

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA RESSETTI DA SILVA

PERFIL SANITÁRIO DAS POPULAÇÕES DE PASSERIFORMES DOS
CAMPOS SULINOS COM FOCO NA REINTRODUÇÃO DE ESPÉCIE
CRITICAMENTE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO



CURITIBA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA RESSETTI DA SILVA

PERFIL SANITÁRIO DAS POPULAÇÕES DE PASSERIFORMES DOS
CAMPOS SULINOS COM FOCO NA REINTRODUÇÃO DE ESPÉCIE
CRITICAMENTE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dra. Rosangela Locatelli Dittrich

CURITIBA

2021



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BIANCA RESSETTI DA SILVA** intitulada: **PERFIL SANITÁRIO DAS POPULAÇÕES DE PASSERIFORMES DOS CAMPOS SULINOS COM FOCO NA REINTRODUÇÃO DE ESPÉCIE CRITICAMENTE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**, sob orientação da Profa. Dra. ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica
21/12/2021 11:43:26.0

ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
31/01/2022 14:49:16.0

PAULO ROGERIO MANGINI
Avaliador Externo (INSTITUTO BRASILEIRO PARA MEDICINA DA
CONSERVAÇÃO)

Assinatura Eletrônica
17/12/2021 10:24:49.0
SILVIA NERI GODOY

Avaliador Externo (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO
DA BIODIVERSIDADE)

Assinatura Eletrônica
23/09/2021 09:13:36.0

RALPH ERIC THIJL DEL VAL ONORO VANSTREELS
Avaliador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA E REABILITAÇÃO DE
ANIMAIS MARINHOS)

Assinatura Eletrônica
23/09/2021 16:02:55.0

ROGERIO RIBAS LANGE
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: cpgcv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 112594

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prrpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 112594

Dedico este trabalho aos cardeais-amarelos,
Deus em forma de passarinho,
por essa conexão,
que me alinhou ainda mais ao meu propósito nessa vida.

AGRADECIMENTOS

Gratidão Multiverso!

Gratidão aos seres de luz que me protegem e amparam sempre!

Gratidão à Terra, Gaia, Mãe Natureza, próspera e abundante que fornece tudo o que precisamos.

Gratidão ao Cosmos por um doutorado alinhado com o meu propósito de vida. Durante esse período, buscando equilíbrio e evolução, despertei e expandi ainda mais a minha consciência por meio de ferramentas de autoconhecimento e cura (quântica, energética e espiritual). Como muitas dessas técnicas são aplicáveis em animais, me aprofundei e fiz o primeiro curso de thetahealing para aplicar nos passeriformes do projeto. Assim, cursando o doutorado na área de diagnóstico (e paralelamente, me tornando terapeuta) além dos vírus, bactérias e hemoparasitas, eu aprendi diagnosticar as causas mais profundas das minhas dores e também dos animais e das pessoas que foram chegando até mim; tudo a partir da energia do amor incondicional (Deus que habita em nós), e ressignifiquei a minha carreira profissional de médica veterinária para curadora, pois meu dom se expandiu para auxiliar na cura agora em todos os níveis. Gratidão porque essa experiência me elevou.

Gratidão a todos os cardeais-amarelos, em especial a um indivíduo que deixou esse plano em cativeiro um dia antes do nosso encontro: eu vejo você, eu senti a tua dor por muito tempo, me perdoe por não mudar o mundo todo de uma só vez pra vocês, eu sinto muito pelo teu destino difícil, serei infinitamente grata por tudo que você me ensinou e continuarei na missão por você e todos os animais que precisem da minha voz.

Aos meus pais Mario e Edilene, pelo apoio, incentivo e amor incondicional. Aos meus irmãos Vinicius e Barbara, pela parceria e cumplicidade. Aos nossos animais de estimação por elevarem a vibração de casa: às cachorras Lana e Lara, à gata Sandy, às galinhas e aos peixes do lago, todos fazem parte.

À Natalia, minha irmã de alma, que me guiou e me guia nesse plano por meio da “nastrologia” me trazendo clareza nos processos. Você é um anjo amiga, passar por essa etapa com você do lado é muita benção!

À minha orientadora Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich pela confiança, paciência, apoio e orientação nos últimos seis anos. Sinto-me honrada por ter confiado a mim a primeira etapa desse trabalho tão importante e especial. Tua conexão com a natureza e os animais foi o que nos alinhou antes mesmo que soubéssemos. Te admiro muito!

À Universidade Federal do Paraná – UFPR pela oportunidade, pela estrutura e por estimular a pesquisa, através do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e a todos os professores pelos ensinamentos.

Aos residentes, pós-graduandos, técnicos e estagiários do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR, obrigada por toda ajuda, pelas risadas, conversas e momentos de lazer.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

Agradeço ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela oportunidade de trabalhar no Plano de Ação Nacional para a Conservação das Aves dos Campos Sulinos, por fornecer transporte e auxílio financeiro para as expedições de campo e pela estrutura do Laboratório de Análise da Água e Microbiologia da Estação Ecológica de Carijós disponibilizada para as análises microbiológicas.

À médica veterinária Patrícia Pereira Serafini, analista ambiental do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE) do ICMBio, por tudo que faz pela natureza e pelos animais; gratidão pela convivência em campo e no ICMBio, pelo apoio em todas as etapas do trabalho e principalmente pela amizade que nasceu aqui. Você é luz!

Aos biólogos do Laboratório de Ornitologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), Profa. Dra. Carla Suertegaray Fontana e seus orientados Dra. Thiane Weinert da Silva e Dr. Eduardo Chiarani, por toda ajuda e ensinamentos com os passeriformes. O Universo alinhou, pois se não fosse o Edu eu estaria perdida até hoje na savana de espinilho; se não fosse meu aniversário na primeira expedição e da Pati na segunda, os cardeais-amarelos não cairiam na rede... Foram presentes! Sintonia demais entre a equipe, muitas risadas e parceria, certamente um

reencontro! Agradeço também aos biólogos Márcio Repenning e Christian Beier pelos estudos prévios realizados com os cardeais-amarelos e por toda colaboração.

Ao gestor da Unidade de Conservação Estadual Parque Estadual do Espinilho, Maurício Scherer e aos funcionários da Secretaria do Meio Ambiente e Infraestrutura do Rio Grande do Sul, Rosangela Alves e Bruno Carvalho Fernandes, que acompanharam nossa equipe durante as expedições de campo, obrigada pela receptividade e todo suporte para o sucesso do trabalho, que incluiu mate e até marmitta vegetariana!

Muito obrigada ao Grupo Ceolin que cedeu a estrutura da Fazenda São João para que nossa equipe ficasse hospedada perto do Parque durante a expedição de campo facilitando nosso trabalho, gratidão por se importarem com a conservação ambiental.

Aos proprietários da Fazenda São Marcos, por permitir nossa entrada em sua propriedade para acessar as áreas de estudo.

À empresa Realiza Vídeo por desenvolver materiais de divulgação para o projeto de extensão universitária.

À médica veterinária, Isabela Xavier da Silva, aluna da graduação da UFPR na época, por seu dom artístico e por ilustrar os cardeais-amarelos para usarmos nos materiais de divulgação do projeto.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) do município de Uruguaiiana, ao chefe da unidade Diogo Feistauer e ao analista ambiental Sinval Kist, pela parceria na divulgação dos folders do projeto.

Ao Comando Ambiental da Brigada Militar por distribuir nossos materiais de divulgação nos postos da Polícia Ambiental do Rio Grande do Sul e também em atividades de educação ambiental nas escolas, obrigada pelo apoio.

À Empresa Gaúcha de Rodovias que distribuiu folders do projeto nos pedágios do Rio Grande do Sul, muito obrigada pela colaboração.

Aos amigos e colaboradores da Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Maria, Faculdade Murialdo e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, obrigada pela divulgação do projeto nessas instituições.

Ao biólogo Rafael Meurer, ao veterinário Sandro Sandri e aos estagiários da Associação R3 Animal, obrigado pelos ensinamentos e pela grande ajuda nas análises microbiológicas enquanto compartilhávamos o Laboratório do ICMBio.

À amiga Daphne Wrobel Goldberg pela conexão de almas que começou no laboratório do ICMBio, gratidão pela confiança e por disponibilizar o teu apartamento e me proporcionar uma estadia maravilhosa em Floripa.

Agradeço imensamente aos médicos veterinários, biólogos, estagiários, tratadores e funcionários dos cativeiros do Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo por abrirem suas portas e não medirem esforços para que esse trabalho acontecesse. Ao biólogo Claudio Maas, ao veterinário Rafael Sales Paganí e toda equipe do ZooPomerode; ao veterinário Renan Stadler e à bióloga Tatiane Takahashi e toda equipe do GramadoZoo; aos veterinários Paloma Bosso, Ligia Rigoletto e Mathias Dislich e toda equipe do Parque das Aves; muito obrigada pelo apoio ao projeto e todo auxílio nas coletas.

Aos médicos veterinários Cristiane Kolesnikovas e João Vítor Roeder e aos estagiários do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) – Florianópolis que colaboraram para a coleta de amostras de dois cardeais-amarelos apreendidos pelo IBAMA e que estavam em triagem antes de serem encaminhados ao Parque das Aves.

Ao Prof. Dr. Edison Luis Durigon, ao Dr. Luciano Thomazelli e às colegas Thais Gamon e Angélica Campos do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, obrigada pela colaboração no projeto e por toda ajuda com as análises moleculares.

Ao Dr. Ralph Vanstreels do Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos pela imensa colaboração no diagnóstico dos hemoparasitas.

À Profa. Dra. Erika Martins Braga e seus orientados Andréa Carvalho e Francisco Ferreira Junior da Universidade Federal de Minas Gerais, obrigada por toda ajuda com as análises moleculares.

Ao Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais (Cescage) por emprestar o botijão de nitrogênio líquido para o transporte das amostras.

A todos os terapeutas que foram essenciais nessa jornada: Christopher, Karina, Luciano, Lizamar, Sandra, Marina, Marcela, Giovani, Mathias, Patricia,

Ana, Nelson, Willian e Renata, por todas as ferramentas disponíveis e por todas as curas alcançadas.

À amiga Carolina Santos, obrigada por toda força e reconhecimento.

Às amigas Amanda e Terezinha, por sempre me receberem muito bem em Curitiba e fazerem das suas casas a minha.

Gratidão a todos os animais, pequenos e grandes, de companhia e de produção, domésticos e silvestres; seres de luz que foram essenciais na minha formação acadêmica, profissional, pessoal e espiritual, a vocês todo o meu respeito. Aos passeriformes que me conectei durante esse estudo; vocês são únicos e especiais, eu vejo vocês, eu honro vocês, vocês tem um lugar no meu coração e aqui na Terra.

Agradeço pela oportunidade de trabalhar com uma equipe multidisciplinar incrível formada por profissionais de diferentes instituições. E compreendendo que estamos todos conectados e que tudo é regido por uma inteligência divina, eu concluo essa etapa consciente de que servi à luz nessa missão. Esse trabalho me proporcionou conexões de alma, tanto com os cardeais-amarelos, quanto com a equipe de trabalho. Eu sou abençoada. Muito obrigada!

"Que todos os seres sejam livres e
felizes."

RESUMO

O cardeal-amarelo, *Gubernatrix cristata* (VIEILLOT, 1817), está classificado no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção como criticamente ameaçado. Restam 53 indivíduos de vida livre que habitam o Parque Estadual do Espinilho, não havendo monitoramento sanitário das populações, essenciais para a sua conservação. O presente trabalho foi realizado com a participação de uma equipe multidisciplinar de pesquisadores e em parceria com o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE/ICMBio), e contempla ações previstas no Plano de Ação Nacional (PAN) para Conservação das Aves dos Campos Sulinos e no Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo (PCCA) instituídos pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). A presente tese está dividida em quatro capítulos. O primeiro capítulo, intitulado “Molecular diagnosis of avian viruses in grassland passerines and captive Yellow Cardinals *Gubernatrix cristata* in Brazil”, objetivou avaliar a ocorrência de vírus da gripe aviária (VGA), vírus da doença de Newcastle (VDN), vírus do Nilo Ocidental (VNO), adenovírus (AV) e herpesvírus (HV) pela primeira vez nos passeriformes campestres do Parque Estadual do Espinilho, que abriga o cardeal-amarelo e em cardeais-amarelos do PCCA. Amostras de suabes cloacais e de orofaringe foram coletadas dos passeriformes e submetidas à extração de RNA e DNA e à reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para VGA, VDN e VNO e *nested* PCR para AV e HV. Somente um cardeal-amarelo de cativeiro apresentou resultado positivo para AV. Este é o primeiro relato de AV em cardeal-amarelo e de investigação epidemiológica de vírus em passeriformes silvestres do bioma Pampa, no Rio Grande do Sul, Brasil. O segundo capítulo intitulado “Blood parasites of passerines in the Brazilian Pampas and their implications for a potential population supplementation program for the endangered Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*)”, objetivou investigar os hemoparasitas nos passeriformes campestres do Parque Estadual do Espinilho e em cardeais-amarelos do PCCA. Foram realizadas avaliações microscópicas dos esfregaços sanguíneos dos passeriformes para identificar e caracterizar morfológicamente os parasitas hemosporídeos, nos quais foi observada uma prevalência de 10,9% nos

passeriformes de vida livre, compreendendo a morfoespécie *Haemoproteus erythrogravidus* em Tico-tico (*Zonotrichia capensis*), *H. quiscalus* em Asa-de-telha-escuro (*Agelaioides badius*), e *H. tyranni* em Bem-te-vi (*Pitangus sulphuratus*); estes são os registros mais ao sul para essas morfoespécies, e seus primeiros registros para o bioma Pampa. Não foram detectados parasitas hemosporídeos nos esfregaços de sangue de cardeais-amarelos, selvagens ou de cativeiro. A presença de microfilárias foi de 14,1% nos passeriformes selvagens e 43,3% em cardeais-amarelos cativos. Um cardeal-amarelo cativo estava parasitado por *Trypanosoma* sp., que foi detectado no esfregaço sanguíneo. A PCR aninhada e o sequenciamento do gene *cyt-b* de *Haemoproteus/Plasmodium* foram usados para testar um subconjunto de passeriformes selvagens e cardeais-amarelos cativos, permitindo o código de barras molecular da linhagem de *H. quiscalus* AGEBAD04 e da linhagem de *H. tyranni* PITSUL01; adicionalmente, DNA idêntico ao da linhagem PITSUL01 foi detectado no sangue de um cardeal-amarelo cativo. Este é o primeiro relato de microfilárias e *Trypanosoma* sp. em cardeal-amarelo. O terceiro capítulo, “Parâmetros leucocitários de cardeais-amarelos (*Gubernatrix cristata*) silvestres e cativos no Brasil”, objetivou avaliar os parâmetros leucocitários em cardeais-amarelos do PCCA e de vida livre. Amostras de sangue foram coletadas da veia ulnar de 33 cardeais-amarelos para confecção do esfregaço sanguíneo para avaliação leucocitária. Este estudo estabeleceu parâmetros de referência para o diferencial de leucócitos de cardeais-amarelos de vida livre e de cativeiro, verificou-se relação de heterófilo:linfócito média de 0,97 nos cardeais-amarelos cativos e 0,74 nos cardeais-amarelos de vida livre. O quarto capítulo “Microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos (*Gubernatrix cristata*) silvestres e cativos no Brasil” objetivou avaliar a microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos silvestres do Parque Estadual do Epinilho e do PCCA. Foram coletadas amostras de microbiota cloacal e de orofaringe de 30 cardeais-amarelos cativos e três cardeais-amarelos silvestres para análises microbiológicas e identificação de enterobactérias. Das amostras de microbiota oral e cloacal dos cardeais-amarelos foram isoladas 152 colônias de bactérias, nos indivíduos silvestres e de cativeiro a predominância de crescimento nas culturas foi de bactérias gram-negativas, sendo de 55,6% e 76,6% respectivamente. Esses resultados fornecem subsídios e suporte nas decisões

à conservação dessa espécie ameaçada de extinção e ajudam a compreender o estado de saúde dos passeriformes selvagens que coexistem nesse bioma, que é o único dos cardeais-amarelos no Brasil.

Palavras-chave: Cardeal-amarelo. Conservação. *Gubernatrix cristata*. Hematologia. Microbiologia. Vírus aviários.

