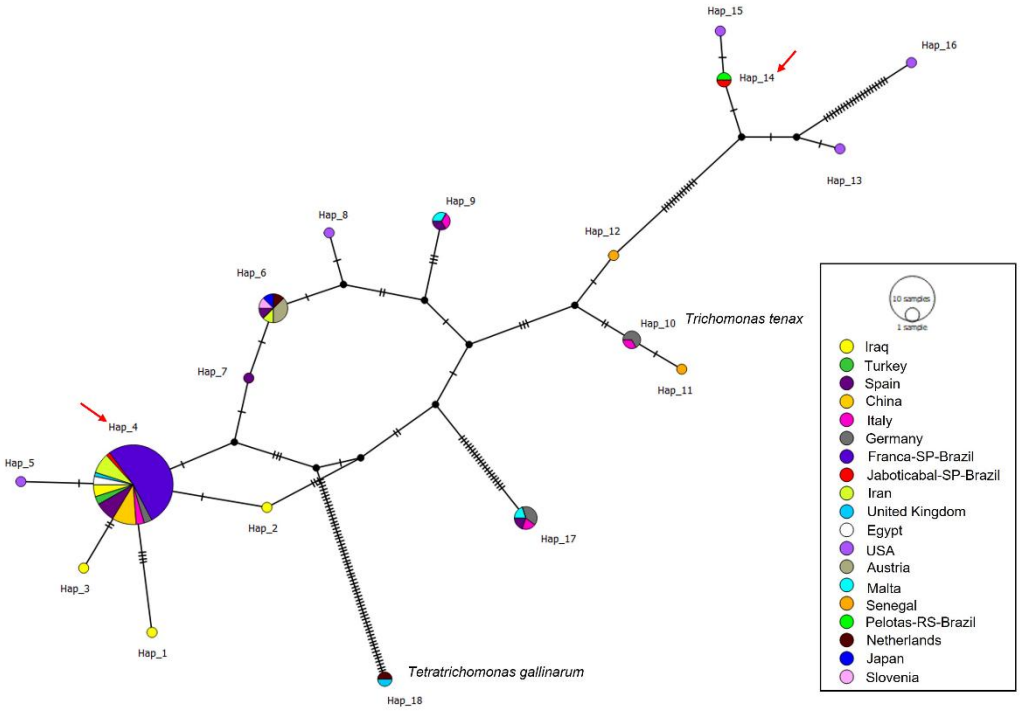

Figura 6. Rede de genótipos baseada nas regiões ITS1-5.8S-ITS1 de *Trichomonas* spp. As cores representam as localidades das quais foram detectadas as sequências utilizadas nas análises, os pontos pretos representam median-vectors (genótipos não contemplados na análise), as linhas pretas verticais representam a quantidade de eventos mutacionais entre um genótipo e outro. Seta vermelha indicando genótipos: #4 e #14.

PCR e análise das sequências do gene *Fe hidrogenase* de *Trichomonas* spp.

Para o gene *Fe hidrogenase*, das 76 amostras analisadas, 65 (85,57%) mostraram-se positivas, sendo todas oriundas de pombas amostradas em

Franca. A análise pelo BLASTn mostrou que as 65 sequências obtidas possuem identidades variando de 98% a 100% com sequências de *T. gallinae* detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha (Quadro 6). A análise filogenética pelo método Bayesiano e modelo evolutivo TIM2+I+G de um alinhamento de 879 pb do gene *Fe hidrogenase* (Figura 7) posicionou as sequências de *Fe hidrogenase* de *T. gallinae* detectadas em aves do estudo em cinco grandes clados distintos, com índices de suporte de clados variando de 60 a 100%. Dois clados foram compostos unicamente por sequências detectadas em Franca-SP. Em um clado as sequências se alocaram juntamente com sequências detectadas em Columbiformes (*C. livia* - USA, Canada, *S. decaocto* - Espanha) e Accipitridae (*A. fasciata* - Espanha, *A. gentilis* – Espanha). Outro clado foi formado por sequências do presente estudo e uma sequência de *T. gallinae* detectada na Holanda. O último clado foi formado por uma sequência detectada em Franca e outra detectada em um Passeriforme (*S. canaria*) no Japão.

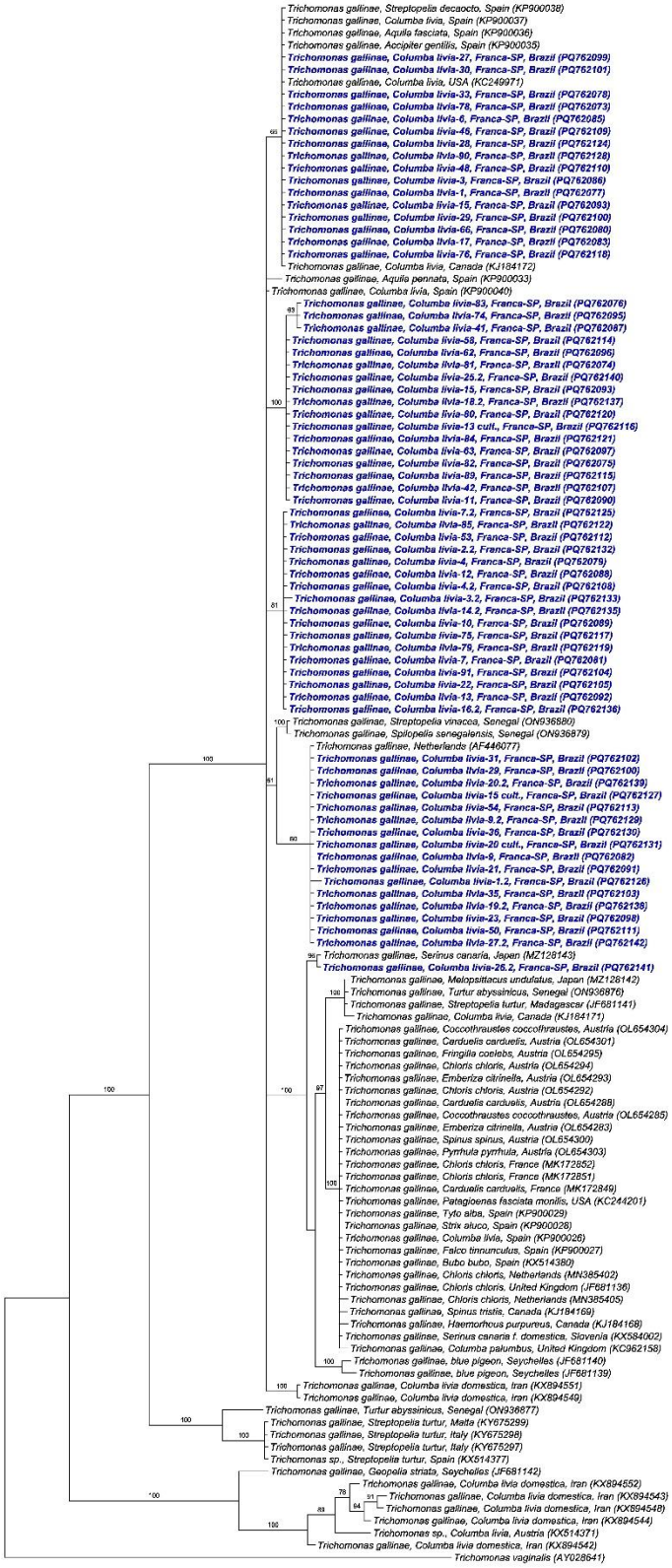

Figura 7. Análise filogenética inferida pelo método Bayesiano e modelo evolutivo TIM2+G de um alinhamento de 879 pb de sequências do gene *Fe hidrogenase*

de *Trichomonas* spp. *Pentatrichomonas hominis* foram utilizadas como grupo externo. *Trichomonas vaginalis* foi utilizado como grupo externo.

A análise de diversidade de genótipos foi realizada com 118 sequências do referido gene. Foram obtidos 27 genótipos diferentes, e as sequências detectadas no presente estudo se distribuíram em seis genótipos distintos, dos quais: #1, #4, #5, #6, #7 e #8. Três genótipos (#4, #5 e #6) foram compostos apenas por amostras de Franca, SP. Já o genótipo #1 foi formado por 15 sequências de Franca, junto com sequências detectadas em *S. decaocto, C. livia, A. gentilis, R. pigeon* na Espanha, Canadá e EUA, respectivamente. Já o genótipo #7 foi formado por 14 sequências obtidas em pombos de Franca e sequências detectadas em *C. chloris* de Amsterdã (**Figura 8**). Todos os genótipos contendo sequências do presente estudo, com exceção do genótipo #4, o qual separou-se do genótipo 5 por um evento mutacional, separaram-se de median vectors por um evento mutacional.

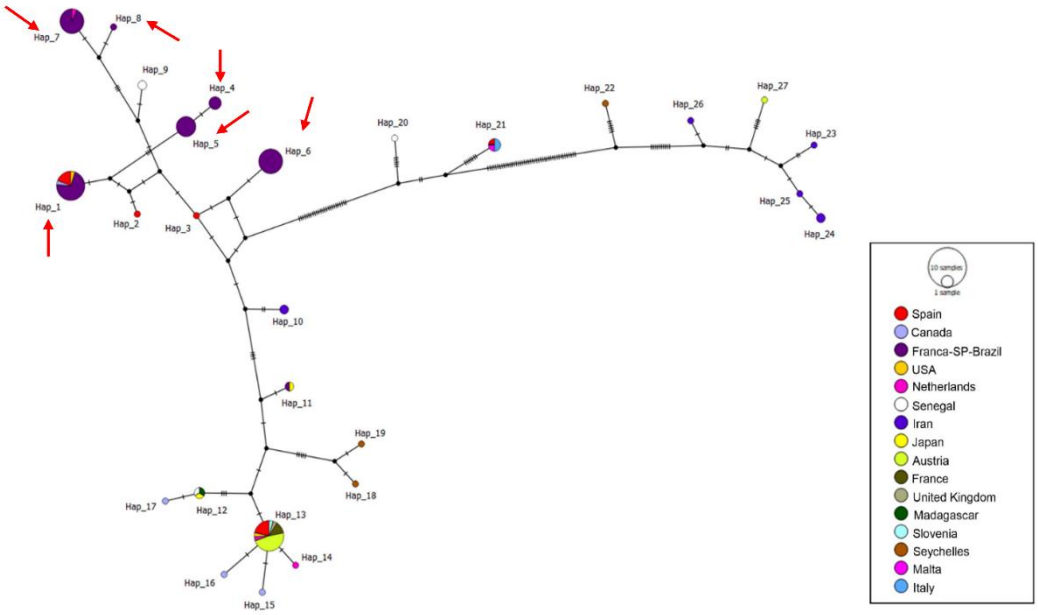

Figura 8. Rede de genótipos baseada no gene *Fe hidrogenase* de *Trichomonas* spp. As cores representam as localidades das quais foram detectadas as sequências utilizadas nas análises, os pontos pretos representam median-vector

(sequências não contempladas na análise), as linhas pretas verticais representam a quantidade de eventos mutacionais entre um genótipo e outro. Seta vermelha indicando genótipos #1, #4, #5, #6, #7 e #8.

PCR e análise das sequências do gene 18S rRNA de*Trichomonas* spp.

Das 76 amostras analisadas, obtivemos um total de 65 (85,5%) amostras positivas para o gene 18S rRNA, sendo todas as amostras oriundas de *C. livia* de Franca. Destas, apenas sete amostras foram passíveis de sequenciamento.

A análise pelo BLASTn mostrou que as sequências obtidas tinham identidades variando de 99% a 100% com sequências de *T. gallinae* detectado em *E. dove* nos EUA e *C. livia* em Portugal (Quadro 6).

Por fim, a análise filogenética pelo método Bayesiano e modelo evolutivo GTR+I+G baseada em um alinhamento de 1424 pb do gene 18S rRNA (Figura 9), posicionou as sequências obtidas no presente estudo em quatro clados distintos, com índice de suporte de clados variando de 91 a 100%. Dois clados foram compostos apenas por sequências detectadas em pombas de Franca, sendo que um deles foi formado por uma única sequência e alocou-se próximo a um clado contendo sequências de *T. gallinae* detectado em *C. livia*, *C. palumbus* e *B. buteo* nos EUA, Espanha e Portugal. Os outros dois clados foram compostos por sequências do presente estudo juntamente com sequências detectadas em Columbiformes do Irã, Hungria, Portugal, Espanha e EUA.

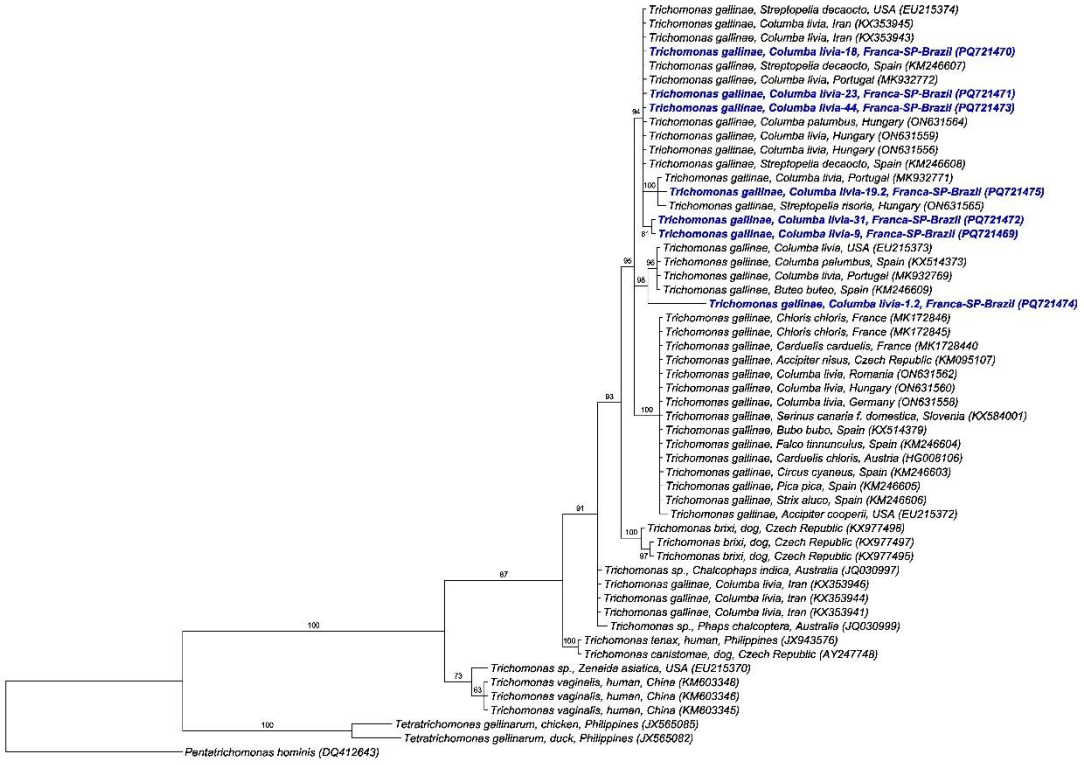

Figura 9. Análise filogenética inferida pelo método Bayesiano e modelo evolutivo GTR+I+G de um alinhamento de 1424pb de sequências do gene 18S rRNA de *Trichomonas* spp. *Pentatrichomonas hominis* foi utilizads como grupo externo.

Na análise de genótipos, foram utilizadas 45 sequências do gene 18S rRNA que se distribuíram por 13 genótipos diferentes. As sequências detectadas no presente estudo compuseram três genótipos distintos (#1, #3 e #10). O genótipo #1 foi composto por 5 sequências de Franca, junto com sequências detectadas em *C. livia, S. decaocto, C. palumbus*, na Espanha, Portugal, Hungria, Romênia, USA e Iran. Os genótipos #3 e #10 foram compostos apenas por sequências obtidas em amostras de Franca. O genótipo #10 separou-se de um *median vector* a partir de nove eventos mutacionais (Figura 10).

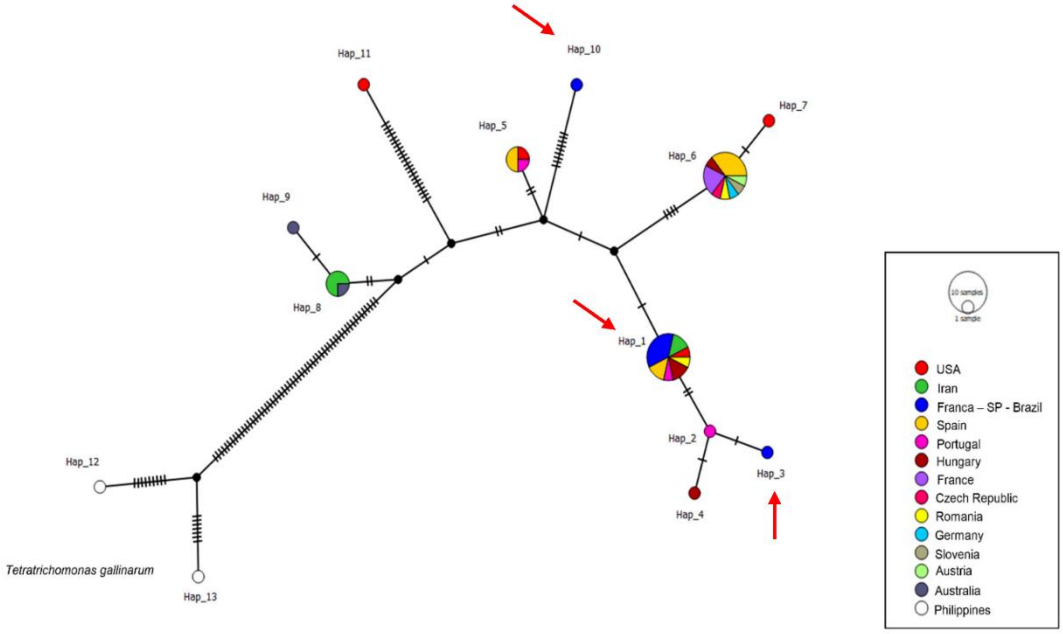

Figura 10. Rede de genótipos baseada no gene 18S rRNA de *Trichomonas* spp. As cores representam as localidades das quais foram detectadas as sequências utilizadas nas análises, os pontos pretos representam median-vector (sequências não contempladas na análise), as linhas pretas verticais representam a quantidade de eventos mutacionais entre um genótipo e outro. Seta vermelha indicando genótipos #1, #3 e #10.

Discussão

Os hospedeiros primários de *T. gallinae* são Columbiformes, particularmente pombos (*C. livia*), o que explica o grande número de amostras positivas de swab do trato digestivo superior neste estudo (McDougald, 1991). A tricomoníase aviária é uma doença parasitária que afeta uma ampla gama de espécies de pássaros, incluindo pássaros selvagens e de estimação em todo o mundo. Conforme observado, a maioria dos pássaros positivos em nosso estudo compartilha hábitos alimentares semelhantes, como consumir sementes e frutas, com alguns sendo insetívoros (Girard et al., 2014). O consumo compartilhado de frutas e sementes pode facilitar a contaminação de alimentos e, consequentemente, a infecção de outras aves, especialmente se uma ave

infectada se alimentar junto com outras (Timm & Timm, 2021). Isso ficou evidente em nosso trabalho, pois os pombos em Franca viviam juntos em um único recinto. Considerando que amostramos pombos-correios, esses animais tinham horários definidos para sair e retornar, onde todas as aves tinham contato umas com as outras e compartilhavam água e ração. Essas aves, participando de competições, foram transportadas para um ponto de partida onde poderiam retornar ao seu local de origem, potencialmente auxiliando na disseminação do agente para outras aves que compartilhavam comida e água durante a jornada.

Nenhuma lesão ou sinal clínico foi observado nas aves amostradas neste estudo. Anteriormente, lesões no trato respiratório superior devido à tricomoníase foram relatadas anteriormente em passeriformes (*Haemorhous mexicanus*) em Bakersfield, Condado de Kern, CA, EUA (St Leger & Shivaprasad, 1998; Dorrestein, 2009). Sinais como perda de peso, penas eriçadas, vômitos, dispneia, disfagia e diarreia foram descritos em aves positivas para o agente (Narcisi et al., 1991). Aves infectadas podem permanecer assintomáticas devido à infecção por cepas avirulentas de *Trichomonas* spp. ou menor suscetibilidade resultante de maior imunidade, como observado em aves adultas (Forrester & Foster, 2008). Isso está de acordo com nosso estudo, pois todas as aves eram adultas e assintomáticas.

A ocorrência de *T. gallinae* encontrada em pombos (75,08%) foi semelhante aos valores relatados por Villanua et al. (2006) em 91 amostras de *C. palumbus* na Espanha (34,2%) e por Sansano-Maestre et al. (2009) em 102 amostras de *C. livia* na Espanha (52,7%). Dados de prevalência encontrados em Columbidae por vários autores em todo o mundo variam muito, variando de 5,6% (226/4052) na pomba-de-luto (*Z. macroura*) no sul da Flórida (Schulz et al., 2005) a 95% (77/362) entre a pomba-de-colar-eurasiana (*Z. asiatica*) nos EUA (Conti & Forrester, 1981). Na Espanha, Hofle et al. (2004) relataram um surto de tricomoníase no Sul afetando 15% (2/6) dos pombos-torcazes-eurasianos (*C. palumbus*).

A diversidade genética de *Trichomonas* spp. foi extensivamente estudada na América do Norte e na Europa (Gerhold et al., 2008). Uma variedade de

marcadores moleculares foi descrita, visando principalmente as regiões ITS1-5.8S rRNA-ITS2 e 18S rRNA (Gerbod et al. 2004; Cepicka et al. 2005; Grabensteiner & Hess, 2006). As regiões ITS não são codificadoras e, portanto, evoluem mais rapidamente. A região 5.8S rRNA é comumente usada para detectar e genotipar *T. gallinae*. A análise das regiões ITS tem sido usada para comparação molecular e distinção de variações intraespecíficas de tricomonas (Felleisen, 1997) e outros protozoários (Brown et al., 2004). Os primers que amplificam o gene 18S rRNA foram projetados para detectar *T. gallinae* e *T. gallinarum* e aplicados com sucesso em um estudo de campo relatando uma prevalência de até 31,8% de tricomonas em bandos de pássaros na Alemanha (Chi et al., 2013). Primers baseados no gene *Fe-hidrogenase* foram desenvolvidos para auxiliar na genotipagem de *T. gallinae* (Chi et al., 2013).

Na inferência filogenética baseada em ITS1-5.8S-ITS2, as sequências detectadas no estudo foram distribuídas em dois clados, com a maioria de nossas sequências agrupadas com genótipos detectados anteriormente em Columbiformes, Falconiformes e Passeriformes. O outro clado foi composto exclusivamente de uma única sequência detectada em Jaboticabal. Este resultado corroborou com a análise do genótipo, na qual as sequências detectadas neste estudo compreenderam dois genótipos distintos. Nas análises filogenéticas para os outros genes, uma distribuição mais ampla de sequências foi observada em um número maior de clados: seis clados para *Fe-hidrogenase* e quatro para 18S rRNA. A maioria desses clados foi composta apenas de sequências deste estudo ou, quando misturadas, elas se agruparam principalmente com sequências detectadas em Columbiformes e Falconiformes. Ambos os resultados também corroboraram as análises de genótipos e valores de K. Adicionalmente, observou-se que houve uma maior diferenciação no número de genótipos na análise do gene *Fe-hidrogenase* quando comparado aos demais. Esse achado pode ser explicado por se tratar de uma cópia única e fornecer genotipagem de maior resolução, facilitando a discriminação de amostras de *T. gallinae* em comparação com regiões intergênicas (Alrefaei et al., 2019).

A ocorrência de diferentes genótipos, bem como a distribuição em diferentes clados, foi descrita na literatura. A esse respeito, Gerhold et al. (2008) primeiramente descrevem diversidade genética significativa em *Trichomonas* spp., relatando 12 grupos diferentes de sequências ITS1-5.8S-ITS2. Grabensteiner et al. (2010) relataram a existência de diferentes genótipos de *T. gallinae*, demonstrando que esta espécie é um complexo com diversas variantes genéticas, com base em análises do gene *Fe-hidrogenase* e da região ITS. No entanto, mais estudos são necessários para entender se essas variantes genéticas realmente representam uma única espécie com variantes diferentes ou se são espécies diferentes.

A cultura tem sido o padrão ouro para detectar *Trichomonas* spp., pois é fácil de interpretar e fornece resultados válidos mesmo em aves assintomáticas (Mohamed et al., 2016). O meio de cultura para detecção de *Trichomonas* provou ser mais sensível do que esfregaços frescos usando apenas solução salina (montagem úmida). Vários autores relataram resultados superiores quando ambos os métodos foram aplicados (Fouts & Kraus, 1980; Cooper & Petty, 1988; Bunbury et al. 2011).

De acordo com Diamond (1986), a adição de soro bovino fetal foi considerada essencial para o crescimento de isolados de *Trichomonas* spp. em cultura, pois é uma fonte rica de aminoácidos, ácidos graxos e alguns oligoelementos. Em nosso estudo, a cultura provou ser mais sensível para detectar *T. gallinae* em comparação com a análise de esfregaços de swab oral corados com Giemnsa, corroborando resultados de estudos anteriores (Raza et al., 2018; Saikia et al., 2022)). No entanto, a cultura não é usada em exames de rotina por ser trabalhosa e cara (Diamond 1954, Kocan & Knisley 1970).

O tempo de incubação em cultura é um parâmetro vital que mede a eficiência da identificação do crescimento do protozoário (Cover et al., 1994). Neste estudo, encontramos diferenças significativas no tempo de incubação para o meio Diamond, pois foi insuficiente para o crescimento do protozoário após o primeiro dia (24 horas na incubadora); de fato, o crescimento só foi observado

após 48 horas e 60 horas (dados não mostrados). Após 72 horas, se os nutrientes não fossem suplementados no meio de cultura, o protozoário morria.