ABSTRACT

The Yellow Cardinal, *Gubernatrix cristata* (VIEILLOT, 1817), is classified in the Red Book of Brazilian Fauna Threatened with Extinction as critically endangered. There remain 53 free-living individuals that inhabit the Espinilho State Park, with no sanitary monitoring of the populations, essential for its conservation. This work was carried out with the participation of a multidisciplinary team of researchers and in partnership with the “Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres” (CEMAVE/ICMBio), and includes actions based on the “Plano de Ação Nacional (PAN) para Conservação das Aves dos Campos Sulinos” and in the “Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo” (PCCA) established by the “Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade” (ICMBio). This thesis is divided into four chapters. The first chapter, entitled "Molecular diagnosis of avian viruses in grassland passerines and captive Yellow Cardinals *Gubernatrix cristata* in Brazil", aimed to evaluate the occurrence of avian influenza virus (AIV), Newcastle disease virus (NDV), West Nile virus (WNV), adenovirus (AV) and herpesvirus (HV) for the first time in grassland passerines in the Espinilho State Park, which houses the Yellow Cardinal and in Yellow Cardinals maintained by the PCCA. Samples of cloaca and oropharynx swabs were collected from passerines and subjected to RNA and DNA extraction and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for AIV, NDV and WNV and nested PCR for AV and HV. Only one captive Yellow Cardinal tested positive for AV. This is the first report of AV in Yellow Cardinal and of an epidemiological investigation of viruses in wild passerines from the Pampa biome, in Rio Grande do Sul, Brazil. The second chapter, entitled “Blood parasites of passerines in the Brazilian Pampas and their implications for a potential population supplementation program for the endangered Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*)”, aimed to investigate the hemoparasites in grassland passerines from Espinilho State Park and in PCCA Yellow Cardinals. Microscopic evaluations of the blood smears of the passerines were performed to identify and morphologically characterize the hemosporidian parasites, in which a prevalence of 10,9% was observed in free-living passerines, comprising the morphospecies *Haemoproteus erythrogravidus* in Rufous-collared Sparrow (*Zonotrichia*

capensis), *H. quiscalus* in Grayish Baywing (*Agelaioides badius*), and *H. tyranni* in Great Kiskadee (*Pitangus sulphuratus*); these are the southernmost records for these morphospecies, and their first record for the Pampas biome. No haemosporidian parasites were detected in the blood smears of Yellow Cardinals, wild or captive. Microfilariae were detected in the blood smears of 14.1% of the wild passerines, and in 43.3% of captive Yellow Cardinals. *Trypanosoma* sp. was detected in the blood smear of one captive Yellow Cardinal. Nested PCR and gene sequencing of the *cyt-b* gene of *Haemoproteus/Plasmodium* was used to test a subset of wild passerines and captive Yellow Cardinals, allowing for the molecular barcoding of *H. quiscalus* lineage AGEBAD04 and *H. tyranni* lineage PITSUL01; additionally, DNA identical to that of lineage PITSUL01 was detected in the blood of one captive Yellow Cardinal. This is the first report of microfilariae and *Trypanosoma* sp. in Yellow Cardinal. The third chapter, “Parâmetros leucocitários de cardeais-amarelos (*Gubernatrix cristata*) silvestres e cativos no Brasil” aimed to evaluate the leukocyte parameters in PCCA and free-living Yellow Cardinals. Blood samples were collected from the ulnar vein of 33 Yellow Cardinals to make blood smears for leukocyte evaluation. This study established reference parameters for the differential of leukocytes from free-living and captive Yellow Cardinals, with a mean heterophil:lymphocyte ratio of 0.97 in captive Yellow Cardinals and 0.74 in free living Yellow Cardinals. The fourth chapter “Microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos (*Gubernatrix cristata*) silvestres e cativos no Brasil” aimed to evaluate the cloacal and oropharyngeal microbiota of wild Yellow Cardinals from Epinilho State Park and PCCA. Cloacal and oropharyngeal microbiota samples of 30 captive Yellow Cardinals and three wild Yellow Cardinals were collected for microbiological analysis and identification of enterobacterias. From the samples of oral and cloacal microbiota of the Yellow Cardinals, 152 colonies of bacteria were isolated, in wild and captive individuals, the predominance of growth in the cultures was of gram-negative bacterias, being 55.6% and 76.6% respectively. These results provide subsidies and support in decisions for the conservation of this endangered species and help to understand the health status of wild passerines that coexist in this biome, which is the only place with Yellow Cardinals in Brazil.

Keywords: Yellow Cardinal. Conservation. *Gubernatrix cristata*. Hematology. Microbiology. Avian virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 1

FIGURE 1 - PHYLOGENETIC TREE OF 240 NUCLEOTIDE POLYMERASE GENE. SEQUENCE OBTAINED IN THIS STUDY WAS HIGHLIGHTED IN RED. MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS BY MAXIMUM LIKELIHOOD (ML) METHOD. THE EVOLUTIONARY HISTORY WAS INFERRED BY USING THE ML METHOD BASED ON THE GENERAL TIME REVERSIBLE MODEL (GTR). INITIAL TREE(S) FOR THE HEURISTIC SEARCH WERE OBTAINED AUTOMATICALLY BY APPLYING NEIGHBOR-JOIN (NJ) AND BIONJ ALGORITHMS TO A MATRIX OF PAIRWISE DISTANCES ESTIMATED USING THE MAXIMUM COMPOSITE LIKELIHOOD (MCL) APPROACH, AND THEN SELECTING THE TOPOLOGY WITH SUPERIOR LOG LIKELIHOOD VALUE. A DISCRETE GAMMA DISTRIBUTION WAS USED TO MODEL EVOLUTIONARY RATE DIFFERENCES AMONG SITES (5 CATEGORIES+G). THE TREE IS DRAWN TO SCALE, WITH BRANCH LENGTHS MEASURED IN THE NUMBER OF SUBSTITUTIONS PER SITE. CODON POSITIONS INCLUDED WERE 1ST+2ND+3RD+NONCODING. ALL POSITIONS WITH LESS THAN 95% SITE COVERAGE WERE ELIMINATED. THE BOOTSTRAP VALUE UNDER 75% WAS SUPPRESSED. EVOLUTIONARY ANALYSES WERE CONDUCTED IN MEGA7.....47

CAPITULO 2

FIGURE 1 – GEOGRAPHIC LOCATION (A) AND PHYTOPHYSIOGNOMY (B) OF ESPINILHO STATE PARK, BRAZIL. ECO-REGIONS: (1) URUGUAYAN SAVANNA, (2) SOUTHERN CONE MESOPOTAMIAN SAVANNA, (3) ESPINAL, (4) HUMID PAMPAS, (5) PARANÁ FLOODED FOREST, (6) HUMID CHACO, (7) ALTO PARANÁ ATLANTIC FOREST, (8) ARAUCARIA MOIST FOREST, (9) SERRA DO MAR COASTAL FOREST (ADAPTED FROM OLSON et al. 2001).....59

FIGURE S1. MICROFILARIAE IN THE BLOOD SMEARS OF CAPTIVE YELLOW CARDINAL (*Gubernatrix cristata*) AND WILD PASSERINES AT ESPINILHO STATE PARK. HOST SPECIES: (A) WILD YELLOW CARDINAL (SAMPLE 2PEEF), (B) WILD YELLOW CARDINAL (SAMPLE 2PEEF), (C) CAPTIVE YELLOW CARDINAL (SAMPLE PA15), (D) CAPTIVE YELLOW CARDINAL (SAMPLE PA15), (E) SAYACA TANAGER (*Thraupis sayaca*, SAMPLE PEE23), (F) MASKED GNATCATCHER (*Polioptila dumicola*, SAMPLE PEE24), (G) GOLDEN-BILLED SALTATOR (*Saltator aurantiirostris*, SAMPLE PEE53), (H) RED-CRESTED CARDINAL (*Paroaria coronata*, SAMPLE PEE55), (I) CHALK-BROWED MOCKINGBIRD (*Mimus saturninus*, SAMPLE PEE58), (J) BROWN CACHOLOTE (*Pseudoseisura lophotes*, SAMPLE PEE60). MAY GRÜNWARD-GIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 50 μ M.....65

FIGURE S2. *Trypanosoma* sp. IN THE BLOOD SMEAR OF A CAPTIVE YELLOW CARDINAL (*Gubernatrix cristata*). LEGEND: (K) KINETOPLAST, (F) FLAGELLUM, (N) NUCLEUS, (V) VACUOLES. SAMPLE PA15, MAY GRÜNWARD-GIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 10 μ M.....67

FIGURE. 2. *Haemoproteus tyranni* LINEAGE PITSUL01 IN GREAT KISKADEE (*Pitangus sulphuratus*). LEGEND: (A–D) YOUNG GAMETOCYTES, (E–L) MACROGAMETOCYTES, (M–P) MICROGAMETOCYTES. SAMPLE PEE54, MAY GRÜNWARDGIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 5 μ M.....69

FIGURE 3. *Haemoproteus quisqualis* LINEAGE AGEBAD04 IN GRAYISH BAYWING (*Agelaioides badius*). LEGEND: (A–D) YOUNG GAMETOCYTES, (E–L) MACROGAMETOCYTES, (M–P) MICROGAMETOCYTES. SAMPLE PEE38, MAY GRÜNWARDGIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 5 μ M.....70

FIGURE 4. *Haemoproteus erythrogravidus* IN RUFIOUS-COLLARED SPARROW (*Zonotrichia capensis*). LEGEND: (A–D) YOUNG GAMETOCYTES, (E–L) MACROGAMETOCYTES, (M–P) MICROGAMETOCYTES. SAMPLE PEE14, MAY GRÜNWARDGIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 5 μ M.....72

FIGURE S3. MACROGAMETOCYTES OF AN UNIDENTIFIED HAEMOSPORIDIAN PARASITE (*Haemoproteus* OR *Plasmodium*) FROM

RUFOUS HORNERO (*Furnarius rufus*). SAMPLE PEE29, MAY GRÜNWALD-GIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 5 μ M.....72

FIGURE 5. BAYESIAN PHYLOGENETIC TREE OF A 479 BP SEGMENT OF THE CYT-B GENE OF HAEMOSPORIDA (BLUE = *Haemoproteus*, GREEN = *Plasmodium*, PINK = *Leucocytozoon*). THE PHYLOGENETIC BRANCH WITH THE LINEAGES IDENTIFIED IN THIS STUDY IS SHOWN TO THE RIGHT. BRANCH LENGTHS ARE DRAWN PROPORTIONALLY TO THE EXTENT OF CHANGES (SCALE-BARS ARE SHOWN). VALUES ADJACENT TO NODES REPRESENT POSTERIOR PROBABILITIES. MALAVI LINEAGE NAMES ARE PROVIDED FOR LINEAGES. LINEAGES OBTAINED IN THIS STUDY ARE HIGHLIGHTED IN RED.....73

FIGURE S4. BAYESIAN PHYLOGENETIC TREE OF A 479 BP SEGMENT OF THE CYT-B GENE OF HAEMOSPORIDA. BRANCH LENGTHS ARE DRAWN PROPORTIONALLY TO THE EXTENT OF CHANGES (SCALE-BAR IS SHOWN). VALUES ADJACENT TO NODES REPRESENT POSTERIOR PROBABILITIES. MALAVI LINEAGE NAMES ARE PROVIDED FOR LINEAGES. LINEAGES OBTAINED IN THIS STUDY ARE HIGHLIGHTED IN RED.....74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABLE 1 - COMPLETE INFORMATION ABOUT PRIMERS, SIZE OF AMPLICON, TARGETED GENES AND REFERENCES FOR EACH ASSAY.....	44
---	----

CAPITULO 2

TABLE 1 - SUMMARY OF THE SAMPLING EFFORT AND PREVALENCE OF BLOOD PARASITES IN WILD PASSERINES SAMPLED AT ESPINILHO STATE PARK AND IN CAPTIVE YELLOW CARDINALS (<i>Gubernatrix cristata</i>) AT FACILITIES IN SOUTHERN BRAZIL. LEGEND: H = <i>Haemoproteus</i> , M = microfilariae, T = <i>Trypanosoma</i> , H/P = <i>Haemoproteus</i> or <i>Plasmodium</i> . SAMPLE SIZES ARE REPRESENTED AS “NUMBER OF BLOOD SMEARS [NUMBER OF SAMPLES TESTED WITH PCR]”.....	63
--	----

TABLE S1. MORPHOMETRIC RESULTS OF TWO <i>Trypanosoma</i> sp. TRIPOMASTIGOTES IN A CAPTIVE YELLOW CARDINAL (<i>Gubernatrix cristata</i>). SAMPLE PA15.....	67
---	----

TABLE S2. MORPHOLOGICAL CHARACTERS USED TO DIFFERENTIATE <i>Haemoproteus anthi</i> , <i>H. orizivora</i> , <i>H. pastoris</i> AND <i>H. tyranni</i> (ADAPTED FROM VALKIŪNAS 2005).....	70
--	----

TABLE 2. SUMMARY OF MOLECULAR SURVEYS ON THE PREVALENCE OF HAEMOSPORIDIAN PARASITES IN WILD PASSERIFORMES BIRDS IN THE PAMPAS BIOME. LEGEND: H = <i>Haemoproteus</i> , P = <i>Plasmodium</i> , H/P = <i>Haemoproteus</i> or <i>Plasmodium</i>	76
---	----

CAPITULO 3

TABELA 1 - PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS EM CARDEAIS-AMARELOS SILVESTRES DO PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO - RS, 2019.....	92
---	----

TABELA 2 - PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS EM CARDEAIS-AMARELOS DO PCCA (ZOOPOMERODE-SC, PARQUE DAS AVES-PR E GRAMADOZOO-RS), 2018 E 2019.....	92
---	----

CAPITULO 4

TABELA 1 - CRESCIMENTO MICROBIANO DAS AMOSTRAS DE MICROBIOTA CLOACAL E DE OROFARINGE DE CARDEAIS-AMARELOS CATIVOS E DE VIDA LIVRE DO PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO, COLETAS DE FEVEREIRO E DEZEMBRO DE 2019.....	102
---	-----

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AIV - Avian influenza viruses

AV - adenovirus

BHI - *brain heart infusion*

CEMAVE - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Ex situ- que está fora do seu ambiente natural

HV - herpesvirus

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

In situ - que está no seu ambiente natural

NDV - Newcastle disease virus

PAN - Plano de Ação Nacional

PCCA - Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo

PCR - Polymerase Chain Reaction

RNA - ribonucleic acid

RT-PCR - Real-Time Polymerase Chain Reaction

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

UC- Unidade de Conservação

UFPR - Universidade Federal do Paraná

WNV - West Nile virus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	26
1.1 HIPÓTESES.....	30
1.2 OBJETIVOS.....	31
1.2.1 Objetivo geral.....	31
1.2.2 Objetivos específicos.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
2. CAPÍTULO 1. MOLECULAR DIAGNOSIS OF AVIAN VIRUSES IN GRASSLAND PASSERINES AND CAPTIVE YELLOW CARDINALS <i>Gubernatrix cristata</i> IN BRAZIL	36
ABSTRACT.....	36
RESUMO.....	37
2.1 INTRODUCTION.....	38
2.2 MATERIALS AND MÉTHODS.....	40
2.2.1 Ethics committee.....	41
2.2.2 Study area.....	41
2.2.3 Passerines.....	41
2.2.4 Sample collection.....	42
2.2.5 RNA and DNA extraction.....	43
2.2.6 Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).....	43
2.2.7 Nested PCR.....	45
2.2.8 Agarose gel electrophoresis.....	45

2.2.9 Purification, sequencing and phylogenetic analysis.....	46
2.2.10 Sequence submission.....	46
2.3 RESULTS.....	46
2.4 DISCUSSION.....	48
2.5 CONCLUSION.....	50
REFERENCES.....	50
3. CAPÍTULO 2. BLOOD PARASITES OF PASSERINES IN THE BRAZILIAN PAMPAS AND THEIR IMPLICATIONS FOR A POTENTIAL POPULATION SUPPLEMENTATION PROGRAM FOR THE ENDANGERED YELLOW CARDINAL (<i>Gubernatrix cristata</i>).....	56
ABSTRACT.....	56
RESUMO.....	57
3.1 INTRODUCTION.....	58
3.2 MATERIALS AND METHODS.....	61
3.3 RESULTS	65
3.4 DISCUSSION.....	76
3.5 ACKNOWLEDGEMENTS.....	80
REFERENCES.....	80
4. CAPÍTULO 3. PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS DE CARDEAIS-AMARELOS (<i>Gubernatrix cristata</i>) SILVESTRES E CATIVOS NO BRASIL.....	88
RESUMO.....	88
4.1 INTRODUÇÃO.....	88

4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	90
4.2.1 Local do estudo.....	90
4.2.2 Passeriformes.....	90
4.2.2.1 Silvestres.....	90
4.2.2.2 Cativos.....	91
4.2.3 Coleta de amostras.....	91
4.2.4 Exames laboratoriais.....	91
4.3 RESULTADOS.....	91
4.4 DISCUSSÃO.....	93
4.5 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS.....	94
5. CAPÍTULO 4. MICROBIOTA CLOACAL E DE OROFARINGE DE CARDEAIS-AMARELOS (<i>Gubernatrix cristata</i>) SILVESTRES E CATIVOS NO BRASIL.....	97
RESUMO.....	97
5.1 INTRODUÇÃO.....	98
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
5.2.1 Local do estudo.....	99
5.2.2 Passeriformes.....	99
5.2.3 Coleta de amostras.....	100
5.2.4 Exames laboratoriais.....	100
5.3 RESULTADOS.....	101

5.4 DISCUSSÃO.....	102
5.5 CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS.....	104
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
REFERÊNCIAS.....	108
7. ANEXOS.....	123
7.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA SCA.....	123
7.2 CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA – SISBIO (SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE).....	124
7.3 CAPÍTULO 1. PUBLICADO EM FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO....	129
7.4 PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS EM CARDEAIS-AMARELOS SILVESTRES (PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO) E DO PCCA (ZOOPOMERODE-SC, PARQUE DAS AVES-PR E GRAMADOZOO-RS), 2018 E 2019.....	130
7.5 PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS DOS PASSERIFORMES DO PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO, BARRA DO QUARAÍ, 2019.....	131
7.6 MICROBIOTA CLOACAL E DE OROFARINGE DOS PASSERIFORMES DO PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO (PARCIAL).....	133
7.7 RESUMOS APRESENTADOS NO XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ORNITOLOGIA - VILA VELHA - ES 2019	134
7.8 MAPA COM LOCALIZAÇÃO DO BIOMA PAMPA NO BRASIL– IBFLORESTAS 2020.....	136

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil está entre os três países do mundo com a maior riqueza de avifauna, com 1.971 espécies de aves (PACHECO et al. 2021). Destas espécies, 234 estão na Lista Oficial da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBIO, 2014). Quinze espécies de passeriformes presentes nos Campos Sulinos e Espinilho estão atualmente ameaçadas de extinção (ICMBIO, 2014). O Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) instituiu a Portaria nº 21, publicada no Diário Oficial da União em 17 de fevereiro de 2012, que aprova o Plano de Ação Nacional (PAN) para a Conservação das Aves dos Campos Sulinos. O objetivo geral deste PAN é melhorar o estado de conservação das espécies alvo (MARTINSFERREIRA et al., 2013).

Os Campos Sulinos são ecossistemas naturais com alta diversidade de espécies vegetais e animais, ocupa uma área de 176,5 mil km² (aproximadamente 2% do território nacional) (IBF, 2020). São os campos nativos dos biomas brasileiros Pampa e Mata Atlântica e que se estendem sobre amplas regiões do Brasil, Uruguai e Argentina (PILLAR et al., 2009). Constituído principalmente por vegetação campestre (gramíneas, herbáceas e algumas árvores), no Brasil está restrito ao estado do Rio Grande do Sul, ocupa uma área de 63% do território gaúcho (ANEXO 7.8) (IBF, 2020).

Os passeriformes habitam áreas de várzea, espinilho e campos nativos, sendo muito sensíveis às alterações ambientais antrópicas. O avanço desordenado de monoculturas de grãos (soja, milho, trigo) e da pecuária intensiva, a expansão da silvicultura com espécies exóticas (pinus e eucaliptos) são as atividades no Sul do Brasil que mais contribuem para a eliminação de remanescentes de campos nativos habitados pelos passeriformes (MARTINSFERREIRA et al., 2013). A perda e a degradação dos habitats são os principais fatores que causam a redução da população de passeriformes, associado ao tráfico, à caça e à introdução de espécies exóticas e doenças (MARTINSFERREIRA et al., 2013).