Durante o período de cultura, encontramos frustrações, como na primeira coleta para teste. Após 72 horas de avaliação, congelamos os tubos de ensaio e notamos dificuldade significativa na extração de DNA do material. Após repetir a coleta, seguindo avaliações até 72 horas, extraímos o DNA imediatamente, obtendo três amostras positivas para *Trichomonas gallinae*. A ausência de congelamento provou ser melhor; no entanto, o número de amostras positivas na PCR foi baixo quando comparado ao número de amostras apresentando tricomonas em cultura (70, 40,69%). Este resultado é provavelmente devido à presença de inibidores de PCR no meio de cultura, o que dificultou a extração do material genético.

Dos 262 pombos, trofozoítos de *T. gallinae* foram encontrados em apenas seis (2,29%) esfregaços orofaríngeos, demonstrando a baixa sensibilidade desta técnica em comparação com a cultura e ensaios moleculares. Neste estudo, trofozoítos de *T. gallinae* assemelharam-se morfologicamente aos descritos por Mohamed et al. (2016).

Além de T. gallinae, espécies como *Trichomonas vaginalis-like* foram identificadas em pombos e corujas (Gerhorld et al., 2008; Ecco et al., 2012), enquanto *Trichomonas tenax* foi detectado em vários pombos da Europa (Lennon et al., 2013). *Trichomonas gypaetinii* foi encontrado em abutres e águias (Kelly-clark et al., 2013; Martínez-díaz, et al., 2015). Além disso, novas variantes, como *Trichomonas stlaberi* e *Trichomonas canistomae-like*, também foram detectadas em *Streptopelia turtur* e *Acciptes gentilis* na Espanha, sugerindo uma complexidade ainda maior na diversidade desses parasitas em aves.

Aves da ordem Columbiformes são afetadas por esse agente e, segundo a literatura existente, os pombos representam o principal reservatório do parasita em várias cidades do estado de São Paulo (referências). Zoológicos, centros de reabilitação e centros de pesquisa animal devem avaliar a liberação de animais que sobrevivem após a infecção por *Trichomonas* spp., pois esses indivíduos

podem ficar assintomáticos por anos, potencialmente contribuindo para a disseminação do parasita.

CONCLUSÃO

Em conclusão, alta ocorrência para *T. gallinae* foi encontrada em pombos no presente estudo, confirmando o papel destes animais como principais hospedeiros para o agente. O ensaio de PCR mostrou ser a melhor ferramenta para o diagnóstico e investigação epidemiológica-molecular da infecção por *T. gallinae.* A análise de esfregaços de suabes orofaríngeos de aves, embora seja rápida e de fácil realização, mostrou baixa sensibilidade para diagnóstico da infecção por *T. gallinae* e não deve ser utilizada como único método laboratorial no diagnóstico da tricomonose. Embora o cultivo do parasito em meio Diamond mostre boa sensibilidade na detecção do parasito, a amostra deve ser acondicionada no referido meio e em estufa a 37°C assim que coletada, dificultando o emprego desta técnica em estudos epidemiológicos em localidades remotas. Diferentes genótipos de *T. gallinae* ocorrem em pombos na região sudeste do Brasil. *Fe hidrogenase* mostrou ser o marcador molecular com maior capacidade de diferenciar genótipos de *T. gallinae* quando comparados à região ITS-1-5.8S-ITS-2 e 18S rRNA.

RECONHECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o número 2021/05961-5 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pela CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal - SP (protocolo número 732/21) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por meio do Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO número 77538-1)

DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os conjuntos de dados gerados e analisados durante o estudo atual estão disponíveis na plataforma NCBI Genbank Nucleotide (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) e podem ser acessados por meio dos números de acesso: PQ736456, PQ740175- PQ740209 para a região ITS1-5.8S rRNA-ITS2; PQ762073- PQ762142 para o gene *Fe hidrogenase*; PQ721469-PQ721475 para o gene 18S rRNA.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

Alabí Córdova AS, Fecchio A, Calchi AC, Dias CM, Machado RZ, André MR. Molecular evidence of Bartonella spp. in tropical wild birds from the Brazilian Pantanal, the largest wetland in South America. Veterinary Research Communications, 20241: 1-10, 2024. https://dx.doi.org/10.1007/s11259-024-10341-z

Alrefaei AF, Gerhold RW, Nader JL, Bell DJ, Tyler KM. Improved subtyping affords better discrimination of *Trichomonas gallinae* strains and suggests hybrid lineages, Infection, Genetics and Evolution, 2019: 73; 234–241. https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.007.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology, 1990: 215(3): 403-410. https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Arabkhazaeli, F, Madani, SA, Ghorbani, A. Parasitological and molecular survey of scattered parasitism by trichomonads in some avian species in Iran. Avian

Pathology, 2020: 49 (1); 47-55, 2020. https://dx.doi.org/10.1080/03079457.2019.1662369

Arenales, A, Almeida, ACO, Prado, LF, Garcia, S, Luvizotto, MCR. Cytopathology in the diagnosis of oral trichomoniasis in a Rock Pigeon (Columba livia). 2014.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular biology and evolution 1999: 16(1); 37-48. https://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

Baker, JR. Trichomoniasis, a major cause of vomiting in budgerigars. The Veterinary Record, 1986: 118 (16); 447-449. https://dx.doi.org/10.1136/vr.118.16.447

Borchardt KA, Smith RF. An evaluation of an InPouch TV culture method for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. Genitourinary medicine 1991: 67(2); 149. https://dx.doi.org/10.1136/sti.67.2.149

Borji H, Razmi GH, Movassaghi AH, Moghaddas E, Azad M. Prevalence and pathological lesion of *Trichomonas gallinae* in pigeons of Iran. Journal of Parasitic Diseases 2011: 35; 186-189. https://dx.doi.org/10.1007/s12639-021-01358-1

Bulbul KH, Shahardar R. Allaie IM. Wani ZA. Tramboo SR. Ashraf, A.; Shubeena, S. Avian trichomonosis with special reference to pigeon. International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry 2018: 3; 11-13. http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2023/11.10.1690.1696

Bunbury N, Jones CG, Greenwood AG, Bell DJ. Epidemiology and conservation implications of *Trichomonas gallinae* infection in the endangered Mauritian pink pigeon. Biol Conserv 2008: 141:153–161. https://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2007.09.008

Bunbury N, Tyler KM. A clonal strain of *Trichomonas gallinae* is the aetiologic agent of an emerging avian epidemic disease. Infection, Genetics and Evolution 2011: 11(7); 1638-1645. https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.06.007

Cepicka I, Kutišová K, Tachezy J, Kulda J, Flegr J. Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. Veterinary Parasitology 2005: 128 (1-2); 11-21. https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.003

Chi JF, Lawson, B, Durrant C, Beckmann K, Alrefaei AF, Kirkbride K, Bell DJ. Cunningham, A. A.; Tyler, K. M. The finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae* is predominant in British non-passerines. Parasitology. 140: 1234–1245. 2013. https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.003

Conti JA, Forrester DJ. Interrelationships of parasites of white-winged doves and mourning doves in Florida. Journal of Wildlife Diseases 1981: 17(4); 529-536. https://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-17.4.529

Cooper JE, Petty SJ. Trichomoniasis in free-living goshawks (*Accipiter gentilis gentilis*) from Great Britain. Journal of Wildlife Diseases, 1988: 24(1); 80-87. https://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-24.1.80

Cover AJ, Harmon WM, Thomas MW. A new method for the diagnosis of *Trichomonas gallinae* infection by culture. Journal of Wildlife Diseases, 1994: 30(3); 457-459. https://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-30.3.457

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. Nature methods, v. 9, n. 8, p. 772, 2012. https://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109

Da Silva DG, Barton E, Bunbury N, Lunness P, Bell DJ, Tyler KM. Molecular identity and heterogeneity of trichomonad parasites in a closed avian population.

Infection, Genetics and Evolution, 2007: 7(4); 433-440. https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2007.01.002

Diamond LS. A comparative study of 28 culture media for *Trichomonas gallinae*. Experimental Parasitology, 1954: 3(3): 51-258. https://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(54)90024-7

Diamond LS. In Vitro Cultivation of The Trichomonadidae: A State-of-The-Art Review. Biologica 30: 221-22, 1986.

El-Khatam AO, Aboulaila MR, Ibrahim M, Abdel-Gaber MM. *Trichomonas gallinae*: Prevalence and molecular characterization from pigeons in Minoufiya governorate, Egypt. Exp Parasitol. 2016. https://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.016

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome research, 1998: 8(3); 186-194. https://dx.doi.org/10.1101/gr.8.3.186

Felleisen RSJ. Comparative sequence analysis of 5· 8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. Parasitology, 1997: 115(2);111-119. https://dx.doi.org/10.1017/S0031182097001212

Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method. The American Naturalist, 1985: 125(1); 1-15. https://dx.doi.org/10.1086/703055

Forrester, D.J.; Foster, D.W. Trichomonosis. In C.T. Atkinson, N.J. Thomas, & D.B. Hunter (Eds.). Parasitic Diseases of Wild Birds. p.120–153. Ames: Wiley-Blackwell. 2008.

Forzán MJ, VandersticheL R, Melekhovets YF, Mcburney S. Trichomoniasis in finches from the Canadian Maritime provinces--An emerging disease. Can Vet J, 2010: 51(4); 391. PMC2839828

Fouts AC, Kraus SJ. *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. Journal of Infectious Diseases, 1980: 141(2); 137-143. https://dx.doi.org/10.1093/infdis/141.2.137

Ganas P, Jaskulska B, Lawson B, Zadravec M, Hess M Bilic, I. Multi-locus sequence typing confirms the clonality of *Trichomonas gallinae* isolates circulating in European finches. Parasitology, 2014: 141(5); 652-661. https://dx.doi.org/10.1017/S0031182013002023

Gerbod D, Sanders E, Moriya S, Noël C, Takasu H, Fast NM, Viscogliosi E. Molecular phylogenies of Parabasalia inferred from four protein genes and comparison with rRNA trees. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004: 31(2); 572-580. https://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2003.09.013

Gerhold RW, Yabsley MJ, Smith AJ, Ostergaard E, Mannan W, Cann JD, Fischer JR. Molecular characterization of the *Trichomonas gallinae* morphologic complex in the United States. Journal of Parasitology, 2008: 94(6); 1335-1341. https://dx.doi.org/10.1645/GE-1585.1

Girard, YA, Rogers, KH, Woods, LW, Chouicha, N, Miller, WA, Johnson, CK. Dual-pathogen etiology of avian trichomonosis in a declining band-tailed pigeon population. Infection, Genetics and Evolution, 2014: 24; 146-156. https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.002

Glez-Peña D, Reboiro-Jato M, Maia P, Rocha M, Díaz F, Fdez-Riverola F. AIBench: a rapid application development framework for translational research in biomedicine. Computer methods and programs in biomedicine, 2010: 98(2); 191-203. https://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2009.12.003

Grabensteiner, E.; Hess, M. PCR for the identification and differentiation of Histomonas meleagridis, *Tetratrichomonas gallinarum* and Blastocystis spp. Veterinary Parasitology, 2006: 142(3-4); 223-230. https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.011

Grunenwald C, Sidor I, Mickley R, Dwyer C, Gerhold R. *Tetratrichomonas* and *trichomonas* spp.-associated disease in free-ranging common Eiders (Somateria mollissima) from Wellfleet Bay, MA and description of ITS1 region genotypes. Avian diseases, 2018: 62(1); 117-123. https://dx.doi.org/10.1637/11742-080817-Reg.1

Gupta SD, Islam M, Kamal T, Faruque MRAL, Faruk MS. The confirmatory diagnosis and therapeutic management of canker in pigeons. Res J. Vet. Pract, 2023:11(2); 20-25. http://dx.doi.org/10.17582/journal.rjvp/2023/11.2.20.25

Hara LG, Pereira AG, Amorim CS, Lefort F, Werther K. Pesquisa de *Trichomonas gallinae* em pulmão e fígado de aves selvagens, 2023.

Höfle U, Gortázar C, Ortiz JA, Knispel B, Kaleta EF. Outbreak of trichomoniasis in a woodpigeon (*Columba palumbus*) wintering roost. European Journal of Wildlife Research, 2004: 50; 73-77. https://dx.doi.org/10.1007/s10344-004-0043-2

Kaufman RH, Faro S, Brown D. Benign diseases of the vulva and vagina. (No Title), 1989.