A redução do tamanho populacional de espécies é influenciada também por componentes biológicos intrínsecos de cada espécie. O grau de

endemismo, a categoria trófica, a variabilidade genética e características evolutivas podem tornar algumas espécies mais susceptíveis à extinção quando atuam isoladamente ou em conjunto (GRELLE et al., 2006).

A supressão dos ambientes naturais e a consequente fragmentação do habitat é uma das maiores ameaças à biodiversidade e a presença da fauna está se limitando a Unidades de Conservação (UC), o que acarreta em adensamento populacional, favorecendo a transmissão de patógenos (EPSTEIN, 2002). A proximidade entre pessoas, de espécies silvestres e domésticas pode propiciar a adaptação em novos hospedeiros e a disseminação por novos ambientes (MANGINI e SILVA, 2007) ou ser responsável pela alta prevalência de patógenos em espécies silvestres (MARINI et al., 1996). Adicionalmente, espécies invasoras podem carrear novos patógenos às espécies residentes (PRIMACK, 2001).

Além disso, o aumento no estresse dos indivíduos, por competição ou redução de alimento, torna-os mais susceptíveis a doenças, assim como a introdução de substâncias tóxicas e as mudanças no padrão de uso e ocupação do solo influenciam a relação hospedeiro-parasita (MANGINI e SILVA, 2007). Desta forma, a alteração ambiental leva a respostas diversas nos vetores, que também afetam o equilíbrio entre parasitas e na saúde das populações (CHAZAR et al., 2009).

Um passeriforme criticamente ameaçado no Brasil é o cardeal-amarelo (ICMbio, 2018), *Gubernatrix cristata* (VIEILLOT, 1817), que em 1970 era considerado escasso no país, e atualmente subsiste em números inferiores a 100 indivíduos na natureza. Um estudo recente sobre a população de cardeais-amarelos em toda a área da savana de Espinilho no Brasil estimou que existem apenas 53 indivíduos remanescentes (BEIER et al., 2017). Segundo o ICMbio, a tendência é a extinção da ave no país se medidas não forem tomadas para coibir a captura e tentar recuperar as populações viáveis na natureza (MARTINS-FERREIRA et al. 2013). De acordo com a *International Union for Conservation of Nature's* (IUCN) *Red List of Threatened Species* o cardeal-amarelo é classificado como em risco de extinção (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2018).

O cardeal-amarelo é uma espécie de passeriforme monotípica, rara e elusiva. O padrão de coloração da sua plumagem é inconfundível, nenhuma espécie simpátrica apresenta padrão semelhante. O macho possui topete e garganta pretos, com dorso oliváceo e ventre amarelo. A fêmea possui o mesmo padrão, diferindo por apresentar branco na sobranalha e na estria malar e cinza no peito e flancos (RIDGELY & TUDOR, 2009). Além da bela plumagem, o macho possui um canto potente e melodioso (RIDGELY & TUDOR, 2009). A deficiência de informações a respeito de *G. cristata* é notável. As informações disponíveis na literatura restringem-se basicamente a registros de ocorrência, sistemática, registros de hibridação, ameaças e estado de conservação. Habita áreas semiabertas com arbustos ou árvores esparsas (BELTON 1994, DIAS 2008, RIDGELY & TUDOR 2009). O cardeal-amarelo se alimenta geralmente andando no solo (SICK 1997), de sementes e insetos, mas também de folhas. O sucesso reprodutivo registrado para os casais mantidos em cativeiro tem sido extremamente baixo e a necessidade de incrementar o número da população no ambiente natural motivou a criação do Programa Oficial de Cativeiro do Cardeal-amarelo, publicado através da Portaria ICMBio nº. 49 em 30 de abril de 2014, no Diário Oficial da União. Este Programa aponta a necessidade de incrementar as ações *ex-situ* para a conservação da espécie. O tráfico de animais persiste como a principal ameaça à espécie. A captura e comércio ilegal desta ave fez com que as populações na natureza reduzissem drasticamente ao longo de poucas décadas (DIAS 2008, RIDGELY & TUDOR 2009, AZPIROZ et al. 2012, MARTINS-FERREIRA et al., 2013).

Os trabalhos a respeito da sanidade de passeriformes no Brasil são escassos (BRACONARO, 2015; BEIER, 2019) principalmente devido à dificuldade de coleta de amostras (quantidade) e contenção física dos animais (estresse). Os animais saudáveis ou doentes podem transmitir diversos microrganismos, como vírus, bactérias ou fungos (HUBALEK, 2004). Os estudos microbiológicos nos pássaros silvestres e o potencial risco de tais microrganismos são de extrema importância para reduzir doenças emergentes e contribuir com a conservação da biodiversidade (BRACONARO, 2015).

No Brasil os estudos de ocorrência e prevalência das doenças ou de microrganismos patogênicos em passeriformes de vida livre e em cativeiro são limitados. Algumas espécies de passeriformes, principalmente as apreendidas por captura ilegal e mantidas em centros de reabilitação, são incluídas em estudos de prevalência de doenças (BRAZ et al., 2009; GOMES et al., 2010; LIMA et al., 2011). Entretanto, considerando que vários microrganismos de risco infectam as aves sem causar doença e também a grande quantidade de espécies de passeriformes no país, há iminente necessidade de aumentar o número de aves avaliadas para ampliar a base de dados de ocorrência das doenças e dos microrganismos. Em aves de produção existem mais dados sobre a ocorrência e fatores de risco associados aos diferentes tipos de microrganismos (DE SÁ et al., 2015).

Os estudos de ocorrência de doenças em passeriformes são realizados principalmente na Grã-Bretanha, Europa e Estados Unidos, devido ao potencial que essas aves têm de carrear microrganismos de interesse na saúde pública e no interesse dos pesquisadores em assegurar o bem-estar da avifauna introduzida e nativa (SIMPSON, 2006; BECKMANN et al., 2014)

Os passeriformes contribuem com o fenômeno global das “doenças emergentes”. As doenças emergentes podem ter origem na vida selvagem e causar doenças em humanos e animais, aumentando o interesse nos microrganismos carreados por essas aves. Como exemplo, a Febre do Oeste do Nilo, que causou grande mortalidade em passeriformes e em humanos na América do Norte e tem nos passeriformes os principais amplificadores dos vírus no ambiente (ARAÚJO, 2014).

Programas de monitoramento de doenças que envolvam metodologias de vigilância de populações podem elucidar mudanças na sanidade destas, antes da ocorrência de alterações em seu tamanho ou estrutura (KARESH et al., 1997). A elaboração de base de dados de avaliação sanitária, parâmetros hematológicos, bioquímicos e microbiológicos das espécies de passeriformes ameaçadas, em vida livre e em cativeiro, seria essencial para determinar o *status* de saúde das populações e serve como referência para o monitoramento e avaliações futuras dessas aves, além de potencialmente embasar decisões

de manejo (solturas, reintrodução, entre outras), contribuindo nas iniciativas de conservação dos táxons ameaçados (KOLENISKOVAS et al., 2012).

A partir da necessidade de novas pesquisas, o presente trabalho foi desenvolvido e dividido em quatro capítulos. O primeiro capítulo, com o título “Molecular diagnosis of avian viruses in grassland passerines and captive Yellow Cardinals *Gubernatrix cristata* in Brazil”, aborda a pesquisa de vírus aviários com potencial zoonóticos e patogênicos em passeriformes de vida livre do Parque Estadual do Espinilho e em cardeais-amarelos cativos. O segundo capítulo intitulado “Blood parasites of passerines in the Brazilian Pampas and their implications for a potential population supplementation program for the endangered Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*)”, aborda a pesquisa de hemoparasitas em passeriformes de vida livre do Parque Estadual do Espinilho e em cardeais-amarelos cativos. O terceiro capítulo, intitulado “Parâmetros leucocitários de cardeais-amarelos (*Gubernatrix cristata*) silvestres e cativos no Brasil” aborda a avaliação leucocitária dos cardeais-amarelos cativos e de vida livre do Parque Estadual do Espinilho. O quarto capítulo elaborado aborda a caracterização das colônias de bactérias e identificação de enterobactérias presentes na cloaca e orofaringe dos cardeais-amarelos cativos e de vida livre do Parque Estadual do Espinilho e foi intitulado “Microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos (*Gubernatrix cristata*) silvestres e cativos no Brasil”.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o número de protocolo 038/2018 (ANEXO 7.1) e pelo ICMBio através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o número de protocolo 53935 (ANEXO 7.2).

1.1 HIPÓTESES

Os passeriformes silvestres e de cativeiro avaliados são livres de vírus.

Os cardeais-amarelos de cativeiro têm mais infecções por hemoparasitas que os de vida livre.

Os parâmetros leucocitários dos cardeais-amarelos cativos são indicativos de estresse.

Os cardeais-amarelos silvestres têm a microbiota diferente dos cardeais-amarelos de cativeiro.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Este estudo objetivou avaliar pela primeira vez o *status* sanitário dos passeriformes de uma área única protegida no Sul do Brasil, que abriga o cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) criticamente ameaçado de extinção e dos cardeais-amarelos do Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo; por meio da pesquisa de vírus aviários, avaliação da microbiota cloacal e de orofaringe, análise dos parâmetros leucocitários e pesquisa de hemoparasitas.

1.2.2 Objetivos específicos

Avaliar a ocorrência dos vírus da gripe aviária, da doença de Newcastle, do Nilo Ocidental, adenovírus e herpesvírus pela primeira vez em passeriformes silvestres do Parque Estadual do Espinilho e em cardeais-amarelos cativos.

Investigar a ocorrência de hemoparasitas em passeriformes silvestres do Parque Estadual do Espinilho e em cardeais-amarelos cativos.

Avaliar os parâmetros leucocitários: contagem diferencial de leucócitos e relação heterófilos:linfócitos de cardeais-amarelos silvestres e cativos.

Identificar as enterobactérias e a microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos silvestres e cativos.

REFERENCIAS

ARAÚJO, F.A.A. **Febre do Nilo Ocidental**. Capítulo 58. P.1250 In Cubas, Z.; Silva, J.C.R.; Catão-Dias J.L. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. 2.ed. São Paulo:Roca. 2470 pp., 2014.

AZPIROZ A.B., ALFARO M. & JIMÉNEZ S. *Lista roja de las aves del Uruguay: una evaluación del estado de conservación de la avifauna nacional con base en los criterios de la Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza*. Montevideo: Dirección Nacional de Medio Ambiente, 2012.

BRACONARO, P.; SAIDENBERG, B.S.; BENITES, N.; ZUNIGA, E.; SILVA, A.M.J.; SANCHES, T.; ZWARG, T.; BRANDÃO, P.E.; MELVILLE, P.A. Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 65-72, 2015.

BECKMANN, KM; BOREL, N.; POCKNELL, AM; DAGLEISH, MP; SACHSE, K.; JOHN, SK; POSPISCHIL, A.; CUNNINGHAM, AA; LAWSON, B. Chlamydiosis in British Garden Birds (2005-2011): Retrospective diagnosis and *Chlamydia psittaci* genotype determination. **Ecohealth**, v. 11, n. 4, p. 544-563, 2014.

BEIER, C; FONTANA, C. S. Breeding biology of the endangered Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata* in Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia - Brazilian Journal of Ornithology**, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 44-52, jul. 2019. ISSN 2178-7875.

BEIER, C., REPENNING, M., PEREIRA, M., PEREIRA, A., & FONTANA, C.) Cooperative breeding and demography of Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata* in Brazil. **Revista Brasileira De Ornitologia - Brazilian Journal Of Ornithology**, 25(1), 12-19, 2017.

BELTON, W. **Aves do Rio Grande do Sul: Distribuição e biologia**. São Leopoldo: Ed. UNISINOS. 1994. BLANCO, J.M.; WILDT, D.E.; HOFLE, U. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, v. 71, p. 200-213, 2009.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Gubernatrix cristata*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22721578A131888081.en>. Downloaded on 03 October 2021.

BRASIL - **Plano de Ação Nacional para Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho - PAN Campos Sulinos e Espinilho** Portaria nº 214, de 8 de julho de 2009. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, 212. 2009.Legislação Federal.

BRAZ, M.A.; SILVA, D.C.; SANTIAGO, M.E.B.; GARCIA, S.D. NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, M.V. Detecção e classificação molecular de *Chlamydomphila*

psittaci em amostras fecais de aves assintomáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 161-167, 2014.

CHAZAR, A.; LOISEAU, C.; VALKIUNAS, G.; IEZHOVA, T.; SMITH, T. B.; SEHGAL, R. N. M. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4121-4133, 2009.

CLYDE, V. L.; PATTON, S. Diagnosis, Treatment, and Control of Common Parasites in Companion and Aviary Birds, **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 5, n. 2 p. 75-84, 1996 CLSI - CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Document M100-S22 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Informational Supplement. Twenty-Second. v.32, n.3, 184p., 2012.

DE MATOS, R.; MORRISSEY, J.K. Emergency and critical care of small psittacines and passerines. **Seminars in avian and exotic pet medicine**, v. 14, n. 2, p. 90-105, 2005.

DE SÁ, S.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; VILELA, S.M.O.; MORAES, E. P.B.X.; ALBUQUERQUE, P.P.F.; FERREIRA, D.R.A.; MOTA, R. A. Occurrence and risk factors assessment associated with *Mycoplasma gallisepticum* (MG) infection in chickens in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p.531-535, 2015.

DIAS, R. A. **Gubernatrix cristata**. pp. 536–537. In: Machado, A. B. M.; Drummond, G. M.; & Paglia, A. P. (eds). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: MMA/Fundação Biodiversitas, 2008.

EPSTEIN, P. R. Biodiversity, climate change and emerging infectious diseases. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. **Conservation medicine: ecological health in practice**. New York: Oxford University Press, p. 27-39, 2002.

FECCHIO, A.; MARINI, M.A; BRAGA, EM. M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no Cerrado do Brasil Central. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 02, p.127-135, 2007.

FECCHIO, A.; LIMA, M.R.; SILVEIRA, P.; BRAGA, EM; MARINI, MA. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. **Emu**, 111; 132-138. 2011.

FRIEND, M.; THOMAS, N. Disease prevention and control in endangered avian species: Special considerations and needs. **Acts Congressus Internationalis Ornithologici**, v. 20, p. 2331-2337, 1992.

GOMES, A.M.; COSTA, L.L.; VILELA, D.A.R.; MARQUES, M.V.R.; CARVALHAES, A.G.; MARIN, S.Y.; COSTA, M.P.; HORTA, R.S.; RESENDE, J.S.; MARTINS, N.R.S. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive

psittacines in Belo Horizonte, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.12, p. 75-78, 2010.

GRELLE, C.E.V.; PAGLIA, A.P.; SILVA, H.S. Análise dos fatores de Ameaça de Extinção: Estudo de caso com os Mamíferos Brasileiros. pp.385-398. In ROCHA, C.F.D., BERGALLO, H.G., SLUYS M.V., ALVES, M.A.S. **Biologia da Conservação: Essências**. Editora Rima, 582p, 2006.

HUBALEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds, **Journal of Wildlife Disease**, v. 40, p. 639-659, 2004.

IBF. Bioma Pampa. **Instituto Brasileiro de Florestas**. 2020. Disponível em: <<https://www.ibflorestas.org.br/bioma-pampa>>. Acesso em: 03/10/2021,

JARAMILLO A. 2019. Yellow Cardinal. In: del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J., Christie D.A. & de Juana E. (eds.). **Handbook of the birds of the world alive**. Barcelona: Lynx Editions. <https://www.hbw.com/node/62098> (Access on 22 April 2019).

LIMA, V.Y.; LANGONI, H.; SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; DE CASTRO, A.P.; DA SILVA, R.C.; ARAÚJO JR, J.P. Chlamydomphila psittaci and Toxoplasma gondii infection in pigeons (Columba livia) from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 9-14, 2011.

MANGINI, P. R.; SILVA, J. C. R. Medicina da Conservação: aspectos gerais. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p.1258-1268.

MARINI, M. A.; REINERT, B. L.; BORNSCHEIN, M. R.; PINTO, J. C.; PICHORIM, M. A. Ecological correlates of ectoparasitism on Atlantic Forest birds, Brazil. **Ararajuba**, v. 4, n. 2, p. 93-102, 1996.

MARTINS-FERREIRA, C.; BENCKE, G. A.; FONTANA, C. S.; DIAS, R. A.; REPENNING, M.; et al. **Plano de Ação Nacional para a conservação dos Passeriformes ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho**. Série espécies ameaçadas 31. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2013.

PEREIRA, R. J. G. Reprodução das Aves. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária**. 2a ed. São Paulo: Roca, 2014, p. 2235-2269

PACHECO et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee – second edition. **Ornithology Research**, v. 29, n. 2, 2021.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: Vida, 2001. 327 p.

RIDGELY, R. S. & TUDOR, G. **Field Guide To The Songbirds Of South America: The Passerines**. Austin: University of Texas Press, 2009.

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

SEBAIO, F.; BRAGA, E.M.; BRANQUINHO, F.; FECCHIO, A.; MARINI, M.A. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, 2012.

SICK, H. 1997. **Ornitologia Brasileira** 2nd ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira.

SILVA, JSA. et al. Newcastle Disease Virus Infection in Sparrows (*Passer domesticus*, Linneaus, 1758) Captured in Poultry Farms of the Agreste Region of the State of Pernambuco. **Braz. J. Poultry Sci.** 8:125-129, 2006.

SIBLEY, C. G.; MONROE B. L. **A supplement to distribution and taxonomy of birds of the world**. New Haven: Yale Univ. Press 112p. 1993. SIMPSON, V.R.; BEVAN, B. Chlamydia psittaci infection in robins. *Veterinary Record*, v. 125, p.536, 1989.

SIMPSON, B. **Import risk analysis: Passerine hatching eggs from the European Union**, Ministry of Agriculture and Forestry, TeManatu Ahuwhenua, Ngaherehere, Wellington, New Zealand, 2006, 246p.

SMITH, K.A.; CAMPBELL, C.T.; MURPHY, J.; STOBIERSKI, M.G.; TENGELSEN, L.A. Compendium of measures to control Chlamydophila psittaci infection among humans (Psittacosis) and pet birds (Avian Chlamydiosis), National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV). **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, p. 32-45, 2011.

SOUSA, E. **Pesquisa de agentes etiológicos patogênicos para galinhas de produção, em aves selvagens próximas às instalações avícolas**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado). FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SOUSA, E.; WERTHER, K.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Assessment of Newcastle and infectious bronchitis pathogens, and Salmonella spp. in wild birds captured near poultry facilities. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 219- 223, 2010.

SPENCER, K. A.; BUCHANAN, K. L.; LEITNER, S. Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 272, p.2037-2043. 2005.

TULLY JR T.N. Birds. In: MITCHELL, M.A., TULLY JR T.N. **Manual of exotic pet practice**. Saunders. pp. 250-298. 2009

2. CAPITULO 1. MOLECULAR DIAGNOSIS OF AVIAN VIRUSES IN GRASSLAND PASSERINES AND CAPTIVE YELLOW CARDINALS *Gubernatrix cristata* IN BRAZIL

ABSTRACT

Avian influenza viruses (AIVs), Newcastle disease virus (NDV), West Nile virus (WNV), adenovirus (AV) and herpesvirus (HV) play an important role in the health of human and animal populations. However, knowledge of the prevalence of these viruses in wild birds is restricted to some groups (e.g. shorebirds) or regions worldwide. Information on grassland birds of South America, which is essential for their conservation, is scarce. The objectives of the present study were to evaluate occurrences of AIV, NDV, WNV, AV and HV for the first time in a bird community of a unique protected area in southern Brazil, which is home for the critically endangered yellow cardinal (*Gubernatrix cristata*), and captive yellow cardinals from fauna maintainers of the Brazilian Captive Program of the Yellow Cardinal. Passerine species of wild life were caught, identified and samples (swabs) were collected from the oropharynx and cloaca of 64 passerines of 26 species (including 3 yellow cardinals) and 30 yellow cardinals of captive, for molecular diagnosis. The samples were subjected to RNA and DNA extraction and the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for AIV, NDV and WNV and nested PCR for AV and HV. One yellow cardinal of captive presented a positive result for AV, this result is important for planning, managing natural attributes and making decisions in relation to integrated conservation of threatened species. This is the first report of AV in yellow cardinal and epidemiological investigation of viruses in wild passerines of the Pampa biome, in Rio Grande do Sul, Brazil.

INDEX TERMS: molecular diagnosis, avian virus, passerines, yellow cardinals, *Gubernatrix cristata*, Brazil, conservation, pampa, sanitary profile, thornbush, threatened species, wildlife animals.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VÍRUS AVIÁRIOS EM PASSERIFORMES CAMPESTRES E CARDEAIS-AMARELOS *Gubernatrix cristata* CATIVOS NO BRASIL

RESUMO

Os vírus da gripe aviária (VGA), vírus da doença de Newcastle (VDN), vírus do Nilo Ocidental (VNO), adenovírus (AV) e herpesvírus (HV) desempenham um papel importante na saúde das populações humana e animal. No entanto, o conhecimento da prevalência desses vírus em aves selvagens é restrito a alguns grupos (por exemplo, aves limícolas) ou regiões em todo o mundo. As informações sobre as aves campestres da América do Sul, essenciais para a sua conservação, são escassas. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a ocorrência de VGA, VDN, VNO, AV e HV pela primeira vez em uma comunidade de aves de uma área única protegida no Sul do Brasil, que abriga o cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) criticamente ameaçado de extinção e em cardeais-amarelos de cativeiro dos mantenedores de fauna do Programa Brasileiro de Cativeiro do Cardeal-amarelo. Espécies de passeriformes silvestres foram capturadas, identificadas e amostras (swabs) foram coletadas da orofaringe e cloaca de 64 passeriformes de 26 espécies (incluindo 3 cardeais-amarelos) e 30 cardeais-amarelos de cativeiro, para diagnóstico molecular. As amostras foram submetidas à extração de RNA e DNA e à reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para VGA, VDN e VNO e nested PCR para AV e HV. Um cardeal-amarelo de cativeiro apresentou resultado positivo para AV, este resultado é importante para o planejamento, manejo dos atributos naturais e tomada de decisões em relação à conservação integrada de espécies ameaçadas. Este é o primeiro relato de AV em cardeal-amarelo e de investigação epidemiológica de vírus em passeriformes silvestres do bioma Pampa, no Rio Grande do Sul, Brasil.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: diagnóstico molecular, vírus aviário, passeriformes, cardeal-amarelo, *Gubernatrix cristata*, Brasil, conservação, pampa, perfil sanitário, espinilho, espécies ameaçadas, animais selvagens.

2.1 INTRODUCTION

Development of a health assessment database for threatened passerine species is essential in order to determine the health status of populations. Such database can act as reference for monitoring as well as for future evaluation of these birds. It can potentially also underpin management decisions (release, reintroduction and population reinvigoration), thus contributing towards conservation initiatives among threatened taxa (Kolesnikovas et al. 2012). The yellow cardinal, *Gubernatrix cristata*, is among the threatened passerines inhabiting the “Parque Estadual do Espinilho”, they are also found in the savannas of Argentina and Uruguay, however its natural history is relatively unknown (Jaramillo, 2020). In a study that monitored the population of the yellow cardinal, in all known areas of its presence in the Espinilho savanna, only 53 individuals were encountered (Beier et al. 2017). According to “Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade” (ICMBio), the tendency is the extinction of the species in Brazil if measures are not taken to curb capture and try to recover viable populations in the wild (Martins-Ferreira et al. 2013).

In the present study, five viruses, three important viruses with zoonotic potential and two avian infectious viruses were investigated among the grassland passerines in southern Brazil. The zoonotic viruses were: avian influenza viruses (AIVs), Newcastle disease virus (NDV), West Nile virus (WNV). The infectious agents investigated were: adenovirus (AV) and herpesvirus (HV).

Highly pathogenic subtypes of AIVs, family Orthomyxoviridae, have been responsible for endemic infections and outbreaks in many countries, causing the deaths of thousands of domestic and wild birds, along with significant economic losses (Kalthoff et al. 2010). The maintenance of AIV is dependent upon complex multiavian systems according to recent studies (Caron et al. 2017). With the exception of Antarctica, passerines have habitats worldwide and should be considered within the ecology of AIVs because many of them freely intermingle with wild and domestic populations of waterfowl and poultry (Urig et al. 2017). The illegal trade of wild birds has also been identified

as being an important role for spreading AIVs (Tian & Xu 2015). Different subtypes of AIV were recently identified in migratory birds at an important stopover area in southern Brazil. There are scarce studies and surveillance on occurrences of AIVs in South America and Brazil (Araujo et al. 2018).

One of the most important viruses of avian species globally is the NDV, that belongs to the family Paramyxoviridae. Based on genetic characteristics, NDV is divided into two classes; class I and class II. The strains of class I are predominantly isolated from wild birds, in most cases have low virulence, and rarely are identified in poultry species. Class II NDV is more phenotypically diverse and exhibit a wider range of virulence (Dimitrov et al. 2016). Class II are the most important viruses for the avian species globally, with outbreaks that potentially can cause substantial economic losses to the poultry industry (Lugarini et al. 2018). There is need to improve the current pathotyping systems of identification of class II NDV so it can be rapidly and precisely identified and controlled before causing severe devastation and loss in poultry (Bello et al. 2018). Previously, serological studies were performed on backyard poultry flocks located near one of the main routes for migratory birds in Brazil, in Rio Grande do Sul, detected a high number of farms with seropositive birds. This result indicated that NDV is circulating in this region and that there is a risk that it might spread to local wildlife and commercial flocks (Marks et al. 2014).

WNV, family Flavivirus, was recently described in horses and monkeys in the state of Espírito Santo, Brazil (Silva et al. 2018). The first description of a human case WNV encephalitis in this country was recorded in the state of Piauí, northeast of Brazil, in 2014. Since birds are reservoirs of this virus, monitoring and investigating its presence in wild bird populations is crucial (Vieira et al. 2015a).

Investigation of the Adenoviruses and Herpesviruses that respectively belong to the families Adenoviridae and Herpesviridae were also performed in the present study. AVs are common infectious agents in poultry and wild birds worldwide. In a recent research, samples were collected from birds that belonged to different states in Brazil, the birds analyzed presented with hepatitis-hydropericardium syndrome (HHS), malabsorption syndrome and

runting-stunting syndrome, as a result of the investigation many were identified positive to AV (De la Torre et al. 2018). Of the 12 serotypes of fowl AVs reported, most of them are able to cause inclusion body hepatitis and represent a significant risk because may contribute to increased mortality rates (Absalón et al. 2017). Herpesviruses (HVs) cause a broad variety of diseases with distinct clinical presentations and lesions in birds. Recent studies that evaluated different seabird species sampled in coastal areas of the South Atlantic reported occurrences of outbreaks of HV in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) and in an Atlantic yellow-nosed albatross (*Thalassarche chlororhynchos*) at a rehabilitation center located in Rio Grande do Sul (Niemeyer et al. 2017). With regard to conservation of threatened species, these diseases can cause adverse impacts on these populations. Brazil is the world's largest broiler meat exporter (Nääs et al. 2015) and occurrences of these viral diseases has a huge negative impact on the economy due to trade restrictions and embargoes.

Brazil harbors highly diverse avian communities that remain poorly studied in relation to these viruses. Out of the 1,919 species of birds recorded in Brazil, 198 (10.3%) are migratory. Some partially migratory species are found in the Pampa biome (Somenzari et al. 2018). Further surveillance efforts to detect these and other avian-borne viruses are necessary, particularly in areas of high avian diversity and endemism (Lugarini et al. 2018).

Considering the absence of information on the circulation of AIV, NDV, WNV, AV and HV among the captive yellow cardinals and wild passerines that are found in the Pampa biome, the aim of the present study was to evaluate the occurrence of these viruses in passerines that inhabit these areas of unique and important vegetation as well as the endangered yellow cardinals of the Captive Program of the Yellow Cardinal.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Ethics committee

This study was approved by the Ethics Committee of the “Universidade Federal do Paraná” (UFPR, approval number 038/2018) and by the authorization and biodiversity information system (SISBio) (no. 53935) of the “Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade” (ICMBio).

2.2.2 Study area

Part of the study was developed with wild life passerines and was carried out in the “Parque Estadual do Espinilho” Protected Area (30°12' S; 57°30' W), which is located in the city of Barra do Quaraí, westernmost of Rio Grande do Sul state, Brazil. The Park has the largest area of savanna among the last remnants of this type of vegetation formation in southern Brazil. This vegetation type is associated with the Pampa biome and is composed predominantly by *Prosopis affinis* (local name: inhanduvá) and *Vachellia caven* (local name: espinilho) (Marchiori & Alves 2011). Currently, 15 species of passerines encountered in the southern grassland and thornbush terrains are endangered, including the *Gubernatrix cristata*. Loss and degradation of these habitats are the main factors that have caused reductions in the populations of the grassland birds, which is also correlated with trafficking, hunting and introduction of exotic species and diseases (Martins-Ferreira et al. 2013).

The other part of the study was held with captive yellow cardinals and carried out with fauna maintainers linked to the Captive Program of the Yellow Cardinal, in the municipalities of Foz do Iguaçu, Pomerode and Gramado, in Brazil. The Yellow Cardinal Captivity Program aims to establish viable captive populations representative in Brazil to contemplate programs of reinvigoration and reintroduction.

2.2.3 Passerines

Passerines of wild life were captured during two field expeditions in the months February and December of 2019. Throughout the February expedition, 62 passerines including one yellow cardinal were captured and in the second expedition two yellow cardinals were captured. In total 64 passerines of wild life were evaluated in this study. To capture the passerines mist nets were used

(16mm mesh) of 12m long and 2.5m height at three capture points. Mist nets were reviewed every 20 minutes and the birds captured were placed for a few minutes in individual containment bags for manipulation (biological material collection and banding). The species were identified based on a field guide (Azpiroz 2012). They were immediately released after handling. To capture specimens of the critically endangered yellow cardinal (*G. cristata*), an active search was performed in the study area using the playback method (i.e. attracting the species using its own song) to attract the individuals. The status of threat of the species follows the Red Book of Brazilian Fauna Threatened with Extinction (ICMBio 2018). The sixty-four (64) individuals of wild life captured belonged to 26 different species of passerines: *G. cristata* (3), *Cranioleuca pyrrhophia* (1), *Drymornis bridgesii* (1), *Lepidocolaptes angustirostris* (1), *Progne tapera* (1), *Pseudoseisura lophotes* (1), *Schoeniophylax phryganophilus* (1), *Saltator aurantirostris* (1), *Sublegatus modestus* (1), *Turdus amaurochalinus* (1), *Tyrannus melancholicus* (1), *Coryphistera alaudina* (2), *Mimus saturninus* (2), *Molothrus rufoaxillaris* (2), *Serpophaga subcristata* (2), *Tangara sayaca* (2), *Troglodytes musculus* (2), *Agelaioides badius* (3), *Asthenes baeri* (3), *Pyrocephalus rubinus* (3), *Pitangus sulphuratus* (3), *Polioptila dumicola* (4), *Sicalis flaveola* (4), *Paroaria coronata* (5), *Furnarius rufus* (6) and *Zonotrichia capensis* (8).

In addition to the wild life passerines, 30 yellow cardinals of captive that were maintained by registered fauna maintainers of the Yellow Cardinal Captivity Program were evaluated in the study. These passerines were; 17 from Parque das Aves, seven from GramadoZoo and six from Zoo Pomerode, all located in south Brazil.

2.2.4 Sample collection

Samples from the cloaca and oropharynx were collected from the evaluated birds using sterile swabs and disposable gloves without chalk. These samples were placed in cryovials containing phosphate-buffered saline (PBS), glycerol, antibiotic and antifungal media, in accordance with the protocol described in the World Health Organization's manual for diagnosis and surveillance of animal influenza (Webster et al. 2002). The cryovials containing

the samples were frozen in liquid nitrogen immediately after sample collection and were kept frozen until the time of the analysis. The analyses were done at the Biosafety Level 3⁺ Laboratory (BSL3⁺) of the “Instituto de Ciências Biomédicas”, “Universidade de São Paulo” (USP).

2.2.5 RNA and DNA extraction

For RNA and DNA extraction, 300µL of cloacal and oropharyngeal swab samples were used in the MagMAX™ CORE Nucleic Acid commercial purification kit (Life Technologies Corporation, Austin/TX, USA). The entire extraction process was performed on automated equipment (MagMAX™ Express 96, Applied Biosystems), in accordance with the manufacturer's instructions.

2.2.6 Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Positive and negative controls were used in each reaction (Table 1). Positive samples previously tested and sequenced in Clinical and Molecular Virology Laboratory were used as positive controls and for negative control we used ultrapure DNase/RNase free water.

For detection of AIV, NDV and WNV, the samples were subjected to a one-step RT-PCR reaction using 8.63µL of extracted RNA (for this, the following were added: 12.5µL of 2x RT-PCR buffer, 1.2µL of 25x AIV-M primer/probe mix, 1.0µL of 25x RT-PCR enzymes and 1.67µL of detector enhancer (Applied Biosystems, Foster City/CA, USA), totaling 25µL of final reaction volume for AIV (Araujo et al. 2014). For both NDV and WNV, the same methodology as described above for AIV was used with the following alterations: for NDV, the primers and probes already described were used, and the reaction was performed as a multiplex for NDV classes I and II (Kim et al. 2008); for WNV, the specific primers and probes previously described (Ometto et al. 2013) were used.

The conditions were the same for all viruses, i.e. 45°C for 20 minutes (reverse transcription), followed by 95°C for 10 min and then 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 56°C for 45 seconds. To make readings and collect data,

the 7300 Real Time PCR System[®] equipment was utilized (Applied Biosystems, Foster City/CA, USA).

TABLE 1. COMPLETE INFORMATION ABOUT PRIMERS, SIZE OF AMPLICON, TARGETED GENES AND REFERENCES FOR EACH ASSAY

Virus / viral family	Oligo nucleotide	Sequence (5'-3')	Amplicon size	Target gene	Reference
Adenovirus	FLTR	5' - TIMGNNGGIGGIMGNTGYTAYCC - 3'	550 pb	Polymerase gene	Wellehan et al, 2004
	RTR	5'- GTDGCRAAISHICRTABARIGMR TT - 3'			
	FNR	5' - GTITWYGAYATHTGYGGHATGTAYGC - 3'	320 pb		
	RNR	5'- CCAICCBDRTRTRTGIARIGTRA - 3'			
AIV	AIV Fwd	5' - GACCRATCCTGTCACCTCTGAC - 3'	~ 99 pb	Matrix gene	Araújo et al, 2014
	AIV Rv	5' - AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA - 3'			
	AIV probe	5'- FAM-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-BHQ1-3'			
NDV	Sense L+8738	5' - TGTTGAAAAGAAGCTGCTAGGC - 3'	108 pb	Polymerase (L Gene)	Kim, Suarez & Afonso., 2008
	Antisense L-8847	5' - TGGACCATGAAGAGTGGAAACC - 3'			
	L-TET Probe	5'-[TET]TGCCCTGGTCACACAAGATCCGCCG[3BHQ_1]-3'			
WNV	SEQ1F	5'- GCGATCTCTCCACCAAAGCT - 3'	68 pb	Gene E (Viral envelope)	Ometto et al., 2013
	SEQ1R	5' -TGGGTCAGCACGTTTGTCAT - 3'			
	SEQ1M1 Probe	5' - FAM-CCATGGGAGAAGCTCACA-5-NFQ - 3'			
Herpesvirus	TS-TERM_707s	5' – TTGTGGACGAGRSIMAYTTYAT - 3'	519 pb	Terminase gene	Chmielewicz et al, 2001
	TS-TERM_707as	5'- ACAGCCACGCCNGTICCIGAIGC - 3'			
	TS-TERM_708s	5' - GCAAGATCATNTTYRTITCIT C - 3'	419 pb		
	TS-TERM_708as	5'- TGTTGGTCGTRWAIGCIGGRT - 3'			
Herpesvirus	DFA	5' - GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC - 3'	700-800 pb	Polymerase (pol) Gene	Van DeVanter et al., 1996
	ILK	5' - TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA - 3'			
	KG1	5' - GTCTTGCTCACCAGNTCNCANCCYTT - 3'			
	TGV	5' - TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYCAN GNGT - 3'	215-315 pb		
	IYG	5' - CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT - 3'			

2.2.7 Nested PCR

To detect AV and HV, the samples were subjected to nested PCR reactions. DNA amplification was performed using 5 μ L of DNA, 50mM of KCl and, 1.5mM of MgCl₂ as the PCR buffer (Invitrogen[®], Carlsbad/CA, USA), together with 50pmol of each primer, 2.5U of Taq DNA polymerase (Invitrogen[®], Carlsbad/CA, USA), 0.2mM of each dNTP and DEPEC-treated MilliQ water q.s. 100 μ l. The samples were amplified in the GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems[®], Foster City/CA, USA).