Kleina P, Bettim-Bandinelli J, Bonatto SL, BenchimoL M, Bogo MR. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8 S rRNA and ITS-2 sequences. International journal for parasitology, 2004: 34(8); 963-970. https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.04.004

Kocan RM, Knisley JO. Challenge infection as a means of determining the rate of disease resistant *Trichomonas gallinae*-free birds in a population. Journal of Wildlife Diseases, 1970: 6(1): 13-15. https://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-6.1.13

Lawson B, Cunningham AA, Chantrey J, Hughes LA, John SK, Bunbury N, Tyler KM. A clonal strain of *Trichomonas gallinae* is the aetiologic agent of an emerging

avian epidemic disease. Infection, Genetics and Evolution, 2011: 11(7); 1638-1645. https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.06.007

Leigh JW, Bryant D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in ecology and evolution, 2015: 6(9); 1110-1116. https://dx.doi.org/10.1111/2041-210X.12410

Librado P, Rozas, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 2009: 25(11); 1451-1452. https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187

Mcburney S, Kelly-Clark WK, Forzan MJ, Lawson B, Tyler KM, Greenwood SJ. Molecular characterization of *Trichomonas gallinae* isolates recovered from the Canadian Maritime provinces' wild avifauna reveals the presence of the genotype responsible for the European finch trichomonosis epidemic and additional strains. Parasitology, 2015: 142(8); 1053-1062. https://dx.doi.org/10.1017/S0031182015000281

Mehlhorn H, Al-Quraishy S, Aziza A, Hess M. Fine structure of the bird parasites *Trichomonas gallinae* and *Tetratrichomonas gallinarum* from cultures. Parasitology Research. 2009: 105, 751-756. https://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1451-8

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. In: Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: extreme digital discovery. 2011. 1-8. https://dx.doi.org/10.1145/2016741.2016785

Mohamed HM, Saad AS, Khalifa MM, Abdel-Maogood SZ, Awadalla SM, Mousa WM. Detection and molecular characterization of *Trichomonas gallinae* recovered from domestic pigeons in Egypt. Parasitology Research, 2023: 122(1); 257-263. https://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4_4472

Narcisi EM, Sevoian M, Honigberg BM. Pathologic changes in pigeons infected with a virulent *Trichomonas gallinae* strain (Eiberg). Avian Diseases, 1991: 55-61. https://dx.doi.org/10.2307/1591295

Neimanis AS, Handeland K, Isomursu M, Ågren E, Mattsson R, Hamnes IS, Hirvelä-Koski V. First report of epizootic trichomoniasis in wild finches (family Fringillidae) in southern Fennoscandia. Avian diseases, 2010: 54(1); 136-141. https://dx.doi.org/10.1637/8952-060509-Case.1

Palma, L, Beja, P, Pais, M, Cancela Da Fonseca, L. Why do raptors take domestic prey? The case of Bonelli's eagles and pigeons. Journal of applied ecology, 2006: 43 (6); 1075-1086. https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2664.2006.01213.x

Peterson CA, Lee SL, Elliot JE. Scavenging of waterfowl carcasses by birds in agricultural fields of British Columbia. Can Field Naturalist 2000: 72:150–159. https://dx.doi.org/10.1648/0273-8570-72.1.150

Poch F, Levin D, Levin S, Dan M. Modified thioglycolate medium: a simple and reliable means for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol. 1996: 34; 2630- 2631. https://dx.doi.org/10.1128/jcm.34.10.2630-2631.1996

Qiu SB, LV MN, He X, Weng YB, Zou SS, Wang XQ, Lin RQ. PCR identification and phylogenetic analysis of *Trichomonas gallinae* from domestic pigeons in Guangzhou, China. The Korean journal of parasitology, 2017: 55(3); 333. https://dx.doi.org/10.3347/kjp.2017.55.3.333

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 2003: 19(12); 1572-1574. https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180

Sansano-Maestre J, Garijo-Toledo MM, Gómez-Muñoz MT. Prevalence and genotyping of Trichomonas gallinae in pigeons and birds of prey. Avian Pathology, 2009: 38(3); 201-207. https://dx.doi.org/10.1080/03079450902912135

Schulz JH, Bermudez AJ, Millspaugh JJ. Monitoring presence and annual variation of trichomoniasis in mourning doves. Avian Diseases, 2005: 49(3); 387-389. https://dx.doi.org/10.1637/7333-012505R.1

Schmid GP, Matheny LC, Zaidi AA, Kraus SJ. Evaluation of six media for the growth of Trichomonas vaginalis from vaginal secretions. Journal of Clinical Microbiology, 1989: 27(6); 1230-1233. https://dx.doi.org/10.1128/jcm.27.6.1230-1233.1989

Silvanose, CD, Samour, JH, Naldo, JL, Bailey, TA. Oro-pharyngeal protozoa in captive bustards: Clinical and pathological considerations. Avian Pathology, 1998: 27 (5); 526-530. https://dx.doi.org/10.1080/03079459808419378

Soulsby RL, Smallman JV. A direct method of calculating bottom orbital velocity under waves. 1986. https://dx.doi.org/10.1016/0378-3839(87)90034-2

St Leger, J, Shivaprasad, HL. Passerine protozoal sinusitis: an infection you should know about. In: Proc. Ann. Conf. Assoc. AvianVet. 1998: 157-160.

Stabler RM. *Trichomonas gallinae*: a review. Experimental parasitology, 1954: 3(4); 368-402. https://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(54)90035-1

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. Systematic biology, 2008: 57(5); 758-771. https://dx.doi.org/10.1080/10635150802429642

Stover BC, Muller KF. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. BMC bioinformatics, 2010: 11; 7-7. https://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-7

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL Wimproving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids research, 1994: 22(22); 4673-4680. https://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673

TIMM, CD, TIMM, VF. Avifauna gaúcha: guia de identificação. Pelotas, USEB, 2021.

Van Borm S, Steensels M, Ferreira HL, Boschmans M, DE Vriese J, Lambrecht B, Van Den Berg T. Its Application to Avian Influenza Diagnosis and Quantification. avian diseases, 2007: 50; 213-220. https://dx.doi.org/10.1637/1933-5334(2007)2[e10:AUAERR]2.0.CO;2

Van Der Heijden HM, Landman WJ, Greve S, Peek R. Genotyping of Histomonas meleagridis isolates based on Internal Transcribed Spacer-1 sequences. Avian Pathol. 2006: 5(4); 330-334. https://dx.doi.org/10.1080/03079450600815499

Villanúa, D., Höfle, U., Pérez-Rodríguez, Lorenzo, Gortázar, C. *Trichomonas gallinae* in wintering common wood pigeons Columba palumbus in Spain. Ibis, 2006: 148 (4): 641-648.

CAPITULO 3 – **Detecção e caracterização molecular de *Trichomonas* spp. em aves silvestres no Pantanal brasileiro**

Esse capítulo corresponde à publicação que será submetida ao periódico Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

RESUMO

Membros da família Trichomonadidae, principalmente *Trichomonas gallinae* e *Tetratrichomonas gallinarum*, representam importantes parasitos em aves com presença mundial, acometendo especialmente Columbiformes, Falconiformes e Strigiformes, enquanto a maioria das infecções em Passeriformes são subclínicos. A transmissão de *Trichomonas* spp. pode ser por contato direto, ou indireto, através de alimentos ou água. Esta via indireta é a razão pela qual uma gama tão ampla de ordens de aves pode ser infectada, como Falconiformes e Strigiformes, Passeriformes, Pisciformes, Psitaciformes, Gruiformes, Galliformes ou Anseriformes. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência e diversidade genética de *Trichomonas* spp. em 246 diferentes espécies de aves de vida capturadas em Poconé, Mato Grosso, centro-oeste do Brasil. Para tal, 246 amostras de suabes orofaríngeos de aves pertencentes a 6 ordens diferentes foram coletados no mês de julho de 2022. Após a extração de DNA, foram conduzidos ensaios moleculares para tricomonadídeos baseados na região ITS1/5.8S/ITS2 para *Trichomonas* spp. Como resultado, 107 (43,5%) amostras foram positivas, originadas de 92/215 Passeriformes, 3/4 Cuculiformes e 12/19 Columbiformes. A análise filogenética pelo método Bayesiano, baseadas nas regiões ITS1/5.8S/ITS2 de *Trichomonas* spp., posicionou as 18 sequências obtidas no presente estudo (compreendendo cinco genótipos diferentes) em três clados distintos de *T. gallinae*. Alta positividade para *T. gallinae* foi observada em aves selvagens amostradas no Pantanal brasileiro. Um total de 18 genótipos de *T. gallinae* ocorrem em aves no estado do Mato Grosso. A maioria das aves do nosso estudo possuem hábitos alimentares semelhantes, como a ingestão de sementes e frutas, e alguns sendo insetívoros. O consumo compartilhado de frutas e sementes poderia favorecer a contaminação no caso de um pássaro infectado.

Palavras chaves: Aves silvestres; Columbiformes; Cuculiformes; Passeriformes; tricomonose

ABSTRACT

Members of the family Trichomonadidae, mainly *Trichomonas gallinae* and *Tetratrichomonas gallinarum*, represent important parasites in birds with a worldwide presence, affecting especially Columbiformes, Falconiformes and Strigiformes, while most infections in Passeriformes are subclinical. Transmission of Trichomonas spp. can 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, such as Falconiformes and Strigiformes, Passeriformes, Pisciformes, Psittaciformes, Gruiformes, Galliformes or Anseriformes. The aim of this study was to evaluate the occurrence and genetic diversity of *Trichomonas* spp. in 246 different species of free-range birds captured in Poconé, Mato Grosso, central-western Brazil. For this purpose, 246 oropharyngeal swab samples from birds belonging to 6 different orders were collected in July 2022. After DNA extraction, molecular assays for trichomonads based on the ITS1/5.8S/ITS2 region for Trichomonas spp. As a result, 107 (43.5%) samples were positive, originating from 92/215 Passeriformes, 3/4 Cuculiformes, and 12/19 Columbiformes. Phylogenetic analysis by the Bayesian method, based on the ITS1/5.8S/ITS2 regions of *Trichomonas* spp., positioned the 18 sequences obtained in the present study (comprising five different genotypes) into three distinct clades of *T. gallinae*. High positivity for *T. gallinae* was observed in wild birds sampled in the Brazilian Pantanal. A total of 18 genotypes of *T. gallinae* occur in birds in the state of Mato Grosso. Most of the birds in our study have similar feeding habits, such as ingesting seeds and fruits, and some are insectivores. The shared consumption of fruits and seeds could favor contamination in the case of an infected bird.
Keywords: Wild birds; Columbiformes; Passerines; Protozoa.

INTRODUÇÃO

Trichomonas gallinae é um protozoário flagelado pertencente ao gênero *Trichomonas*, que afeta principalmente aves, incluindo pombos e passeriformes. Essa infecção é conhecida por causar a tricomonose, uma doença que se manifesta, principalmente, por lesões na mucosa oral e faringe, levando a problemas respiratórios e de alimentação nas aves afetadas. A transmissão ocorre, principalmente, por meio do contato direto entre aves, além de água e alimentos contaminados (AMIN et al., 2014).

Pombos (*Columba livia*) são hospedeiros especialmente suscetíveis e podem atuar como reservatórios da infecção, facilitando a disseminação entre outras aves (FORZÁN et al., 2010). Em passeriformes, a infecção pode resultar em alta morbidade e mortalidade, afetando severamente a saúde populacional e a biodiversidade, especialmente em espécies ameaçadas (QUILLFELDT et al.,2018). Além disso, a tricomonose em aves silvestres pode interferir em programas de conservação, uma vez que a doença pode ser um fator limitante na recuperação de populações em perigo.

Nos pombos, a infecção frequentemente se manifesta através de lesões necróticas na mucosa oral e faringe, levando a dificuldades alimentares, tosse e respiração ofegante, além de letargia e rápida perda de peso (FORRESTER et al., 2008). Em contraste, os passeriformes apresentam sintomas mais sutis, como lesões orais menos pronunciadas, letargia leve, dificuldade de canto e comprometimento da saúde reprodutiva, o que pode resultar em diagnósticos mais tardios (MARTINEZ et al., 2023).

Estudos recentes têm destacado a importância do monitoramento e manejo sanitário para a contenção da infecção em aves silvestres e domésticas, enfatizando a necessidade de uma abordagem integrada para a saúde das aves (QUILLFELDT et al., 2018).

O presente estudo tem como objetivo investigar a ocorrência e diversidade genética de tricomonadídeos em diferentes espécies de aves selvagens de vida livre, a fim de investigar a possível associação entre genótipo do parasito e espécie de ave acometida.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e aves capturadas

A captura de aves de vida livre foi realizada no estado de Mato Grosso, município de Poconé (Figura 11), em julho de 2022, durante 10 dias, onde foram capturadas 246 aves com duas redes de neblina e colhidos dois suabes da mucosa orofaríngea de cada ave. O primeiro suabe foi utilizado para confeccionar esfregaços em lâminas, corados por Giemsa para a identificação de trofozoítos. O segundo suabe foi armazenado em microtubo contendo solução isotônica tamponada (PBS) e armazenado em nitrogênio líquido e depois transferido para freezer -80°C até o momento da realização da extração do DNA e os ensaios moleculares para tricomonadídeos.

Todos os procedimentos foram autorizados por meio do CEUA (n°732/21) e do SISBIO (n° 77538-1).