Amplification for HV was performed starting with a 95°C step for 5 minutes, followed by 45 cycles of 96°C for 5 seconds, 46°C for 8 seconds and 68°C for 12 seconds, and ending with 72°C for 2 minutes. The next step was to perform nested PCR, following the same description mentioned above. A protocol previously described (VanDevanter et al. 1996) was performed using the primers DFA, ILK and KG1 for PCR, and IGV and IYG for nested PCR. In addition, the protocol designated (Chmielewicz et al. 2001) was executed using the primers 707s and 707as for PCR, and 708s and 708as for nested PCR.

DNA amplification for AV was achieved starting with 95°C for 10 minutes; followed by 14 cycles of 96°C for 30 seconds, 65°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute; then 35 cycles of 95°C per 30 seconds, 50°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute; and lastly a final extension of 70°C for 7 minutes. The next step was to complete the nested PCR, following the description from above, replacing the primers FLTR and RTR with FNR and RNR, as previously defined (Wellehan et al. 2004).

2.2.8 Agarose gel electrophoresis

Agarose gels at 2% concentration were produced and added to 2.5 μ L of ethidium bromide. In the last pool of each gel line, 2 μ L of molecular weight marker were applied (DNA ladder; 0.25 μ g/ μ L); and in the other pools, 10 μ L of sample with 3 μ L of loading buffer 1X were applied. The gels were electrophoresed at 100 volts for approximately 50 minutes. The samples that presented bands in the nested reaction were considered to be suspected positive samples that would then need to be confirmed by sequencing.

2.2.9 Purification, Sequencing and Phylogenetic Analysis

The positive amplification fragment for AV was purified using Exo-SAP and then the sample was sent to Sanger Sequencing. The sequencing reaction was performed using BigDye kit following manufactures recommendations. To remove the excess dideoxynucleotide terminators with Applied Biosystems Big Dye X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City/CA) in accordance with the manufacturer's recommendations.

The nucleotide sequences obtained were analyzed using the BLAST program to confirm amplification of the specific product and the sequences were aligned using Geneious software (version Prime). Phylogenetic analyses were performed using MEGA7 software (version 7.0.2) using Maximum Likelihood (ML) with Neighbor-Joining (NJ) and GTR+I+G model.

2.2.10 Sequence submission

The sequence was submitted to GenBank under accession number NM602948.

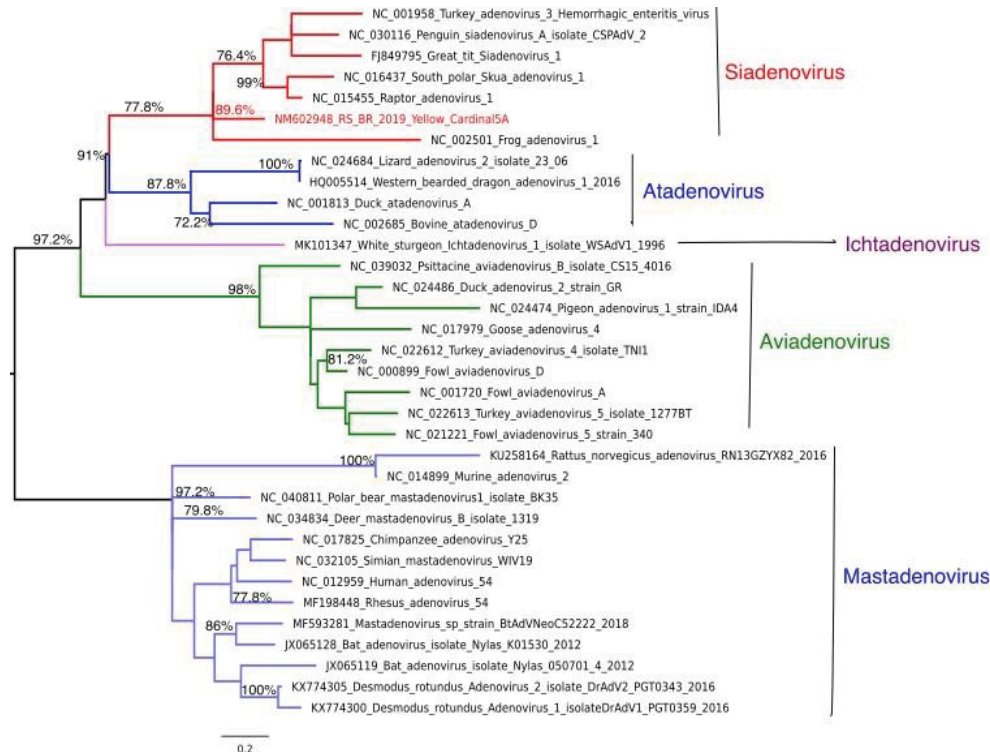
2.3 RESULTS

We studied 94 passerines cloacal and oropharynx samples, of which 64 were of wild life from the "Parque Estadual do Espinilho" and 30 were captive yellow cardinals that belonged to three different fauna maintainers from Brazil. All samples were submitted to AIV, NDV, WNV, AV and HV molecular analysis.

The 64 wild passerines evaluated in the present study were negative for all viruses evaluated according to molecular detection. Among 30 captive yellow cardinals analyzed there was one positive result for AV, this sample was collected on June 7 of 2019. After processing, the sample segregated as Siadenovirus clade (Fig.1), other sequences of this virus were previously isolated from different species such as raptor, south polar skua, great tit, penguin and turkey.

The negative results obtained in the present study are highly relevant because no other similar researches have been performed in this area providing information about the status of relevant viruses between passerines species of wild and captive.

Fig.1. Phylogenetic tree of 240 nucleotide polymerase gene. Sequence obtained in this study was highlighted in red. Molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood (ML) method. The evolutionary history was inferred by using the ML method based on the General Time Reversible model (GTR). Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying neighbor-join (NJ) and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories+G). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions with less than 95% site coverage were eliminated. The bootstrap value under 75% was suppressed. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7



2.4 DISCUSSION

No previous study was found reporting any adenovirus in yellow cardinals and the epidemiological role of this virus remains unknown. Siadenoviruses was previously found in birds (Pitcovski et al. 1998), tortoises (Rivera et al. 2009). In the past it was named as Group II aviadenoviruses, the genus Siadenovirus contains clinically relevant viruses; which includes the hemorrhagic enteritis virus (HEV) of turkey and marble spleen disease virus of pheasants (Dhama et al. 2017, Fitzgerald & Reed 1989). Siadenovirus was identified in two psittacines that clinically presented weight loss and lethargy, which are non-specific clinical signs, significant clinical differences exist between adenoviral types and species (Wellehan Jr et al. 2009). Raptors infected with siadenovirus presented severe necrotizing hepatitis with intranuclear inclusion bodies in kidneys and spleen (Zsivanovits et al. 2006). Recent studies conducted an ecoepidemiological analysis on bird and mammal in the Brazilian Cerrado biome using a primer based on the amino acid sequence of the hexon protein, with approximately 900 pairs and they were able to detect AV in a passerine species (*Sicalis flaveola*) (Duarte et al. 2019). They also used a primer for the conserved polymerase region, as was performed in the present study.

Some species of AV can induce mortality as a primary agent in the absence of other infections or immunosuppression, and it can cause hydropericardium and hepatitis syndrome (HHS) (Mazaheri et al. 1998, Vera-Hernández et al. 2016). HHS is a severe disease that causes mortality up to 100% in unvaccinated birds (Asthana et al. 2013, Vera-Hernández et al. 2016). If an infectious disease is introduced into a captive population of an endangered species it can be difficult or even impossible to control (Meli et al. 2009). The introduction of uncommon pathogens in a wild population can be very dangerous to their viability (Walker et al. 2008).

Despite having only one positive result for the investigation, this does not rule out the possibility of the circulation of AV and other viruses in the researched region, because the prevalence of them may vary temporally.

In South America, AIV has already been detected in birds in Brazil, Argentina, Bolivia, Colombia, Chile and Peru. In 2002, there was an outbreak of highly pathogenic AIV in commercial poultry in Chile (Hurtado & Vanstreels 2016). In Brazil, AIV of low pathogenic level was detected via PCR in migratory birds in the Amazon region, and serologically positive animals were detected in the state of São Paulo (Araujo et al. 2014, Sousa et al. 2013). Although Brazil is considered to be free from highly pathogenic AIV, further studies are urgently needed in order to evaluate the susceptibility of infections across different orders and families of South American birds.

NDV has been reported in Brazil, in captive ducks in the northern region and in free-living Charadriiformes on the northeastern coast, this study tested 1022 domestic and wild birds reporting the presence of NDV in 0,7% of the birds (Thomazelli et al. 2012). However, no positive results were found in the present study.

No presence of WNV has yet been detected in birds in Brazil. Among serum samples from five common terns (*Sterna hirundo*) in Rio Grande do Sul, three of them were found to be positive according to the ELISA technique. However, the plaque reduction neutralization test did not confirm these findings (Ometto et al. 2013). Nonetheless, WNV has been detected in humans in Brazil (Vieira et al. 2015b). Given that this virus is maintained in nature in passerines, and that they can develop sufficient viremia to infect the mosquitoes that feed on them, these birds are competent amplifying hosts and need to be monitored.

This is the first report of AV in yellow cardinal and investigation of AIV, NDV, WNV, AV and HV in two critically endangered passerine species: the yellow cardinal (*Gubernatrix cristata*) and lark-like brushrunner (*Coryphistera alaudina*). However, monitoring pathogens in wild birds has limitations and caution is warranted when making a larger scale projection about current or future distribution based on a small sample size in a specific location (Van Hemert et al. 2019).

2.5 CONCLUSION

In the present study one yellow cardinal of captive was positive to adenovirus (AV) meanwhile, avian influenza viruses (AIVs), Newcastle disease virus (NDV), West Nile virus (WNV), and herpesvirus (HV) were not detected in the other 93 passerines evaluated. This is an important result because it provides information on the health situation of these wild and captive grassland passerines of south Brazil for the first time and is primordial for the conservation of species, more specifically the critically endangered yellow cardinal.

REFERENCES

- Absalón A.E., Morales-Garzón A., Vera-Hernández P.F., Cortés-Espinosa D.V., Uribe-Ochoa S.M., García L.J. & Lucio-Decanini E. 2017. Complete genome sequence of a non-pathogenic strain of Fowl Adenovirus serotype 11: minimal genomic differences between pathogenic and nonpathogenic viruses. *Virology* 501:63-69. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.006>> <PMid:27865971>
- Araujo J., Azevedo Júnior S.M., Gaidet N., Hurtado R., Walker D., Thomazelli L.M., Ometto T., Seixas M.M.M., Rodrigues R., Galindo D.B., Silva A.C.S., Rodrigues A.M.M., Bomfim L.L., Mota M.A., Larrazábal M.E., Branco J.O., Serafini P., Neto I.S., Franks J., Webby R.J., Webster R.G. & Durigon E.L. 2014. Avian influenza virus (H11N9) in migratory shorebirds wintering in the Amazon Region, Brazil. *PLoS One* 9(10):e110141. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0110141>> <PMid:25329399>
- Araujo J., Petry M.V., Fabrizio T., Walker D., Ometto T., Thomazelli L.M., Scherer A.L., Serafini P.P., Neto I.S., Krauss S., Webster R.G., Webby R.J. & Durigon E.L. 2018. Migratory birds in southern Brazil are a source of multiple avian influenza virus subtypes. *Influenza Other Respir. Viruses* 12(2):220231. <<https://dx.doi.org/10.1111/irv.12519>> <PMid:29143465>
- Asthana M., Chandra R. & Kumar R. 2013. Hydropericardium syndrome: current state and future developments. *Arch. Virol.* 158(5):921-931. <<https://dx.doi.org/10.1007/s00705-012-1570-x>> <PMid:23242777>
- Azpiroz A.B. 2012. *Aves de las Pampas y Campos de Argentina, Brasil y Uruguay: una guía de identificación*. Pressur, Nueva Helvecia, Uruguay.
- Beier, C., Repenning, M., Pereira, M., Pereira, A., & Fontana, C. (2017). Cooperative breeding and demography of Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata* in Brazil. *Revista Brasileira De Ornitologia - Brazilian Journal Of Ornithology*, 25(1), 12-19.

- Bello M.B., Yusoff K., Ideris A., Hair-Bejo M., Peeters B. & Omar A.R. 2018. Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle disease virus in poultry: the current and emerging perspectives. *BioMed Res. Int.* 2018(4):1-18. <<https://dx.doi.org/10.1155/2018/7278459>> <PMid:30175140>
- Caron A., Cappelle J. & Gaidet N. 2017. Challenging the conceptual framework of maintenance hosts for influenza A viruses in wild birds. *J. Appl. Ecol.* 54(3):681-690. <<https://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.12839>>
- Chmielewicz B., Goltz M. & Ehlers B. 2001. Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Res.* 75(1):87-94. <[https://dx.doi.org/10.1016/s0168-1702\(00\)00252-5](https://dx.doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00252-5)> <PMid:11311431>
- De la Torre D., Nuñez L., Santander Parra S.H., Astolfi-Ferreira C.S. & Piantino Ferreira A.J. 2018. Molecular characterization of fowl adenovirus group I in commercial broiler chickens in Brazil. *Virusdisease* 29(1):83-88. <<https://dx.doi.org/10.1007/s13337-018-0430-z>> <PMid:29607363>
- Dhama, K., V. Gowthaman, K. Karthik, R. Tiwari, S. Sachan, M. A.Kumar, M. Palanivelu, Y. S. Malik, R. K. Singh, and M. Munir. 2017. Haemorrhagic enteritis of turkeys – current knowledge. *Vet. Q.* 37:31–42.
- Dimitrov K.M., Ramey A.M., Qiu X., Bahl J. & Afonso C.L. 2016. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infect. Genet. Evol.* 39:22-34. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.008>> <PMid:26792710>
- Duarte M.A., Silva J.M.F., Brito C.R., Teixeira D.S., Melo F.L., Ribeiro B.M., Nagata T. & Campos F.S. 2019. Faecal virome analysis of wild animals from Brazil. *Viruses* 11(9):803-826. <<https://dx.doi.org/10.3390/v11090803>> <PMid:31480274>
- Fitzgerald, S.D., and W.M. Reed. 1989. A review of marble spleen disease of ring-necked pheasants. *J Wildlife Dis.* 25:455–461
- Hurtado R. & Vanstreels R.E.T. 2016. Avian influenza in wild birds from South America: review, implications and perspectives. *Explor. Res. Hypothesis Med.* 1(4):62-74. <<https://dx.doi.org/10.14218/ERHM.2016.00014>>
- ICMBio 2018. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Vol.1. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, DF.
- Jaramillo, A. 2020. Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*), version 1.0. In *Birds of the World* (J. del Hoyo, A. Elliott, J. Sargatal, D. A. Christie, and E. de Juana, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA.

Kalthoff D., Globig A. & Beer M. 2010. (Highly pathogenic) avian influenza as a zoonotic agent. *Vet. Microbiol.* 140(3/4):237-245. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.022>> <PMid:19782482>

Kim L.M., Suarez D.L. & Afonso C.L. 2008. Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(4):414-425. <doi: 10.1177/104063870802000402> <PMid:18599845>

Kolesnikovas C.K., Niemeyer C., Teixeira R.H., Nunes A.L., Rameh-de-Albuquerque L.C., Sant'Anna S.S. & Catão-Dias J.L. 2012. Hematologic and plasma biochemical values of Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *J. Avian Med. Surg.* 26(3):125-129. <<https://dx.doi.org/10.1647 / 2011-020r1.1>> <PMid:23156973>

Lugarini C., Hurtado R., Araujo J., Ometto T., Thomazelli L.M., Seixas M.M.M., Durigon E. & Silva J.C. 2018. Lack of Detection of Avian Influenza, Newcastle Disease, and West Nile Viruses in Wild Birds of Northeastern Brazil. *J. Wildl. Dis.* 54(2):422-425. <<https://dx.doi.org/10.7589/2017-09-218>> <PMid:29148889>

Marchiori J.N.C. & Alves F.S. 2011. O inhanduvá (*Prosopis affinis* Spreng.) no Rio Grande do Sul. 8 - Aspectos fitogeográficos. *Balduinia* (29):13-20. <<https://dx.doi.org/10.5902/2358198014133>>

Marks F.S., Rodenbusch C.R., Okino C.H., Hein H.E., Costa E.F., Machado G., Canal C.W., Bretano L. & Corbellini L.G. 2014. Targeted survey of Newcastle disease virus in backyard poultry flocks located in wintering site for migratory birds from Southern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 116(1/2):197-202. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.001>> <PMid:24958456>

Martins-Ferreira C., Bencke G.A., Fontana C.S., Dias R.A., Repenning M., Damiani R.V., Mauricio G.N., Gianuca A.T., Krügel M.M., Franz I., Rovedder C.E., Rupp A.E., Pereira M.S., Vizentin-Bugoni J., Joenck C.M., Straube F.C., Reinert B.L., Bornschein M.R., Dias D., Vieira B.P. & Serafini P.P. 2013. Plano de Ação Nacional para a conservação dos Passeriformes ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho. Série Espécies Ameaçadas 31, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Brasília, DF.

Mazaheri A., Prusas C., Voß M. & Hess M. 1998. Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens. *Avian Pathol.* 27(3):269-276. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079459808419335>> <PMid:18483997>

Meli M.L., Cattori V., Martínez F., López G., Vargas A., Simón M.A., Zorrilla I., Muñoz A., Palomares F., López-Bao J. V., Pastor J., Tandon R., Willi B., Hofmann-Lehmann R. & Lutz H. 2009. Feline leukemia virus and other

pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). PLoS One. 4(3):e4744. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004744>> <PMid:19270739>

Nääs I.A., Mollo Neto M., Canuto S., Waker R., Oliveira D. & Vendametto O. 2015. Brazilian chicken meat production chain: a 10-year overview. Braz. J. Poult. Sci. 17(1):87-94. <<https://dx.doi.org/10.1590/1516-635x170187-94>>

Niemeyer C., Favero C.M., Shivaprasad H.L., Uhart M., Musso C.M., Rago M.V., Silva-Filho R.P., Canabarro P.L., Craig M.I., Olivera V., Pereda A., Brandão P.E. & Catão-Dias J.L. 2017. Genetically diverse herpesviruses in South American Atlantic coast seabirds. PLoS One. 12(6):e0178811. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0178811>> <PMid:28575104>

Ometto T., Durigon E.L., Araujo J., Aprelon R., Aguiar D.M., Cavalcante G.T., Melo R.M., Levi J.E., Azevedo Júnior S.M., Petry M.V., Simão Neto I., Serafini P., Villalobos E., Cunha E.M.S., Lara M.C.C.S.H., Nava A.F.D., Nardi M.S., Hurtado R., Rodrigues R., Sherer A.L., Shererh J.F.M., Geraldi M.P., Seixas M.M.M., Peterka C., Bandeira D.S., Pradel J., Vachier N., Labruna M.B., Camargo L.M.A., Lanciotti R. & Lefrançois T. 2013. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 107(11):723-730. <<https://dx.doi.org/10.1093/trstmh/trt081>> <PMid:24008895>

Pitcovski, J., D. Goldberg, B. Z. Levi, D. Di-Castro, A. Azriel, S. Krispel, T. Maray, and Y. Shaaltiel, 1998. Coding region of segment A sequence of a very virulent isolate of IBDV— Comparison with isolates from different countries and virulence. Avian Dis. 42:497–506

Rivera, S., Jr, J. F. X. W., Mcmanamon, R., Innis, C. J., Garner, M. M., Raphael, B. L., Gregory, C. R., Latimer, K. S., Rodriguez, C. E., Diaz-figueroa, O., Marlar, A. B., Nyaoke, A., Gates, A. E., Gilbert, K., Childress, A. L., Risatti, G. R., & Jr, S. F. (2009). Systemic Adenovirus Infection in Sulawesi Tortoises (*Indotestudo Forsteni*) Caused by a Novel Siadenovirus. June 2014. <https://doi.org/10.1177/104063870902100402>

Silva A.S.G., Matos A.C.D., Cunha M.A.C.R., Rehfeld I., Galinari G.C.F., Marcelino S.A.C., Saraiva L.H.G., Martins N.R.S., Maranhão R.P.A., Lobato Z.I.P., Pierezan F., Guedes M.I.M.C. & Costa E.A. 2019. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. Transb. Emerg. Dis. 66(1):445-453. <<https://dx.doi.org/10.1111/tbed.13043>> <PMid:30318735>

Somenzari M., Amaral P.P., Cueto V.R., Guaraldo A.C., Jahn A.E., Lima D.M., Lugarini C., Machado C.G., Martinez J., Nascimento J.L.X., Pacheco J.F., Paludo D., Prestes N.P., Serafini P.P., Silveira L.F., Sousa A.E.B.A., Sousa N.A., Souza M.A., Telino-Júnio W.R. & Whitney B.M. 2018. An overview of

migratory birds in Brazil. *Papéis Avulsos Zool.* 58:e20185803. <<https://dx.doi.org/10.11606/1807-0205/2018.58.03>>

Sousa E., Costa T.P., Werther K., Dugon E.L., De Araujo J., Ferreira C. & Pinto A. 2013. Presence of antibodies against H5, H7 and H9 influenza A virus in wild birds in the state of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Poult. Sci.* 15(3):169-286. <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2013000300001>>

Thomazelli L.M., De Araujo J., Ferreira C.S., Hurtado R., Oliveira D.B.L., Ometto T., Golono M., Sanfilippo L., Demetrio C., Figueiredo M.L. & Durigon E.L. 2012. Molecular surveillance of the Newcastle disease virus in domestic and wild birds on the north eastern coast and amazon bioma of Brazil. *Braz. J. Poult. Sci.* 14(1):1-7. <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2012000100001>>

Tian H. & Xu B. 2015. Anthropogenic factors and societal response to challenges in the transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1). *Annals of GIS* 21(2):149-156. <<https://dx.doi.org/10.1080/19475683.2015.1027790>>

Urig H.E., Nolting J.M., Mathys D.A., Mathys B.A. & Bolman A. 2017. Influenza A Virus Surveillance in Underrepresented Avian Species in Ohio, USA, in 2015. *J. Wildl. Dis.* 53(2):402-404. <<https://dx.doi.org/10.7589/2016-05-106>> <PMid:28051568>

Van Hemert C., Meixell B.W., Smith M.M. & Handel C.M. 2019. Prevalence and diversity of avian blood parasites in a resident northern passerine. *Parasites Vectors* 12:292. <<https://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3545-1>>

VanDevanter D.R., Warren P., Bennett L., Schultz E.R., Couter S., Garber R.L. & Rose T.M. 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34(7):1666-1671. <<https://dx.doi.org/10.1128/JCM.34.7.1666-1671.1996>> <PMid:8784566>

Vera-Hernández P.F., Morales-Garzón A., Cortés-Espinosa D.V., Galiote-Flores A., García-Barrera L.J., Rodríguez-Galindo E.T., Toscano-Contreras A., Lucio-Decanini E.L. & Absalón A.E. 2016. Clinicopathological characterization and genomic sequence differences observed in a highly virulent fowl Aviadenvirus serotype 4. *Avian Pathol.* 45(1):73-81. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079457.2015.1125443>> <PMid:26610321>

Vieira M.A., Romano A.P.M., Borba A.S., Silva E.V.P., Chiang J.O., Eulálio K.D., Azevedo R.S.S., Rodrigues S.G., Almeida-Neto W.S. & Vasconcelos P.F.C. 2015a. West Nile virus encephalitis: the first human case recorded in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93(2):377-379. <<https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0170>> <PMid:26055749>

Vieira M.A.C.S., Aguiar A.A.X., Borba A.S., Guimarães H.C.L., Eulálio K.D., Albuquerque Neto L.L. & Lima O.B. 2015b. West Nile fever in Brazil: sporadic case, silent endemic disease or epidemic in its initial stages? *Revta Inst. Med. Trop. S. Paulo* 57(3):276. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000300017>>

Walker S.F., Bosch J., James T.Y., Litvintseva A.P., Oliver Valls J.A., Piña S., García G., Rosa G.A., Cunningham A.A., Hole S., Griffiths R. & Fisher M.C. 2008. Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Curr. Biol.* 18(18):R853-R854. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.033>>

Webster R., Cox N. & Stöhr K. 2002. Manual on animal influenza diagnosis and Surveillance Global Influenza Programme. World Health Organization, Geneva. 99p.

Wellehan J.F., Johnson A.J., Harrach B., Benkö M., Pessier A., Johnson C.M., Garner M.M., Childress A. & Jacobson E.R. 2004. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J. Virol.* 78(23):13366-13369. <<https://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.23.13366-13369.2004>> <PMid:15542689>

Wellehan Jr J.F., Greenacre C.B., Fleming G.J., Stetter M.D., Childress A.L. & Terrell S.P. 2009. Siadenovirus infection in two psittacine bird species. *Avian Pathol.* 38(5):413-417. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079450903183660>> <PMid:19937528>

Zsivanovits P., Monks D.M., Forbes N.A., Ursu K., Raue R. & Benkö M. 2006. Presumptive identification of a novel adenovirus in a Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*), a Bengal eagle owl (*Bubo bengalensis*), and a Verreaux's eagle owl (*Bubo lacteus*). *J. Avian Med. Surg.* 20(2):105-112. <<https://dx.doi.org/10.1647/2005-008.1>>

3. CAPÍTULO 2. BLOOD PARASITES OF PASSERINES IN THE BRAZILIAN PAMPAS AND THEIR IMPLICATIONS FOR A POTENTIAL POPULATION SUPPLEMENTATION PROGRAM FOR THE ENDANGERED YELLOW CARDINAL (*Gubernatrix cristata*)

ABSTRACT

Espinilho savanna (“seasonal steppe savanna”) is a unique vegetation formation of the Pampas biome that is found near the tri-border of Brazil, Uruguay and Argentina. The Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*) is a flagship species of this ecosystem, but it is classified as “critically endangered” in Brazil due to habitat loss and poaching for the illegal trade. Population supplementation through the release of individuals that were captive-bred or apprehended by authorities from the illegal trade has been considered as a conservation strategy for this species, however the risk of pathogen introduction is a critical concern. We used microscopy and molecular methods to investigate the occurrence of blood parasites in wild passerines (n=64, including three Yellow Cardinals) at Espinilho State Park, Rio Grande do Sul, Brazil, and in captive Yellow Cardinals (n=30) at three facilities in Brazil. Haemosporidian parasites were detected in the blood smears of 10.9% of the wild passerines, comprising the morphospecies *Haemoproteus erythrogravidus* in Rufous-collared Sparrow (*Zonotrichia capensis*), *H. quiscalus* in Grayish Baywing (*Agelaioides badius*), and *H. tyranni* in Great Kiskadee (*Pitangus sulphuratus*); these are the southernmost records for these morphospecies, and their first record for the Pampas biome. No haemosporidian parasites were detected in the blood smears of Yellow Cardinals, wild or captive. Microfilariae were detected in the blood smears of 14.1% of the wild passerines, including all wild Yellow Cardinals, and in 43.3% of captive Yellow Cardinals. *Trypanosoma* sp. was detected in the blood smear of one captive Yellow Cardinal. Nested PCR and gene sequencing of the *cyt-b* gene of *Haemoproteus/Plasmodium* was used to test a subset of wild passerines and captive Yellow Cardinals, allowing for the molecular barcoding of *H. quiscalus* lineage AGEBAD04 and *H. tyranni* lineage PITSUL01; additionally, DNA identical to that of lineage PITSUL01 was detected in the blood of one captive Yellow Cardinal. This study provides

valuable data to support conservation management of the Yellow Cardinal and other threatened passerines from the Pampas, and highlights the need for further studies on the epidemiology and pathology of filarioid worms and trypanosomes in passerines from this biome

Key words: Haemosporida, Neotropics, Pampas, Passeriformes, Rhabditida, Trypanosomatida

RESUMO

HEMOPARASITAS DE PASSERIFORMES NO PAMPA BRASILEIRO E SUAS IMPLICAÇÕES PARA UM POTENCIAL PROGRAMA DE SUPLEMENTAÇÃO POPULACIONAL PARA O AMEAÇADO CARDEAL-AMARELO (*Gubernatrix cristata*)

A savana do Espinilho (“savana de estepe sazonal”) é uma formação vegetal única do bioma Pampa que se encontra próxima à tríplice fronteira entre Brasil, Uruguai e Argentina. O cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) é uma espécie emblemática desse ecossistema, mas é classificada como “criticamente ameaçada” no Brasil devido à perda de habitat e à caça furtiva para o comércio ilegal. Suplementação da população através da liberação de indivíduos criados em cativeiro ou apreendidos por autoridades do comércio ilegal tem sido considerado uma estratégia de conservação para esta espécie, porém o risco de introdução de patógenos é uma preocupação crítica. Usamos microscopia e métodos moleculares para investigar a ocorrência de hemoparasitas em passeriformes selvagens (n=64, incluindo três cardeais-amarelos) no Parque Estadual do Espinilho, Rio Grande do Sul, Brasil, e em cardeais-amarelos cativos (n=30) em três instalações no Brasil. Parasitas hemosporídeos foram detectados nos esfregaços de sangue de 10,9% dos passeriformes selvagens, compreendendo a morfoespécie *Haemoproteus erythrogravidus* em Tico-tico (*Zonotrichia capensis*), *H. quisqualis* em Asa-de-telha-escuro (*Agelaioides badius*), e *H. tyranni* em Bem-te-vi (*Pitangus sulphuratus*); estes são os registros mais ao sul para essas morfoespécies, e

seus primeiros registros para o bioma Pampa. Não foram detectados parasitas hemosporídeos nos esfregaços de sangue de cardeais-amarelos, selvagens ou de cativo. A presença de microfilárias foi de 14,1% nos passeriformes selvagens, incluindo todos os cardeais-amarelos selvagens, e 43,3% em cardeais-amarelos cativos. Um cardeal-amarelo cativo estava parasitado por *Trypanosoma* sp., que foi detectado no esfregaço sanguíneo. A PCR aninhada e o sequenciamento do gene *cyt-b* de *Haemoproteus/Plasmodium* foram usados para testar um subconjunto de passeriformes selvagens e cardeais-amarelos cativos, permitindo o código de barras molecular da linhagem de *H. quiscalus* AGEBAD04 e da linhagem de *H. tyranni* PITSUL01; adicionalmente, DNA idêntico ao da linhagem PITSUL01 foi detectado no sangue de um cardeal-amarelo cativo. Este estudo fornece dados valiosos para apoiar o manejo de conservação do cardeal-amarelo e outros passeriformes ameaçados do Pampa, e destaca a necessidade de mais estudos sobre a epidemiologia e patologia de vermes filarioides e tripanossomas em passeriformes deste bioma

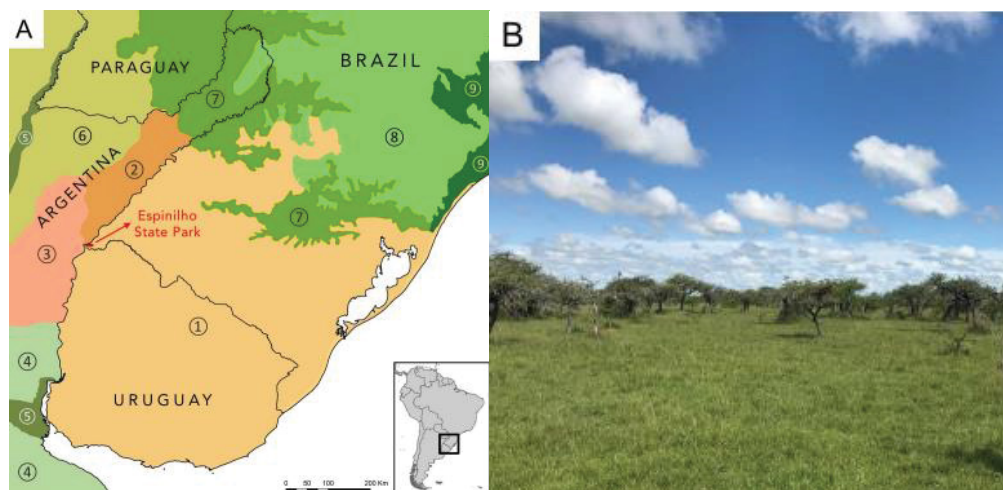
Palavras-chave: Haemosporida, Neotrópicos, Pampas, Passeriformes, Rhabditida, Trypanosomatida.

3.1 INTRODUCTION

Brazil has one of the world's greatest bird diversities in the world, with 1,971 described species (Piacentini et al. 2015). Of these, 234 species are nationally threatened, 15 of which are passerines of the Pampas biome in Brazil (ICMBio 2018). The Pampas biome comprises temperate fertile lowlands in Uruguay, southern Brazil and eastern Argentina. Espinilho State Park, located in southern Brazil near the tri-border of Brazil, Uruguay and Argentina (Fig. 1 A), has the largest remnant of the Espinilho savanna, also known as "seasonal steppe savanna" (Serafini 2013; Marchiori and Alves 2014). Espinilho savanna is a unique vegetation formation that occurs only in the transition of the Uruguayan savanna, the Southern Cone Mesopotamian savanna and the Espinal eco-regions (Fig. 1 B), and is predominantly composed of short thorny

trees such as *Prosopis affinis* (“inhanduvá”), *Acacia caven* (“espinilho”) and *Prosopis nigra* (“algarrobo”) (Serafini 2013; Marchiori and Alves 2014). This landscape is an important habitat for passerine birds and, like the remainder of the Pampas biome, is highly sensitive to anthropogenic pressures from the expansion of grain monocultures, livestock production and silviculture with exotic species (Serafini 2013; ICMBio 2018).

FIGURE 1. GEOGRAPHIC LOCATION (A) AND PHYTOPHYSIOGNOMY (B) OF ESPINILHO STATE PARK, BRAZIL. ECO-REGIONS: (1) URUGUAYAN SAVANNA, (2) SOUTHERN CONE MESOPOTAMIAN SAVANNA, (3) ESPINAL, (4) HUMID PAMPAS, (5) PARANÁ FLOODED FOREST, (6) HUMID CHACO, (7) ALTO PARANÁ ATLANTIC FOREST, (8) ARAUCARIA MOIST FOREST, (9) SERRA DO MAR COASTAL FOREST (ADAPTED FROM OLSON et al. 2001).



The Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*) is a flagship species of the Espinilho savanna. The species is also found in the savannas of Argentina and Uruguay, however its natural history is relatively unknown (Jaramillo 2020). Due to their color and song, they are often captured in wildlife to be illegally traded (Martins-Ferreira and Freitas 2010), which is one of the leading causes of this species population decline, along with habitat loss. As a result, the species is now globally “endangered” (BirdLife International 2022) and “critically endangered” in Brazil (ICMBio 2018). A recent population survey of Yellow Cardinals revealed that only 53 individuals remain in the species’ entire

distribution within the Espinilho savanna in Brazil (Beier et al. 2017). In this context, the National Plan of Action for the Conservation of Endangered Grassland Birds of Brazil has considered the population supplementation through the release of Yellow Cardinals that were captive-bred or apprehended by authorities from the illegal trade an essential intervention to avoid the local extinction of this species (Serafini 2013).

Blood parasites can cause serious infection and eventually cause death of their host or may have sublethal effects such as compromising sexual selection, parental care, or the ability to avoid predators (Valkiūnas et al. 2006; de Castaneda et al. 2009; Ellis et al. 2020). Haemosporidian protozoa (Apicomplexa: Haemosporida) are among the most frequent blood parasites of birds, comprising the genera *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Fallisia* (Valkiūnas 2005). Microfilariae are also relatively frequent among passerines; these are immature forms of filarioid nematodes (Nematoda: Rhabditida) that enter the bloodstream and become available for ingestion by hematophagous invertebrates (Bartlett 2008). *Trypanosoma* spp. (Euglenozoa: Trypanosomatida) are another group of relatively common blood parasite of passerines, but their taxonomy and pathogenicity to birds remain unclear (Hamilton et al. 2007; Zídková et al. 2012).