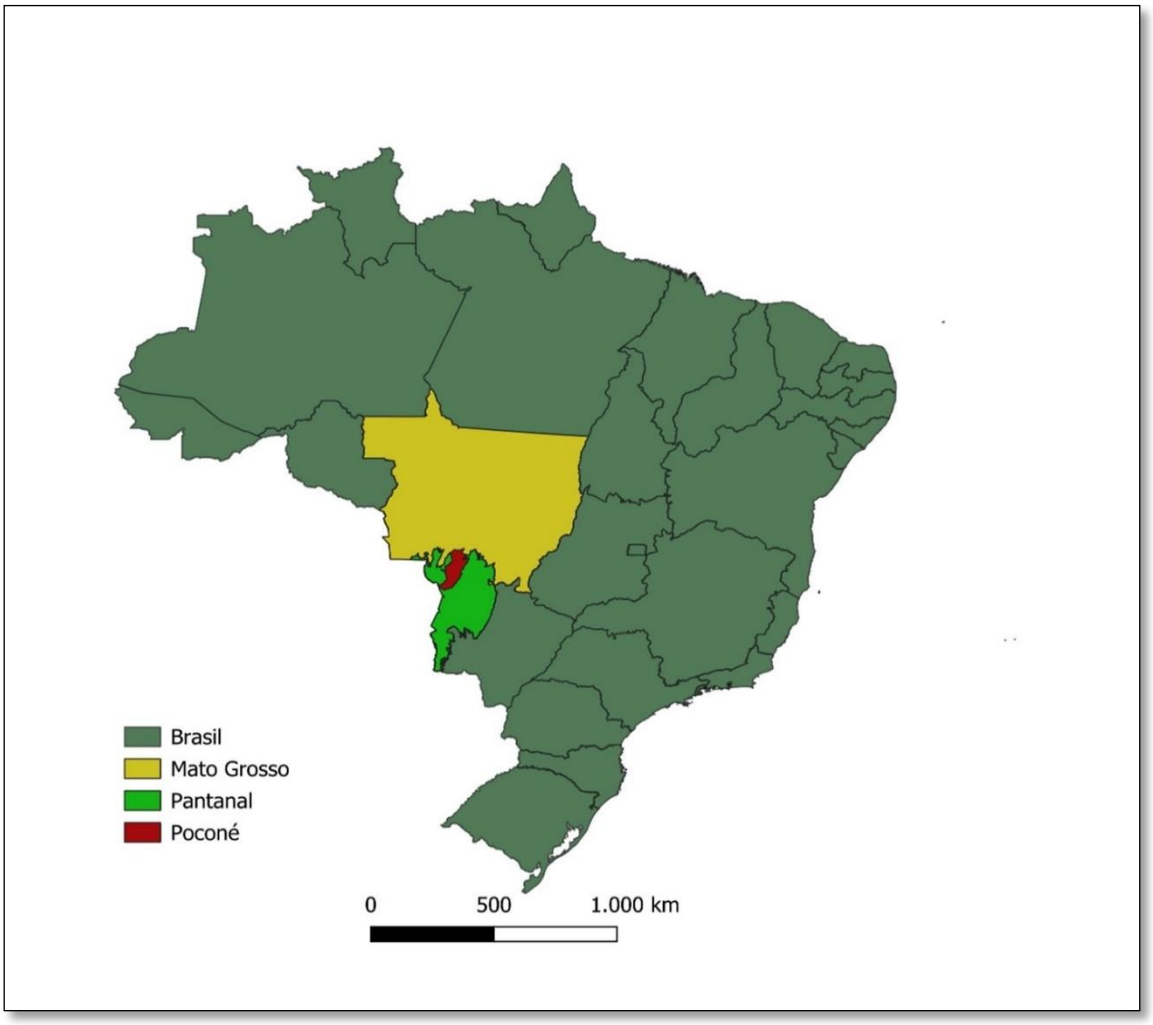

Figura 11. Local de coleta evidenciando Poconé (Microrregião do Pantanal) no estado de Mato grosso.

ESPÉCIES DE AVES AMOSTRADAS

No município de Poconé - MT foram capturadas 246 aves de vida livre e colhidos suabes orofaríngeos das seguintes ordens/gênero/espécies de aves presente no quadro 4.

QUANTIDADE	ORDEM	QUANTIDADE/ESPÉCIE
2	Accipitriformes	2 *Rupornis magnirostris*
19	Columbiformes	8 *Leptotila verreauxi,* 9 *Columbina talpacoti* e 2 *Columbina squammata*
4	Cuculiformes	3 *Crotophaga ani, 1 Coccycua minuta*
2	Galbuliformes	1 *Momotus momota* e 1 *Galbula cyanicollis*
215	Passeriformes	11 *Turdus amaurochalinus*, 6 *Synallaxis albilora*, 8 *Furnarius rufus*, 2 *Cercomacra melanaria*, 2 *Certhiaxis cinnamomeus*, 56 *Ramphocelus carbo*, 5 *Taraba major*, 1 *Pseudoseisura unirufa*, 11 *Eucometis penicillata*, 5 *Pipra fasciicauda*, 1 *Furnarius leucopus*, 1 *Pitangus sulphuratus*, 3 *Cnemotriccus fuscatus*, 3 *Hemitriccus margaritaceiventer*, 1 *Euscarthmus meloryphus*, 6 *Myiothlypis flaveola*, 5 *Poecilotriccus latirostris*, 1 *Hypocnemoides maculicauda*, 1 *Synallaxis albescens*, 1 *Saltator coerulescens*, 1 *Dendroplex picus*, 1 *Cranioleuca vulpina*, 2 *Icterus pyrrhopterus*, 4 *Casiornis rufus*, 2 *Fluvicola albiventer*, 2 *Thraupis palmarum,* 2 *Sporophila leucoptera*, 2 *Camptostoma obsoletum*, 2 *Myiophobus fasciatus*, 2 *Pheugopedius genibarbis*, 2 *Arremon flavirostris*, 4 *Turdus leucomelas*, 2 *Paroaria capitata*, 1 *Elaenia cristata*, 1 *Sporophila caerulescens*, 3 *Thamnophilus pelzelni*, 39 *Volatinia jacarina*, 1 *Myiarchus ferox,* 1 *Machetornis rixosa*, 1 *Inezia inornata*, 1 *Myarchus ferox*, 2 *Coryphospingus cucullatus*, 4 *Sicalis*

		flaveola, 1 *Tolmomyias sulphurescens*, 1 *Campylorhamphus trochilirostris* e 1 *Oryzoborus angolensis*
4	Pisciformes	3 *Veniliornis passerinus*, 1 *Picumnus albosquamatu*

Quadro 4. Descrição das diferentes ordens de aves, que foram capturadas em Poconé, MT, Brasil, para os ensaios de PCR convencional, para os genes endógenos e *Trichomonas* spp.

Extração do DNA e PCR para gene endógeno

Os 246 suabes foram armazenados em PBS autoclavado com pH 7,2 e, em seguida, congelados a -20°C. Para a extração de DNA, as amostras foram aquecidas em um banho seco a 40°C por 15 minutos. Após esse procedimento, o excesso de PBS foi eliminado, mantendo cerca de 300 microlitros no microtubo. Com o suabe ainda no microtubo, foram adicionados a proteinase K e o tampão de lise conforme as instruções do kit comercial utilizado (Biopur Mini Spin Plus, MoBius Life Science, Paraná, Brasil). O suabe foi removido apenas antes da transferência do conteúdo para a coluna de centrifugação, seguindo rigorosamente os demais passos do protocolo do fabricante.

REAÇÃO DE AMPLIFICAÇAO PARA O GENE ENDÓGENO ACTB (*B ACTINA*)

Com o objetivo de eliminar resultados falsos negativos em virtude da presença de inibidores, as amostras de DNA obtidas a partir dos suabes foram submetidas a uma PCR convencional objetivando a amplificação do gene endógeno *β-actina*. Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores β-actin-F (5'-ATCTCGTCTTGTTTTATGCG-3') e β-actin-R (5'-TATCCGTAAGGATCTGTATG-3') (VAN BORM et al., 2007). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25 µL, contendo uma mistura de 5 µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de Cloreto

de Magnésio, 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p.

As sequências térmicas e as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritas no quadro 5. Água esterilizada ultrapura foi utilizada como controle negativo em todos os ensaios de PCR.

TRIAGEM PARA *Trichomonas* spp.

As amostras positivas para o gene endógeno ***β actina*** foram triadas para pesquisa de *Trichomonas* spp. por meio de uma PCR convencional baseada nas regiões ITS1/5.8S rRNA/ITS2 (FELLEISEN, 1997).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando uma reação com volume total final de 25 µL, contendo uma mistura com 5 µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeos, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 0,75 U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultrapura esterilizada q.s.p. 25 µL.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores a as sequências térmicas utilizadas estão representados no quadro 5. Água esterilizada ultrapura foi utilizada como controle negativo em todos os ensaios de PCR. DNA de *Trichomonas gallinae* (amostra Jaboticabal) foi utilizado como controle positivo nos ensaios de PCR para *Trichomonas* spp.

CARACTERIZAÇÃO PARA *Trichomonas* spp.

As amostras positivas para o ensaio de PCR, nas regiões ITS1/5.8S rRNA/ITS2, foram caracterizadas por meio de PCRs que amplificam os genes 18S rRNA (Ganas et al., 2014) e *Fe-hidrogenase* (Lawson et al., 2011).

REGIÃO INTERGÊNICA	**SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS**	**SEQUÊNCIAS TÉRMICAS**	**REFERENCIAS**	**TAMANHO DO FRAGMENTO**

GENE ENDÓGENO				
β actinF	5’-CCTCATGAAGATCCTGACAGA3’	95°C por 5 min, 95°C por 30s, 54°C por 30s, 72 °C por 1min, 72°C por 5 min	Van Borm et al., 2007)	700 bp
β actinR	5’-TCTCCTGCTCYAAYTCCA-3’			
ITS1/5.8S/ITS2				
TRF1	(5’ -TGCTTCAGCTCAGCGGGTCTTCC-3’)	94°C por 2 min, 94°C por 20s, 66°C por 20s, 72 °C por 30s, 72°C por 5 min	Felleisen, (1997)	369 bp
TRF2	(5’ -CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG-3’)			
SSUrRNA				
Hm-Long-f	(5′-AGGAAGCACACTATGGTCATAG-3′)	95 °C por 15 min, 94 °C por 30s, 55°C por 1 min, 72 °C por 2 min, 72 °C por 10 min	Ganas et al., (2014)	1500 bp
Hm-Long-r	(5′-CGTTACCTTGT			

	TACGACTTCTC CTT-3′)			
Fe-hydrogenase				
TrichhydFOR	(5’-GTTTGGGAT GGCCTCAGA AT-3’)	95°C por 10 min, 96° por 5s, 53° por 3s, 68° por 15s. A extensão final a 72°C por 10s. As amostras devem ser mantidas em 10°C até a remoção	Lawson et al., 2011	1000 bp
TrichhydREV	(5’-AGCCGAAGA TGTTGTCGA AT-3’)			

Quadro 5. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e sequências térmicas utilizadas nos ensaios de PCR convencional para os genes endógenos e *Trichomonas*.

ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Os produtos amplificados nos ensaios de cPCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 100 V/ 150mA durante 50 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®). Os resultados foram visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc MP Imaging System, BIO RAD®).

SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE PELO BLASTN

Os produtos amplificados nos ensaios de cPCR foram purificados utilizando-se Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg,WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado pelo método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems®) no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO -FCAV - UNESP).

A sequência de cada amostra foi submetida à análise pelo programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990), a fim de compará-la com aquelas depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

ANÁLISE FILOGENÉTICA

O programa Phred-Phrap versão 23 (EWING e GREEN, 1998) foi utilizado para construção de sequências-consenso dos marcadores moleculares previamente descritos, analisando ambas as fitas “forward” e “reverse” sequenciadas da mesma amostra, respeitando-se o valor mínimo de 20 de qualidade de cada nucleotídeo para determinar a sequência de nucleotídeos. O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado afim de comparar as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Posteriormente, as sequências salvas em modo “FASTA” foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado retiradas do banco de dados (Genbank), utilizando o software Clustal/W (THOMPSON et al., 1994) via Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Os alinhamentos salvos em modo “FASTA” foram transformados em modo Nexus, pelo site Alignment Transformation Environment (GLEZ-PEÑA et al., 2010). Foram realizadas análise Bayesiana utilizando o software MrBayes 3.2.2 on XSEDE (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) via portal CIPRES (MILLER et al., 2010).

A análise Bayesiana foi realizada com 10^6 gerações e números de classes de substituição variando conforme o modelo evolutivo encontrado para cada

conjunto de dados. O modelo evolutivo foi encontrado utilizando o software jModelTest 2 (DARRIBA et al., 2012). A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56- 381 beta (STOVER e MULLER, 2010).

ANÁLISE DE DIVERSIDADE E REDE DE GENÓTIPOS

Para calcular a diversidade de nucleotídeos (π), nível de polimorfismo (diversidade de haplótipo – [dh]), número de haplótipos (h) e a média do número de diferenças nucleotídicas (K) entre as sequências obtidas, foi utilizado o programa DnaSP v5 (LIBRADO e ROZAS, 2009). Adicionalmente, as sequências foram submetidas à análise de TCSnetwork (BANDELT et al., 1999) utilizando o programa Population Analysis with Reticulate Trees (popART) (LEIGH; BRYANT, 2015). Tal análise foi utilizada para verificar a diversidade de genótipos com base nos diferentes alvos gênicos entre as aves selvagens amostradas.

RESULTADOS

Das 246 amostras de DNA extraídas de suabes orofaríngeos, 226 (91,86%) foram positivas na PCR para o gene endógeno *β- actina* de aves, das quais: 2/2 *R. magnirostris,* 8/8 *L. verreauxi,* 9/9 *C. talpacoti*, 2/2 *C. squammata,* 3/3 *C. ani,* 1/1 *M. momota, 9/11 T. amaurochalinus, 5/6 S. albilora, 7/8 F. rufus, 1/2 C. melanaria, 1/2 C. cinnamomeus, 52/56 R. carbo, 5/5 T. major, 10/11/ E. penicillata, 4/5 P. fasciicauda, 1/1 F. leucopus, 1/1 P. sulphuratus, 3/3 C. fuscatus, 3/3 H. margaritaceiventer, 5/6 M. flaveola, 5/5 P. latirostris, 1/1 H. maculicauda, 1/1 S. albescens, 1/1 S. coerulescens, 1/1 D. picus, 1/1 C. vulpina, 1/2 I. pyrrhopterus, 4/4 C. rufus, 2/2 F. albiventer, 2/2 T. palmarum, 2/2 S. leucoptera, 2/2 C. obsoletum, 1/1 C. minuta, 2/2 M. fasciatus, 2/2 P. genibarbis, 2/2 A. flavirostris, 3/3 T. leucomelas, 2/2 P. capitata, 1/1 M. nigrifrons, 1/1 E. cristata, 1/1 S. caerulescens, 3/3 T. pelzelni, 39/39 V. jacarina, 1/1 M. ferox, 1/1*

M. rixosa, 1/1 I. inornata, 1/1 M. ferox , 2/2 C. cucullatus, 4/4 S. flaveola, 1/2 V. passerinus, 1/1 T. sulphurescens, 1/1 C. trochilirostris e 1/1 O. angolensis.

Destes, 107 (43,49%) foram positivos no ensaio PCR de triagem para *Trichomonas* spp. com base na região ITS1/5.8S/ITS2: 92/215 (42,79%) Passeriformes (2/6 *S. albilora*, 4/8 *F. rufus*, 1/2 *C. melanaria*, 1/2 *C. cinnamomeus*, 26/ 56 *R. carbo*, 2/5 *T.major*, 7/11 *E. penicillata*, 3/5 *P. fasciicauda*, 2/3 *C. fuscatus*, 1/3 *H. margaritaceiventer*, 2/6 *M. flaveola*, 3/5 *P. latirostris*, 1/1 *S. albescens*, 1/1 *S. coerulescens*, 1/2 *I. pyrrhopterus*, 1/4 *C. rufus*, 1/2 *F. albiventer*, 1/2 *T.palmarum*, 1/2 *S. leucoptera*, 1/2 *C. obsoletum*, 2/2 *M. fasciatus*, 1/2 *P. genibarbis*, 1/2 *A. flavirostris*, 2/3 *T. leucomelas*, 1/1 E. *cristata*, 1/1 *S. caerulescens*, 1/3 *T. pelzelni*, 17/39 *V. jacarina* , 1/2 *C. cucullatus*, 2/4 *S. flaveola*, 1/1 *T. sulphurescens*), 3/4 Cuculiformes (3/3 *C. ani*) e 12/19 (63,15%) Columbiformes (6/8 *L. verreauxi*, 4/9 *C. talpacoti* e 2/2 *C. squammata*). Todas as 107 amostras foram negativas nos ensaios de caracterização baseados nos genes *Fe-hidrogenase* e 18S rRNA. Um total de dezoito sequências foram obtidas e depositadas no genBank sob os números de acesso PQ740247-PQ740264.

A análise filogenética inferida pelo método Bayesiano e modelo evolutivo TIM2+I baseada em um alinhamento de 318 pb da região ITS1/5.8S/ITS2 de *Trichomonas* spp. posicionou as 18 sequências obtidas no presente estudo em três clados distintos de *T. gallinae* (Figura 12): uma sequência detectada em *Columbina squammata* agrupou-se com uma sequência de *Trichomonas* sp. detectada em *Zenaida macrura* (EUA); a maior parte das sequências (*Ramphocelus carbo, Crotophaga ani, Pipra fasciicauda, Eucometis penicillata, Leptotila verreauxi, Synallaxis albilora, Cercomacra melanaria* e *Camptostoma obsoletum*) posicionou-se em um clado juntamente com sequências detectadas em *Ramphastos dicolorus* no Brasil e *Zenaida asiatica* nos EUA. Por fim, três sequências (*C. cinnamomeus, E. penicillata e C. talpacoti*) posicionaram-se no clado contendo uma sequência detectada em *Columbina passerina*, nos EUA.

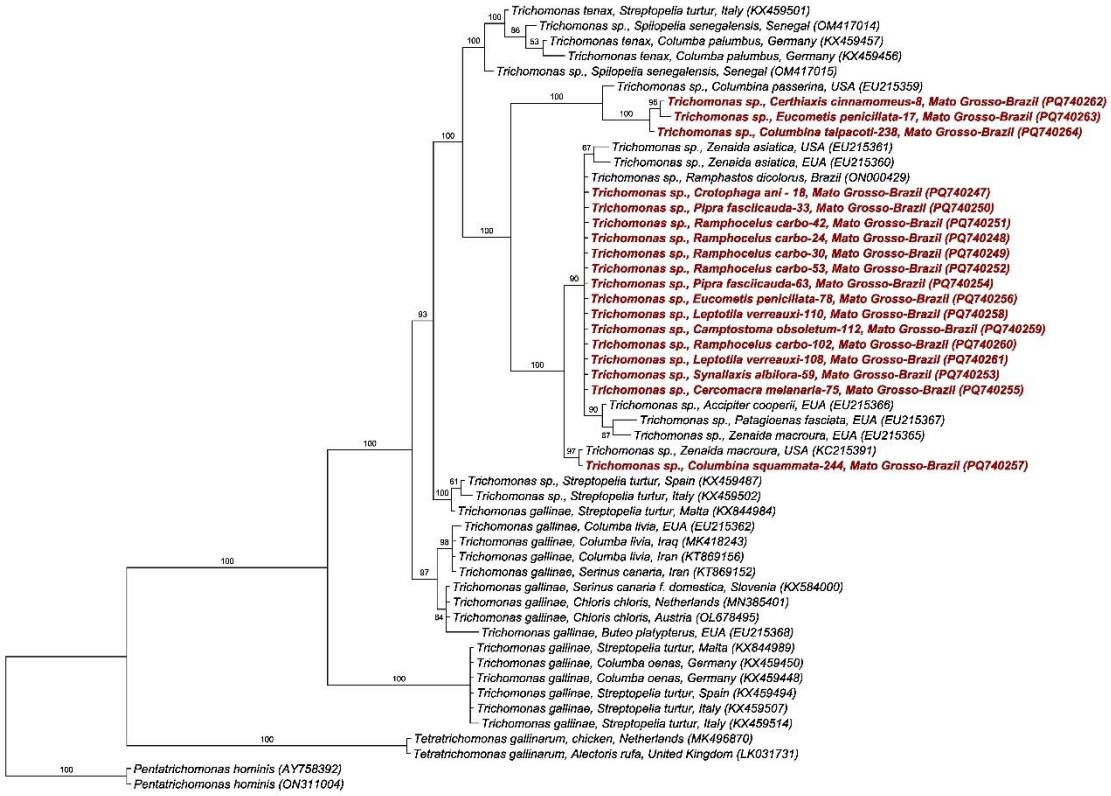

Figura 12. Análise filogenética inferida pelo método Bayesiano e modelo evolutivo TIM2+1 baseada em um alinhamento de 318 pb da região ITS1/5.8S/ITS2 de *Trichomonas* spp. Sequências de *Pentatrichomonas hominis* foram utilizadas como grupo externo.

Em relação à análise de diversidade, foram analisadas um total de 18 sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e obtidos 18 genótipos diferentes, dos quais cinco contêm as sequências detectadas nas aves amostradas no presente estudo, sendo eles genótipos: #2, #3, #4, #6 e #9. A diversidade de haplótipos (h) encontrada foi de 0,892 ± 0,031 e a de nucleotídeos (π) de 0,08476 ± 0,01110, com 92 sítios variáveis, média do número de diferenças de nucleotídeos (K) de 23,22364 e 34,1% de conteúdo G+C.

O genótipo #6, compreendendo 11 sequências do Pantanal e uma sequência detectada em Pelotas, RS (*Ramphastos dicolorus*), foi separado dos genótipos #7 e #9 por dois eventos mutacionais, do genótipo #5 por um evento mutacional, e de um median vector por diversos eventos mutacionais.

Já o genótipo #9, compreendendo uma sequência do Pantanal (*Columbina squammata*) e por uma sequência detectada nos EUA (*Zenaida macroura*). Por fim, os genótipos #2, #3 e #4 foram formados por sequências únicas detectadas em (*Certhiaxis cinnamomeus*, *Columbina talpacoti* e *Eucometis penicillata*) em Poconé, MT (Figura 13).

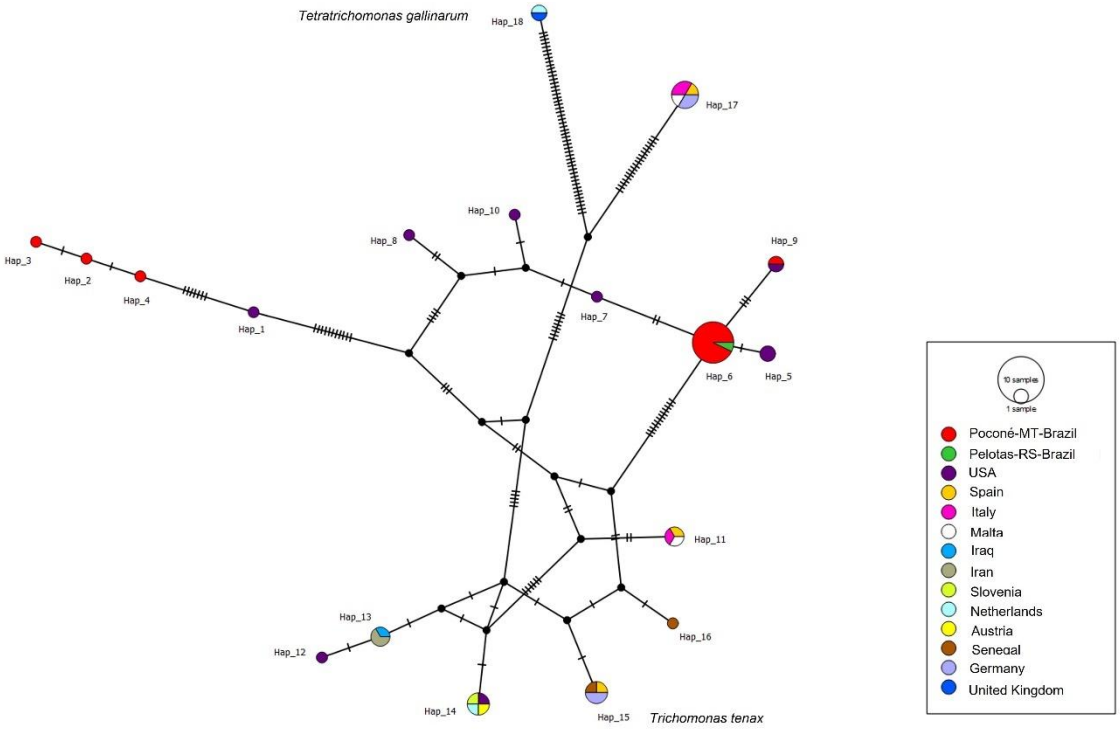

Figura 13. Rede de genótipos baseada nas regiões ITS1-5.8S-ITS1 de *Trichomonas* spp. As cores representam as localidades das quais foram detectadas as sequências utilizadas nas análises, os pontos pretos representam median-vector (sequências não contempladas na análise), as linhas pretas verticais representam a quantidade de eventos mutacionais entre um genótipo e outro.

DISCUSSÃO

Este estudo revelou uma ocorrência notável de *T. gallinae* em aves silvestres do Pantanal brasileiro, com diferentes taxas de infecção entre as ordens amostradas: Columbiformes (12/19, 63,15%), Passeriformes (92/215, 42,79%) e Cuculiformes (3/4, 75%). Esses achados corroboram estudos anteriores que destacam a suscetibilidade de Columbiformes a este parasita, frequentemente associado a pombos (*C. livia*), que atuam como importantes reservatórios em ambientes urbanos e rurais (Martins et al., 2007; Lawson et al., 2011). A alta ocorrência observada em Cuculiformes, embora limitada pelo pequeno tamanho da amostra, sugere que essas aves também podem ser hospedeiras, exigindo investigações adicionais para confirmar seu papel epidemiológico.