Considering the potential immediate and long-term effects that blood parasites can have on the health of birds, knowledge about the prevalence and diversity of parasites and pathogens in the recipient avian community and in individual release candidates will be essential to prevent the introduction of pathogens that could further compromise conservation efforts through reintroduction programs (Viggers et al. 1993; Tostes et al. 2015). In this context, improving our knowledge on the distribution and ecology of blood parasites in the Pampas will be critical to support decision making in a future Yellow Cardinal release program. In this study, we employed morphological and molecular methods to investigate the prevalence and diversity of blood parasites in wild passerines at Espinilho State Park, as well as in captive Yellow Cardinals from facilities participating in the Yellow Cardinal Conservation Program.

3.2 MATERIALS AND METHODS

Free-living passerines were captured at the Espinilho State Park (30°12'S 57°30'W; average altitude = 52 meters, average annual temperature = 23.4 °C, average annual precipitation = 1300 mm; Redin et al. 2011), Rio Grande do Sul state, Brazil (Fig. 1). Birds were captured using mist nests (16 mm mesh) of 12 x 2.5 meters during two field expeditions (February 2019 and December 2019). In the first expedition, mist nets were deployed at three capture points for 5 days (c. 9 hours/day) and checked every 20 minutes. In both the first and second expedition, another team actively searched by foot for Yellow Cardinal territories (c. 9 hours/day for 5 days in each expedition); when a territory was found, mist nets were set and the playback method was used once or twice to attract territory owners to the nets. Captured birds were briefly placed in individual tissue bags for further manipulation (biological material sampling and banding) and then released. Sixty-two birds comprising 26 species were captured in the first expedition and two Yellow Cardinals were captured in the second expedition (Table 1). Additionally, 30 Yellow Cardinals were sampled in 2018 and 2019 at three facilities in southern Brazil: Pomerode (n = 6, July 2018, 26°44'12"S 49°10'25"W), Foz do Iguaçu (n = 17, May 2019, 25°36'54"S 54°29'01"W), and Gramado (n = 7, June 2019, 29°25'48"S 50°51'19"W).

Blood samples (<1% body mass) were obtained through ulnar venipuncture with disposable needles (13 x 4.5 mm) and microhematocrit capillary tubes (internal diameter 1.1 mm). Blood smears were prepared immediately after collection, fixed with methanol and stained with May Grünwald-Giemsa. An additional drop of blood was obtained from 33 individuals (those with sufficient body mass) into sterile tubes with EDTA that were kept in a cooler box (2 to 8 °C) until being transferred to the laboratory to be frozen (-20 °C).

Blood smears were examined under light microscopy under 1000× magnification for a minimum 100 fields (estimated 20,000 to 30,000 erythrocytes) and then the full extent of the blood smear was examined for microfilariae under 400× magnification. Haemosporidian parasites were identified using the morphological keys provided by Valkiūnas (2005) with the

addition of *Haemoproteus* species recently described from passerines (Valkiūnas et al. 2007; Iezhova et al. 2010; Križanauskienė et al. 2010, 2012; Paperna and Yosef 2010; Dimitrov et al. 2013; Clark et al. 2015; Mantilla et al. 2016). Erythrocyte and parasite measurements were obtained with ImageJ 1.8.0 (Schneider et al. 2012), using morphological parameters previously described in the literature (Bennett and Campbell 1972; Nandi and Bennett 1994; Valkiūnas 2005).

A conventional phenol–chloroform method with isopropanol precipitation was used to extract DNA from 10 µL of blood samples of 33 birds (Sambrook and Russell 2001). The genomic DNA pellets were re-suspended in 10 µL of ultrapure water (Milli-Q, Merck, Kenilworth, USA) and quantified using spectrophotometry (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, USA). The nested PCR assay described by Hellgren et al. (2004) was employed to amplify a 479 bp fragment of the cytochrome *b* gene (*cyt-b*) of *Plasmodium/Haemoproteus*. Both reactions had a well volume of 25 µL and contained 1× buffer, 4 mM of MgCl₂, 0.3 mM of each dNTP, 1 unit of DNA polymerase, 0.4 mM of each primer, and nuclease-free water. The first reaction used 2 µL of template DNA and the second reaction used 1 µL of the product of the first reaction. We performed the first reaction with 25 cycles of denaturation (94 °C for 30 seconds), followed by annealing (50 °C for 30 seconds) and extension (94 °C for 30 seconds). Initial denaturation occurred at 94 °C for 3 minutes and the final extension at 72 °C for 10 minutes. The amplification of the second reaction was similar to the first reaction except for the number of cycles (35) and the annealing temperature (52 °C). All samples were tested in duplicates. DNA extracted from blood samples of chickens experimentally infected with *P. gallinaceum* and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively. Amplification products were separated with 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet illumination (UV Transilluminator, UVP LLC, Upland, USA). *Cyt-b* amplification products were purified with Polyethylene Glycol 8000 (Sambrook and Russell 2001) and sequenced bi-directionally with dye terminator fluorescent labeling (BigDye Terminator v3.1, Thermo Scientific, Waltham, USA) in an ABI Prism 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

TABLE 1. SUMMARY OF THE SAMPLING EFFORT AND PREVALENCE OF BLOOD PARASITES IN WILD PASSERINES SAMPLED AT ESPINILHO STATE PARK AND IN CAPTIVE YELLOW CARDINALS (*Gubernatrix cristata*) AT FACILITIES IN SOUTHERN BRAZIL. LEGEND: H = *Haemoproteus*, M = microfilariae, T = *Trypanosoma*, H/P = *Haemoproteus* or *Plasmodium*. SAMPLE SIZES ARE REPRESENTED AS ‘NUMBER OF BLOOD SMEARS [NUMBER OF SAMPLES TESTED WITH PCR]’.

Family	Species	English name	Sample size		Blood smear			Nested PCR
			H	H/P	M	T		
Dendrocolaptidae	<i>Drymornis bridgesii</i>	Scimitar-billed Woodcreeper	1	–	–	–	–	na
	<i>Lepidocolaptes angustirostris</i>	Narrow-billed Woodcreeper	1	–	–	–	–	na
Furnariidae	<i>Asthenes baeri</i>	Short-billed Canastero	3	–	–	–	–	na
	<i>Cranioleuca pyrrhophia</i>	Stripe-crowned Spintail	1	–	–	–	–	na
	<i>Coryphistera alaudina</i>	Lark-like Brushrunner	2	–	–	–	–	na
	<i>Furnarius rufus</i>	Rufous Hornero	6 [1]	–	1 (17%)	–	–	1 (100%)
	<i>Pseudoseisura lophotes</i>	Brown Cacholote	1 [1]	–	–	1 (100%)	–	–
	<i>Schoeniophylax phryganophilus</i>	Chotoy Spintail	1	–	–	–	–	na
Hirundinidae	<i>Progne tapera</i>	Brown-chested Martin	1	–	–	–	–	na
Icteridae	<i>Agelaioides badius</i>	Grayish Baywing	3 [2]	2 (67%)	–	–	–	1 (50%)
	<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	Screaming Cowbird	2	–	–	–	–	na
Mimidae	<i>Mimus saturninus</i>	Chalk-browed Mockingbird	2 [1]	–	–	1 (50%)	–	–

Passerellidae	<i>Zonotrichia capensis</i>	Rufous-collared Sparrow	8 [2]	2 (25%)	-	-	-
Poliopitidae	<i>Poliopitila damicola</i>	Masked Gnatcatcher	4	-	1 (25%)	-	na
Thraupidae	<i>Gubernatrix cristata</i>	Yellow Cardinal (wild)	3	-	3 (100%)	-	na
	<i>Paroaria coronata</i>	Red-crested Cardinal	5 [1]	-	1 (20%)	-	-
	<i>Saltator aurantirostris</i>	Golden-billed Saltator	1 [1]	-	1 (100%)	-	-
	<i>Sicalis flaveola</i>	Saffron Finch	4	-	-	-	na
	<i>Thraupis sayaca</i>	Sayaca Tanager	2 [1]	-	1 (50%)	-	-
Troglodytidae	<i>Troglodytes musculus</i>	House Wren	2	-	-	-	na
Turdidae	<i>Turdus amaurochalinus</i>	Creamy-bellied Thrush	1	-	-	-	na
Tyrannidae	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	Scarlet Flycatcher	3	-	-	-	na
	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Great Kiskadee	3 [2]	2 (67%)	-	-	2 (100%)
	<i>Serpophaga subcristata</i>	White-crested Tyrannulet	2	-	-	-	na
	<i>Sublegatus modestus</i>	Southern Scrub Flycatcher	1	-	-	-	na
	<i>Tyrannus melancholicus</i>	Tropical Kingbird	1	-	-	-	na
Total (wild passerines)			64 [12]	6 (9%)	1 (2%)	9 (14%)	4 (33%)
Yellow Cardinals (captive)			30 [21]	-	-	13 (43%)	1 (5%)

DNA sequences were aligned and edited with Sequencher 4.0.8 (Gene Codes Co., Ann Arbor, USA) and MEGA X (Kumar et al. 2018). *Cyt-b* sequences obtained in this study were deposited at public databases (GenBank accession codes ON703102–4; MalAvi lineages AGEBAD04 and PITSUL01). *Cyt-b* sequences of haemosporidian lineages with high similarity ($\geq 99\%$) to the sequences produced in this study and sequences of known-morphospecies lineages of Haemosporida were obtained from MalAvi (Bensch et al. 2009). A Bayesian phylogenetic tree was produced using MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al. 2012) with the GTR+I+G model of nucleotide evolution, as recommended by jModelTest 2 (Darriba et al. 2012). Two Markov chains were ran simultaneously for 5 million generations and sampled every 1000 generations. The first 1250 trees (25%) were discarded as a burn in step, and the remaining trees were used to calculate the posterior probabilities in the final consensus tree.

3.3 RESULTS

Haemosporidian parasites were detected in 10.9% (7/64) of the wild passerines (Table 1). No haemosporidian parasites were detected in the blood smears of Yellow Cardinals, wild or captive. Microfilariae were detected in 14.1% (9/64) of the wild passerines, including all wild Yellow cardinals ($n=3$), and in 43.3% (13/30) of captive Yellow Cardinals (Fig. S1). One of the microfilariae-infected captive Yellow Cardinals (from the Foz do Iguaçu facility) was concurrently parasitized by *Trypanosoma* sp.; only two trypomastigote forms were present in the blood smear of that individual (Fig. S2 and Table S1).

FIGURE S1. MICROFILARIAE IN THE BLOOD SMEARS OF CAPTIVE YELLOW CARDINAL (*Gubernatrix cristata*) AND WILD PASSERINES AT ESPINILHO STATE PARK. HOST SPECIES: (A) WILD YELLOW CARDINAL (SAMPLE 2PEEF), (B) WILD YELLOW CARDINAL (SAMPLE 2PEEF), (C) CAPTIVE YELLOW CARDINAL (SAMPLE PA15), (D) CAPTIVE YELLOW CARDINAL (SAMPLE PA15), (E) SAYACA TANAGER (*Thraupis sayaca*, SAMPLE PEE23), (F) MASKED GNATCATCHER (*Polioptila dumicola*, SAMPLE PEE24), (G) GOLDEN-BILLED SALTATOR (*Saltator aurantiirostris*, SAMPLE PEE53), (H) RED-CRESTED CARDINAL (*Paroaria coronata*,

SAMPLE PEE55), (I) CHALK-BROWED MOCKINGBIRD (*Mimus saturninus*,
SAMPLE PEE58), (J) BROWN CACHOLOTE (*Pseudoseisura lophotes*,
SAMPLE PEE60). MAY GRÜNWARD-GIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 50 μ M.

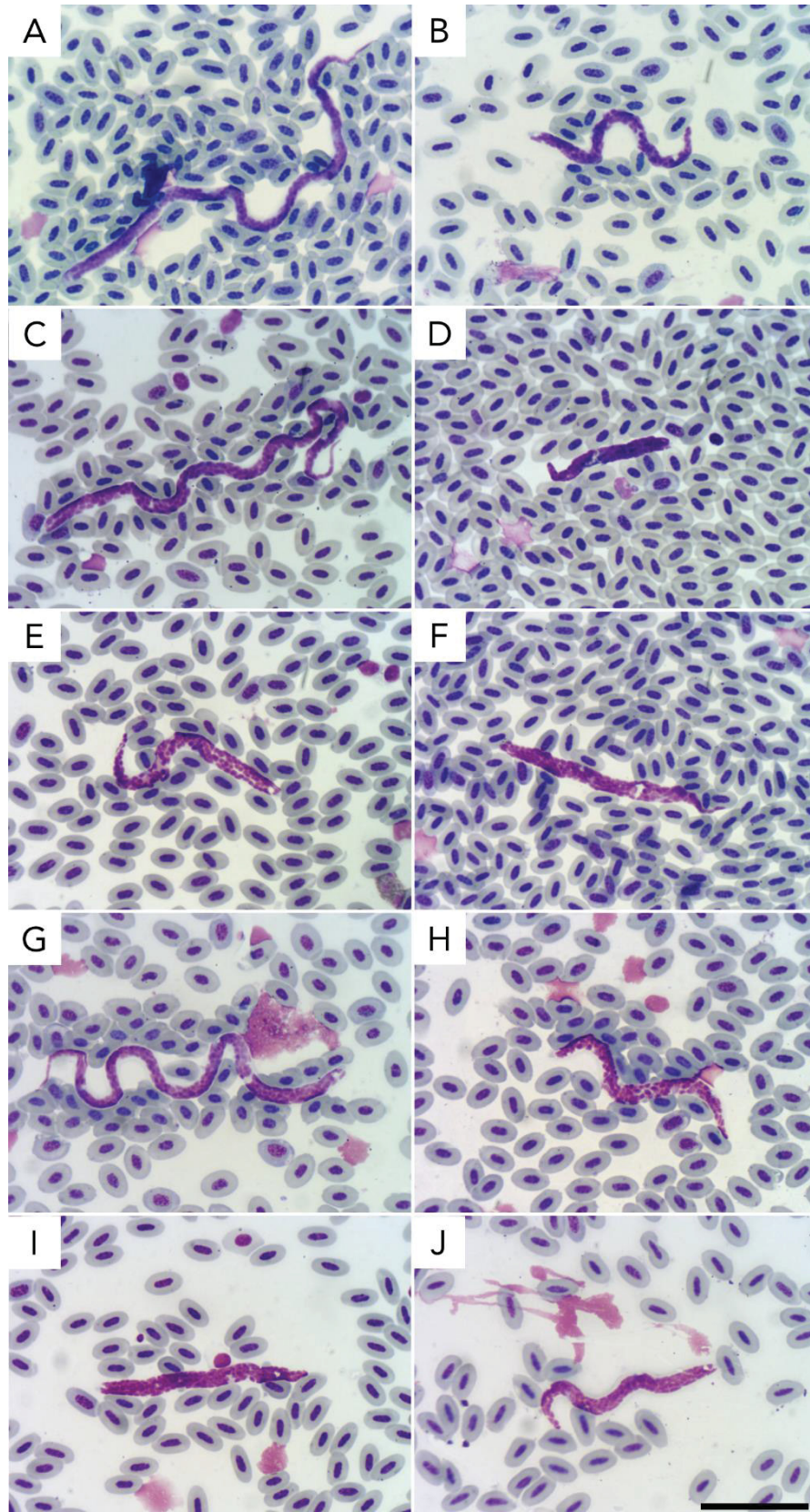


FIGURE S2. *Trypanosoma* sp. IN THE BLOOD SMEAR OF A CAPTIVE YELLOW CARDINAL (*Gubernatrix cristata*). LEGEND: (K) KINETOPLAST, (F) FLAGELLUM, (N) NUCLEUS, (V) VACUOLES. SAMPLE PA15, MAY GRÜNWARD-GIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 10 μ M.

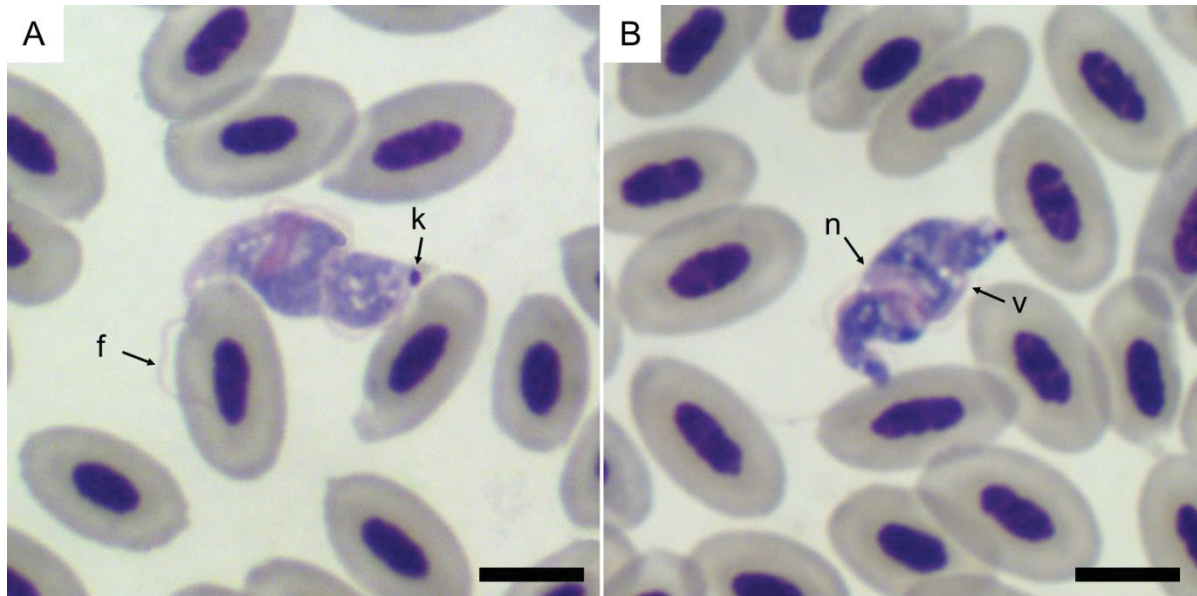


TABLE S1. MORPHOMETRIC RESULTS OF TWO *Trypanosoma* sp. TRIPOMASTIGOTES IN A CAPTIVE YELLOW CARDINAL (*Gubernatrix cristata*). SAMPLE PA15.