A literatura destaca que o compartilhamento de alimentos e água é uma importante via de transmissão de *T. gallinae*, especialmente em ambientes antropizados (Forzán et al., 2010). Em nosso estudo, a alta ocorrência em Passeriformes, particularmente em espécies como *R. carbo*, que habitam áreas urbanas, pode indicar a relevância desses ambientes na manutenção e disseminação do parasita. Estudos semelhantes sugerem que a proximidade entre aves silvestres e domésticas em áreas urbanas aumenta o risco de transmissão (Gerhold et al., 2013).

Diversos estudos relataram a presença de *T. gallinae* em passeriformes. Quillfeldt et al. (2018) documentaram infecção em 34 de 132 (25,75%) passeriformes amostrados em Hesse, Alemanha, entre 2015 e 2017, destacando o risco potencial desse parasita. No Irã, Arabkhazaeli et al. (2020) coletaram 349 passeriformes, dos quais 60 testaram positivo, representando uma taxa de infecção de 17,2%. Seus achados sugerem que os passeriformes podem servir como hospedeiros significativos, contribuindo para a epidemiologia de *T. gallinae*. No presente estudo, foi observada uma taxa de ocorrência de 42,79% em passeriformes, representando uma prevalência consideravelmente maior em comparação aos dados relatados por Arabkhazaeli et al. (2020) e Quillfeldt et al. (2018). Esses resultados indicam que os passeriformes analisados apresentam

um alto nível de infecção, possivelmente relacionado a fatores ecológicos ou regionais.

Em Columbiformes, há diversos relatos de ocorrência de *T. gallinae*, com estudos demonstrando altas taxas de infecção. Por exemplo, Dunn et al. (2023) observaram que todos os 149 Columbiformes amostrados na África Ocidental (Senegal) durante dois invernos testaram positivo para *T. gallinae*, resultando em uma ocorrência de 100%. Tuska-Szalay et al. (2022) relataram que 101/158 (64,30%) pombos (C. livia) coletados em Teerã, Irã, testaram positivo para *T. gallinae*. Apenas 9/101 (8,91%) aves positivas exibiram sinais clínicos, enquanto a maioria dos pombos infectados eram assintomáticos, reforçando seu papel como portadores silenciosos na disseminação do parasita. No presente estudo, a taxa de infecção em Columbiformes foi de 63,15%, um valor consistente com o relatado por Tuska-Szalay et al. (2022). Essa alta prevalência reflete a importância dos Columbiformes como reservatórios naturais de T. gallinae e seu potencial impacto na disseminação do parasita. A tricomoníase é reconhecida como uma ameaça potencial para espécies em risco, especialmente Passeriformes endêmicos (Quillfeldt et al., 2018). O monitoramento contínuo em regiões como o Pantanal é essencial para prevenir impactos negativos na biodiversidade local.

A análise genotípica revelou uma diversidade significativa entre as amostras positivas, com cinco genótipos distintos de *T. gallinae*. Essa diversidade está alinhada com estudos que enfatizam a ampla distribuição e plasticidade ecológica do parasita (Albeshr et al., 2020). Um achado notável foi a detecção de genótipos compartilhados entre Columbiformes e Passeriformes, indicando que o consumo compartilhado de frutos e sementes pode ser um importante mecanismo de transmissão interespecífica (Chi et al., 2013). Além disso, a detecção de genótipos semelhantes em diferentes regiões geográficas, como entre *C. squammata* no Brasil e *Z. macroura* nos EUA, reforça a conectividade global dos genótipos de *T. gallinae*.

Apesar da alta ocorrência detectada, nenhuma ave exibiu sinais clínicos característicos da tricomonose. A ausência de lesões pode ser atribuída à presença de cepas menos virulentas ou à possível imunidade adquirida pelas aves. Estudos anteriores, como os de Lawson et al. (2011) e Chi et al. (2013), também relataram infecções subclínicas em aves silvestres, sugerindo que a manifestação clínica da doença depende tanto da virulência da cepa quanto do status imunológico do hospedeiro.

A ausência de amplificação do gene *Fe-hidrogenase* em todas as amostras positivas limitou análises genotípicas mais detalhadas. Lawson et al. (2011) e Alrefaei et al. (2019) destacaram que esse gene pode oferecer maior resolução para discriminar cepas de *T. gallinae*. No entanto, dificuldades técnicas na amplificação desse gene são comuns e já foram relatadas na literatura, como evidenciado por Chi et al. (2013).

Por fim, a maior ocorrência observada em espécies de aves associadas a áreas urbanas, como *C. talpacoti* e *R. carbo*, destaca a necessidade de monitoramento em ambientes antropizados. A presença de C. livia em áreas urbanas, frequentemente infectada com *T. gallinae*, pode atuar como uma fonte significativa de infecção para aves silvestres (Gerhold et al., 2013). Esses achados ressaltam a importância de estratégias integradas de manejo sanitário e conservação, considerando os potenciais riscos para a biodiversidade local e as populações de aves ameaçadas.

CONCLUSÃO

Este estudo forneceu uma visão abrangente sobre a ocorrência e a diversidade genética de *T. gallinae* em aves silvestres do Pantanal brasileiro, destacando a ampla distribuição do parasita entre diferentes ordens de aves. A alta ocorrência em Columbiformes, Passeriformes e Cuculiformes reforça o papel ecológico dessas aves como potenciais hospedeiras e disseminadoras do parasita, com ênfase em espécies urbanas que podem atuar como vetores significativos em ambientes antropizados. A análise genotípica revelou uma notável diversidade de *T. gallinae*, incluindo genótipos compartilhados entre diferentes espécies de

aves e regiões geográficas, sugerindo um mecanismo comum de transmissão mediado pelo consumo compartilhado de frutos e sementes. Embora nenhuma ave tenha exibido sinais clínicos da doença, a identificação molecular do parasita em diferentes espécies destaca a necessidade de monitoramento contínuo, particularmente em áreas onde aves domésticas e silvestres interagem.

REFERÊNCIAS

Albeshr MF, Alrefaei AF. Isolation and characterization of novel Trichomonas gallinae ribotypes infecting Domestic and Wild birds in Riyadh, Saudi Arabia. Avian diseases. 2020; 64 (2); 130-134. https://doi.org/10.1637/0005-2086-64.2.130

Alrefaei AF, Low R, Hall N, Jardim R, Dávila A, Gerhold R, Tyler K. Multilocus analysis resolves the European finch epidemic strain of Trichomonas gallinae and suggests introgression from divergent trichomonads. Genome biology and evolution. 2019: 11 (8); 2391-2402. https://doi.org/10.1093/gbe/evz164

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology, 1990: 215(3): 403-410. https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Amin A, Bilic I, Liebhart, D, Hess M. Trichomonads in birds–a review. Parasitology, 2014: 141(6): 733-747. https://dx.doi.org/10.1017/S0031182013002096

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular biology and evolution 1999: 16(1); 37-48. https://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

Bulbul KH, Shahardar R. Allaie IM. Wani ZA. Tramboo SR. Ashraf, A.; Shubeena, S. Avian trichomonosis with special reference to pigeon. Int J Vet Sci Anim Husb 2018: 3; 11-13. http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2023/11.10.1690.1696

Brunthaler R, Teufelbauer N, Seaman B, Nedorost N, Bittermann K, Matt J, Weissenböck H. Trichomonosis in Austrian Songbirds—Geographic distribution, pathological lesions and genetic characterization over nine years. Animals. 2022; 12 (10); 1306. https://doi.org/10.3390/ani12101306

Chi JF, Lawson, B, Durrant C, Beckmann K, Alrefaei AF, Kirkbride K, Bell DJ. Cunningham, A. A.; Tyler, K. M. The finch epidemic strain of Trichomonas gallinae is predominant in British non-passerines. Parasitology. 140: 1234–1245. 2013. https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.003

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. Nature methods, v. 9, n. 8, p. 772, 2012. https://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109

Da Silva DG, Barton E, Bunbury N, Lunness P, Bell DJ, Tyler KM. Molecular identity and heterogeneity of trichomonad parasites in a closed avian population. Infection, Genetics and Evolution, 2007: 7(4); 433-440. https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2007.01.002

Ecco R, Preis IS, Vilela DA, Luppi MM, Malta MC, Beckstead RB, Stimmelmayr R. Gerhold RW. Molecular confirmation of Trichomonas gallinae and other parabasalids from Brazil using the 5,8S and ITS-1 rRNA regions. Vet. Parasitol. 2012: 190(1/2):36-42. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.029

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome research, 1998: 8(3); 186-194. https://dx.doi.org/10.1101/gr.8.3.186

Fadhil LT, Faraj AA. Survey of Trichomonas gallinae isolates in pigeons by microscopy and PCR. Veterinary Research, 2019: 23 (4): 321-329.

Forrester DJ, Foster DW. Trichomonosis. In C.T. Atkinson, N.J. Thomas, & D.B. Hunter (Eds.). Parasitic Diseases of Wild Birds. p.120–153. Ames: Wiley-Blackwell. 2008.

Forzán MJ, VanderstricheL R, Melekhovets YF, Mcburney S. Trichomoniasis in finches from the Canadian Maritime provinces--An emerging disease. Can Vet J, 2010: 51(4); 391. PMC2839828

Ganas P, Jaskulska B, Lawson B, Zadravec M, Hess M Bilic, I. Multi-locus sequence typing confirms the clonality of *Trichomonas gallinae* isolates circulating in European finches. Parasitology, 2014: 141(5); 652-661. https://dx.doi.org/10.1017/S0031182013002023

Gerhold RW, Maestas LP, Harnage PM. Persistence of two Trichomonas gallinae isolates in chlorinated and distilled water with or without organic material. Avian Diseases. 2013; 57 (3); 681-683. https://doi.org/10.1637/10518-022213-ResNote.1

Glez-Peña D, Reboiro-Jato M, Maia P, Rocha M, Díaz F, Fdez-Riverola F. AIBench: a rapid application development framework for translational research in biomedicine. Computer methods and programs in biomedicine, 2010: 98(2); 191-203. https://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2009.12.003

Gordo FP, Herrera S, Castro AT, Durán BG, Dıaz RM. Parasites from farmed ostriches (Struthio camelus) and rheas (Rhea americana) in Europe. Veterinary parasitology, 2002: 107(1-2); 137-160. https://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00104-8

Grunenwald C, Sidor I, Mickley R, Dwyer C, Gerhold R. *Tetratrichomonas* and *trichomonas* spp.-associated disease in free-ranging common Eiders (Somateria mollissima) from Wellfleet Bay, MA and description of ITS1 region genotypes. Avian diseases, 2018: 62(1); 117-123. https://dx.doi.org/10.1637/11742-080817-Reg.1

Gupta SD, Islam M, Kamal T, Faruque MRAL, Faruk MS. The confirmatory diagnosis and therapeutic management of canker in pigeons. Res J. Vet. Pract, 2023:11(2); 20-25. http://dx.doi.org/10.17582/journal.rjvp/2023/11.2.20.25

Kocan RM, Herman CM. Trichomoniasis. In Infectious and Parasitic Diseases of Wild Birds (ed. Davis, J.W., Anderson, R. C., Karstad, L. and Trainer, D. O.), 1971: 282–290. Iowa State University Press, Ames, IA, USA.

Lawson B, Cunningham AA, Chantrey J, Hughes LA, John SK, Bunbury N, Tyler KM. A clonal strain of *Trichomonas gallinae* is the aetiologic agent of an emerging avian epidemic disease. Infection, Genetics and Evolution, 2011: 11(7); 1638-1645. https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.06.007

Leigh JW, Bryant D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in ecology and evolution, 2015: 6(9); 1110-1116. https://dx.doi.org/10.1111/2041-210X.12410

Martins M, Aquino EA, Albuquerque LB. Guildas tróficas da avifauna na Lagoa Itatiaia, Campo Grande, MS. Multitemas, 2007. https://dx.doi.org/10.20435/multi.v0i35.853

Mcburney S, Kelly-Clark WK, Forzan MJ, Lawson B, Tyler KM, Greenwood SJ. Molecular characterization of *Trichomonas gallinae* isolates recovered from the Canadian Maritime provinces' wild avifauna reveals the presence of the genotype responsible for the European finch trichomonosis epidemic and additional strains. Parasitology, 2015: 142(8); 1053-1062. https://dx.doi.org/10.1017/S0031182015000281

Mckeon T, Dunsmore J, Raidal SR. Trichomonas gallinae in budgerigars and columbid birds in Perth, Western Australia. Australian Veterinary Journal. 1997; 75 (9); 652-655. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1997.tb15363.x

Mirzaei M, Ghashghaei O, Khedri J. First report of an outbreak trichomoniasis in turkey in Sistan, Iran. Journal of Parasitic Diseases, 2016: 40; 61-64. https://dx.doi.org/10.1007/s12639-014-0445-3

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. In: Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: extreme digital discovery. 2011. 1-8. https://dx.doi.org/10.1145/2016741.2016785

Neimanis AS, Handeland K, Isomursu M, Ågren E, Mattsson R, Hamnes IS, Hirvelä-Koski V. First report of epizootic trichomoniasis in wild finches (family Fringillidae) in southern Fennoscandia. Avian diseases, 2010: 54(1); 136-141. https://dx.doi.org/10.1637/8952-060509-Case.1

Reisen WK, Chiles RE, Green EN, Fang Y, Mahmood F, Martinez VM, Laver T. Effects of immunosuppression on encephalitis virus infection in the house finch, Carpodacus mexicanus. Journal of medical entomology. 2003: 40 (2); 206-214. https://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.206

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 2003: 19(12); 1572-1574. https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180

Schulz JH, Bermudez AJ, Millspaugh JJ. Monitoring presence and annual variation of trichomoniasis in mourning doves. Avian Diseases, 2005: 49(3); 387-389. https://dx.doi.org/10.1637/7333-012505R.1

Stover BC, Muller KF. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. BMC bioinformatics, 2010: 11; 7-7. https://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-7

Timm CD, Timm VF. Avifauna gaúcha: guía de identificação. Pelotas, USEB, 2021.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL Wimproving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids research, 1994: 22(22); 4673-4680. https://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673

Villanúa, D., Hofle, U., Perez-Rodriguez, L., & Cortazar, C. Trichomonas gallinae in wintering common wood pigeons Columba palumbus in Spain. Lbis, 2006: 148, 641-648. doi: 10.1111/j.1474- 919X.2006.00561.x.

CAPÍTULO 4 – Considerações Finais

Os resultados obtidos fornecem evidências de que o monitoramento da ocorrência deste protozoário deve continuar, pois sabe-se que pode facilmente pode causar uma possível epidemia, levando a perdas para a natureza de diversas ordens de aves. Os zoológicos, centro de reabilitação e centros de pesquisa de animais, devem avaliar a libertação de animais que sobrevivem à infeção por *Trichomonas* sp., uma vez que, estes indivíduos podem ser assintomáticos durante anos, podendo contribuir, desta forma, para a dispersão do parasito.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Material suplementar ao capítulo II

Quadro 6. Resultados BLASTn das sequências obtidas nos ensaios de PCR para *Trichomonas* spp de aves capturadas de Ribeirão Preto, Franca, Jundiaí e Botucatu, (Brasil).

N°	**Espécie/ID***	**Gene**	**Tamanho da sequência (pb)**	***Querycover* (%)**	***E-value***	**Identidade (%)**	**Sequência do GenBank**
1	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	368	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
2	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	376	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
3	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	376	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (H733819)

4	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	372	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
5	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	387	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
6	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	383	100%	0	100 %	*Tetratrichomonas gallinarum* (MK770861)
7	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	367	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
8	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	386	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
9	Pombo doméstico	Região	386	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada

	Columba livia Franca	ITS1/5.8S/ITS2					em uma *Columba livia* na China (MH733819)
10	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	377	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma Columba livia na China (MH733819)
11	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	370	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na Espanha (EU881912)
12	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	383	100%	0	100 %	*Tetratrichomonas gallinarum* (MK770861)
13	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	376	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
14	Pombo doméstico *Columba livia*	Região ITS1/5.8S/ITS2	378	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia*

	Franca						na China (MH733819)
15	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	384	100%	0	100 %	*Tetratrichomonas gallinarum* (MK770861)
16	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	370	100%	0	100 %	*Tetratrichomonas gallinarum* (MK770861)
17	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	340	100%	0	100 %	*Tetratrichomonas gallinarum* (MK770861)
18	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	400	100%	0	100 %	*Tetratrichomonas gallinarum* (MK770861)
19	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	371	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
20	Pombo doméstico *Columba*	Região ITS1/5.8S/ITS2	299	100%	3e-142	99,65%	*Trichomonas* sp. detectada em uma

	livia Franca						*Streptopelia turtur* no Reino Unido (MT632478)
21	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	376	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
22	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	377	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
23	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	384	100%	0	100 %	*Tetratrichomonas gallinarum* (MK770861)
24	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	385	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
25	Pombo doméstico *Columba livia*	Região ITS1/5.8S/ITS2	410	100%	0	99,73%	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia*

	Franca						na Espanha (EU881912)
26	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	409	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819)
27	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	255	100%	2e-128	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733821.1)
28	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	366	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819.1)
29	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	366	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819.1)
30	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	358	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China

							(MH733819.1)
31	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	359	100%	0	100 %	*Tetratrichomonas gallinarum* (MK770861)
32	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	Região ITS1/5.8S/ITS2	351	100%	0	100 %	*Tetratrichomonas gallinarum* (MK770861)
33	Pombo doméstico *Columba livia* Jaboticabal	Região ITS1/5.8S/ITS2	339	99%	1e-172	99,71%	*Trichomonas* sp. detectada em um *Ramphastos dicolorus* (ON000429.1)
34	Pombo doméstico *Columba livia* Cultivo	Região ITS1/5.8S/ITS2	309	95%	4e-151	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733821.1)
35	Pombo doméstico *Columba livia* Cultivo	Região ITS1/5.8S/ITS2	358	100%	0	100 %	*Trichomonas* sp. detectada em uma *Columba livia* na China (MH733819.1)

36	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	850	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KP900038)- detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
37	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	817	100%	0	95,51%	*Trichomonas gallinae (KP900038)*- detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
38	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	777	100%	0	99,49%	*Trichomonas gallinae* (KX514374)- detectado em *Columba palumbus* na Espanha
38	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	811	100%	0	99,38%	*Trichomonas gallinae* (KX514374)- detectado em *Columba palumbus* na Espanha
39	Pombo doméstico *Columba*	*Fe-hidrogenase*	822	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-

	livia Franca						detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
40	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	809	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KX514374)-detectado em *Columba palumbus* na Espanha
41	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	867	100%	0	99,77%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
42	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	777	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KX514374)-detectado em *Columba palumbus* na Espanha
43	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	817	100%	0	99,76%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha

44	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	820	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
45	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	811	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KX514374) detectado em *Columba palumbus* na Espanha
46	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	859	100%	0	99.65%	*Trichomonas gallinae* (KP900040) detectado em *Columba livia* na Espanha
47	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	823	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae (KP900038)- detectado em Streptopelia decaocto* na Espanha
48	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	830	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KP900038)- detectado em *Streptopelia decaocto* na

							Espanha
49	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	895	100%	0.0	99.11%	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
50	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	837	100%	0.0	99.76%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
51	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	826	100%	0.0	99.76%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
52	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	838	100%	0.0	99.40%	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
53	Pombo doméstico *Columba*	*Fe-hidrogenase*	810	100%	0	100%	*Trichomonas gallinae* (AF446077)

	livia Franca						
54	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	862	100%	0.0	99.65%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
55	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	814	100%	0.0	99.51%	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
56	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	598	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KX514374) detectado em *Columba palumbus* na Espanha
57	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	842	100%	0.0	99.29%	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha

58	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	876	99%	0.0	99.43%	*Trichomonas gallinae* (KP900034)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
59	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	836	100%	0.0	99.76%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
60	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	862	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
61	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	905	98%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
62	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	843	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)

63	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	872	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
64	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	901	98%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
65	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	881	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
66	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	870	100%	0	99,66%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
67	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	890	100%	0	99,66%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha

68	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	819	100%	0	99,39%	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
69	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	741	100%	0	99,46%	*Trichomonas gallinae* (KX514374) detectado em *Columba palumbus* na Espanha
70	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	855	100%	0	99,77%	*Trichomonas gallinae (KP900040)-detectado em Columba livia na Espanha*
71	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	862	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae (KP900038)-detectado em Streptopelia decaocto na Espanha*
72	Pombo doméstico *Columba livia*	*Fe-hidrogenase*	850	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em

	Franca						*Streptopelia decaocto* na Espanha
73	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	829	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
74	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	865	100%	0	99,70%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
75	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	849	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
76	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	859	98%	0	99,41%	*Trichomonas gallinae* (KP900034)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
77	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	743	100%	0	99,46%	*Trichomonas gallinae* (KX514374) detectado em *Columba*

							palumbus na Espanha
78	Pombo doméstico *Columba livia* Cultivo	*Fe-hidrogenase*	881	98%	0	99,43%	*Trichomonas gallinae* (KP900034)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
79	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	855	100%	0	99,65%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
80	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	862	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
81	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	853	100%	0	99,77%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
82	Pombo doméstico *Columba*	*Fe-hidrogenase*	826	100%	0	99,52%	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-

	livia Franca						detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
83	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	863	100%	0	99,42%	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
84	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	828	100%	0	99,76%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
85	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	883	100%	0	99,66%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
86	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	822	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha

87	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	880	100%	0	99,66%	*Trichomonas gallinae* (KP900040)-detectado em *Columba livia* na Espanha
88	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	821	100%	0	99,76%	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
89	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	832	100%	0	99,52%	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
90	Pombo doméstico *Columba livia* Cultivo	*Fe-hidrogenase*	903	95%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
91	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	820	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha

92	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	850	99%	0	99,53%	*Trichomonas gallinae* (KP900038)-detectado em *Streptopelia decaocto* na Espanha
93	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	828	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
94	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	*Fe-hidrogenase*	810	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (AF446077)
95	Pombo doméstico *Columba livia* Cultivo	*Fe-hidrogenase*	859	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae (AF446077)*
96	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	18S rRNA	999	99%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (MK932772)-detectado em *Columba livia* em Portugal
97	Pombo doméstico *Columba*	18S rRNA	987	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (MK932772)-

	livia Franca						detectado em *Columba livia* em Portugal
98	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	18S rRNA	988	100%	0	99,90%	*Trichomonas gallinae* (MK932772)-detectado em *Columba livia* em Portugal
99	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	18S rRNA	1000	99%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (MK932772)-detectado em *Columba livia* em Portugal
100	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	18S rRNA	888	100%	0	99,89%	*Trichomonas gallinae* (MK932772)-detectado em *Columba livia* em Portugal
101	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	18S rRNA	1404	100%	0	99,86%	*Trichomonas gallinae* (EU215374)-detectado em *Eurasian dove* no Texas
102	Pombo doméstico *Columba livia*	18S rRNA	1331	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (MK932772)-detectado em

	Franca						*Columba livia* em Portugal
103	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	18S rRNA	1334	100%	0	100 %	*Trichomonas gallinae* (MK932772)-detectado em *Columba livia* em Portugal
104	Pombo doméstico *Columba livia* Franca	18S rRNA	1372	100%	0	99,93%	*Trichomonas gallinae* (MK932772)-detectado em *Columba livia* em Portugal

APÊNDICE B – Material suplementar ao capítulo II

Quadro 7. Resultados positivos (identificado com o número 1) e negativos (com o número 0) de ensaios de PCR para *Trichomonas* spp e cultura de aves capturadas de Franca.

ESPÉCIES	**ITS**	**FE HIDROGENASE**	**18S**	**CULTURA**	**CITOLOGIA**
1	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
2	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada

3	1	1	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
4	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
5	0	0	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
6	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
7	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
8	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
9	1	1	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
10	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
11	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
12	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada

13	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
14	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
15	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
16	1	1	1	1	Presença de protozoário compatível com *Trichomonas* sp.
17	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
18	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
19	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
20	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
21	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
22	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada

23	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
24	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
25	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
26	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
27	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
28	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
29	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
30	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
31	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
32	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada

33	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
34	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
35	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
36	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
37	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
38	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
39	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
40	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
41	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
42	1	1	1	1	Presença de protozoário compatível com *Trichomonas* sp.

43	1	0	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
44	1	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
45	1	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
46	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
47	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
48	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
49	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
50	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
51	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
52	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada

53	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
54	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
55	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
56	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
57	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
58	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
59	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
60	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
61	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
62	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada

63	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
64	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
65	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
66	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
67	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
68	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
69	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
70	0	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
71	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
72	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada

73	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
74	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
75	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
76	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
77	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
78	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
79	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
80	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
81	1	0	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
82	1	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada

83	1	0	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
84	1	0	1	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
85	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
86	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
87	1	0	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
88	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
89	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
90	1	1	1	1	Presença de protozoário compatível com *Trichomonas* sp.
91	1	1	1	1	Presença de protozoário compatível com *Trichomonas* sp.

92	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
93	1	0	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
94	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
95	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
96	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
97	1	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
98	1	1	0	1	Presença de protozoário compatível com *Trichomonas* sp.
99	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
100	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
101	1	1	1	1	Célula escamosa anucleada e nucleada

102	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
103	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
104	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
105	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
106	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
107	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
108	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
109	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
110	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
111	1	0	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada

112	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
113	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
114	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
115	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
116	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
117	1	1	0	1	Presença de protozoário compatível com *Trichomonas* sp.
118	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
119	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada
120	1	1	0	1	Célula escamosa anucleada e nucleada
121	0	0	0	0	Célula escamosa anucleada e nucleada