Parameter	A	B
Posterior end to the center of the kinetoplast, μ m (PK)	2.3	2.2
Center of the kinetoplast to the center of the nucleus, μ m (KN)	14.0	11.0
Posterior end to the center of the nucleus, μ m (PN)	16.3	13.3
Center of the nucleus to the anterior end, μ m (NA)	10.4	12.8
Total length excluding free flagellum, μ m (PA)	26.8	26.1
Free flagellum, μ m (FF)	16.0	12.0
Body width excluding corrugated membrane, μ m (BW)	7.7	7.3
Kinetoplast width, μ m (KW)	1.1	1.0
Relative position of the nucleus (PN/PA)	0.61	0.51
Relative position of the kinetoplast (PK/PA)	0.09	0.09
Nuclear index (PN/NA)	1.57	1.03
Kinetoplast index (PN/KN)	1.17	1.20

The haemosporidian parasites of two Great Kiskadees (*Pitangus sulphuratus*) shared the following morphological characters. Developing gametocytes have relatively smooth margins (Fig. 2C, D) but occasionally have an amoeboid shape (Fig. 2A, B). Developing gametocytes often touch the nuclei and the envelope of infected erythrocytes (Figs. 2D, E). Macrogametocytes nuclei are predominantly subterminal and in general are not adjacent to the host cell nuclei (Figs. 2E–L). Gametocytes fill the poles of infected cells (Figs. 2F–P), have granules of small and medium pigments ($<1\ \mu\text{m}$), and do not have large or giant pigment granules ($\geq 1\ \mu\text{m}$). Gametocytes do not assume round or dumbbell shapes. Gametocytes do not completely encircle the host cell nuclei and do not displace it towards the parasite, towards the pole nor lead to enucleation. There are four *Haemoproteus* species that infect Passeriformes (*H. anthi*, *H. orizovorae*, *H. pastoris* and *H. tyranni*) and share the characters above, and their morphological differentiation relies on subtle variation in other characters (Table S2). In this study, the developing gametocytes infecting Great Kiskadees occasionally display amoeboid shapes (c. 20%; Fig. 2B) and are rarely asymmetrically-positioned ($<10\%$; Fig. 2C); furthermore, macrogametocytes have an average of 13 to 14 pigment granules. Considering these characters, zoogeography and host taxonomy, the parasite was identified as *H. tyranni*. Although there are slight morphological differences (more frequent amoeboid developing gametocytes, less frequent asymmetrically-positioned developing gametocytes, fewer pigment granules per macrogametocyte) relative to the original description of *H. tyranni* from Eastern Kingbird (*Tyrannus tyrannus*), these were not considered sufficiently divergent to justify the designation of a new morphospecies.

The haemosporidian parasites of two Grayish Baywings (*Agelaioides badius*) were identified as *Haemoproteus quiscalus* based on the following morphological characters. Developing gametocytes have relatively smooth margins and tend to touch the nuclei but not the envelope of infected erythrocytes (Figs. 3A–D). Fully-grown gametocytes tend to touch both the nucleus and the envelope of infected erythrocytes (Figs. 3E–P). Dumbbell-shaped gametocytes are present but represent less than a third of gametocytes (Figs. 3G–I). Average number of pigment granules per gametocyte is less than

15, and these granules are small and medium ($<1\ \mu\text{m}$); large or giant ($\geq 1\ \mu\text{m}$) pigment granules are absent. Gametocytes do not assume round or dumbbell shapes. Gametocytes do not completely encircle the host cell nuclei and do not displace it towards the parasite, towards the pole nor lead to enucleation. It should be noted that fully-grown gametocytes do not fill the poles of the infected cell (Figs. 3G–P), differing from the original description of this parasite in Common Grackle (*Quiscalus quiscula*), however this divergence was not considered sufficient to justify the designation of a new morphospecies.

FIGURE. 2 *Haemoproteus tyranni* LINEAGE PITSUL01 IN GREAT KISKADEE (*Pitangus sulphuratus*). LEGEND: (A–D) YOUNG GAMETOCYTES, (E–L) MACROGAMETOCYTES, (M–P) MICROGAMETOCYTES. SAMPLE PEE54, MAY GRÜN WALD □ GIEMSA STAIN. SCALE-BAR = $5\ \mu\text{M}$

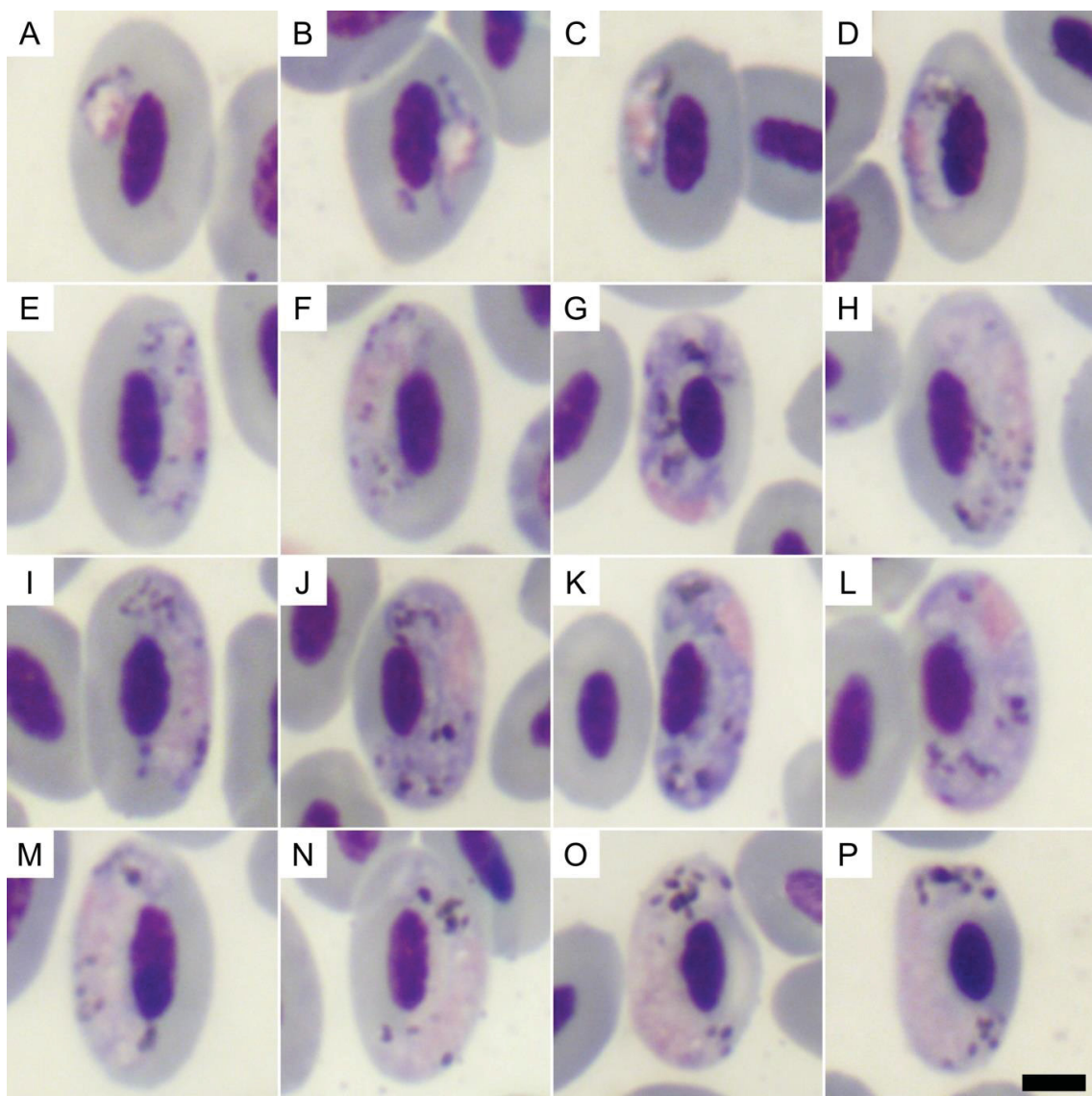


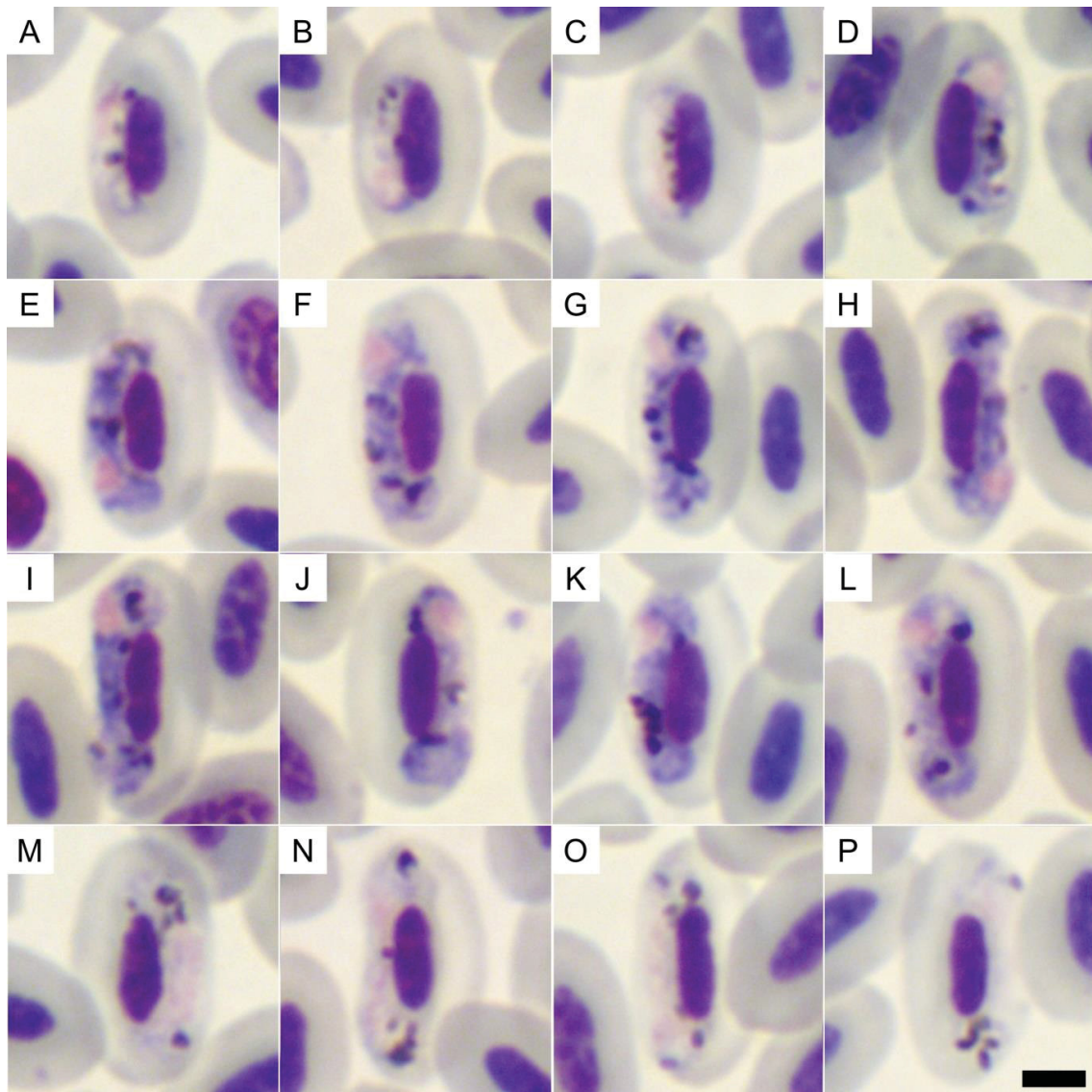
TABLE S2. MORPHOLOGICAL CHARACTERS USED TO DIFFERENTIATE *Haemoproteus anthi*, *H. orizivora*, *H. pastoris* AND *H. tyranni* (ADAPTED FROM VALKIŪNAS 2005).

Character	<i>H. anthi</i>	<i>H. orizivora</i>	<i>H. pastoris</i>	<i>H. tyranni</i>
Granules per macrogametocyte	10.7 ± 1.5	25.4 ± 2.2	11.0	17.0 ± 1.8
Amoeboid developing gametocytes	Absent or very rare	Absent or very rare	Occasional	Absent or very rare
Asymmetrically-positioned developing gametocytes	Uncommon	Uncommon	Uncommon	Frequent
Hosts	Motacillidae	Estrildidae	Sturnidae	Tyrannidae
Zoogeographic regions	Palaearctic, Ethiopian, Oriental	Palaearctic, Ethiopian, Oriental	Palaearctic, Ethiopian, Oriental	Neotropical, Nearctic

The haemosporidian parasites of two Ruffous-collared Sparrows (*Zonotrichia capensis*) were identified as *Haemoproteus erythrogravidus* based on the following morphological characters. Developing gametocytes have relatively smooth margins (Figs. 4A–D), often touch the nuclei and occasionally touch the envelope of infected erythrocytes (Fig. 4B). Fully-grown gametocytes are dumbbell-shaped possessing a markedly narrow stem (Figs. 4E–L, N). Gametocytes completely fill the poles of the host cells (Figs. 4E–P), laterally displace the nuclei of the host cells in a relatively subtle way (Figs. 4E–P), and cause the protrusion of the host cell envelope (Fig. 4H–P). Gametocytes do not assume round or dumbbell shapes, and developing gametocytes do not assume amoeboid shapes. Gametocytes do not completely encircle the host cell nuclei and do not displace it towards the parasite, towards the pole nor lead to enucleation. Gametocytes present small and medium pigment granules (<1 µm) but not large or giant (≥1 µm) pigment granules.

FIGURE 3. *Haemoproteus quiscalus* LINEAGE AGEBAD04 IN GRAYISH BAYWING (*Agelaioides badius*). LEGEND: (A–D) YOUNG GAMETOCYTES,

(E–L) MACROGAMETOCYTES, (M–P) MICROGAMETOCYTES. SAMPLE PEE38, MAY GRÜNWARD GIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 5 μM



The haemosporidian parasite detected in a Rufous Hornero (*Furnarius rufus*) could not be identified due to low parasitemia. Only two macrogametocytes were detected (Fig. S3), with the following morphological characters. Gametocytes are elongated and thin ($12.9 \times 1.8 \mu\text{m}$), with a highly uneven membrane slightly displacing the erythrocyte nuclei laterally (nuclear displacement ratio = 0.8). These parasites touch the erythrocytes' envelope but not their nuclei and possess about 15 randomly distributed small pigmented granules ($<0.5 \mu\text{m}$). These characters were considered suggestive of *Plasmodium elongatum*, but are not sufficient to rule out other species of *Plasmodium* or even *Haemoproteus*.

FIGURE 4. *Haemoproteus erythrogravidus* IN RUFIOUS-COLLARED SPARROW (*Zonotrichia capensis*). LEGEND: (A–D) YOUNG GAMETOCYTES, (E–L) MACROGAMETOCYTES, (M–P) MICROGAMETOCYTES. SAMPLE PEE14, MAY GRÜNWARD GIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 5 μ M

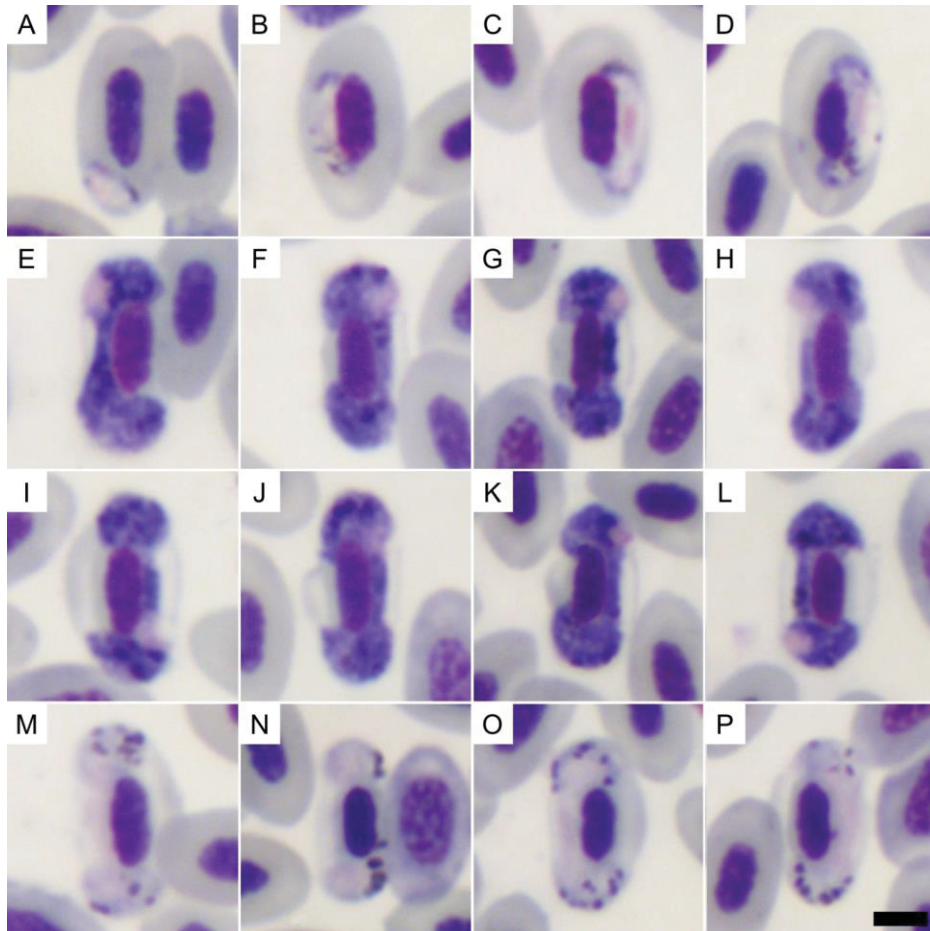
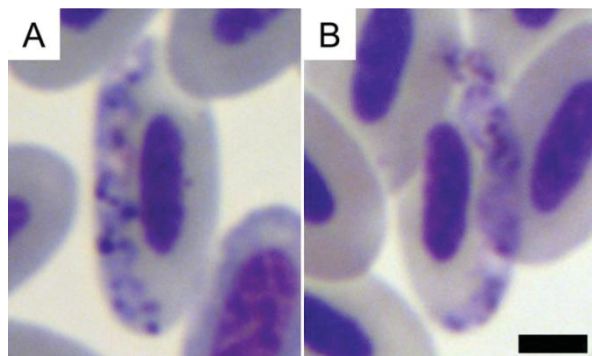


FIGURE S3. MACROGAMETOCYTES OF AN UNIDENTIFIED HAEMOSPORIDIAN PARASITE (*Haemoproteus* OR *Plasmodium*) FROM RUFIOUS HORNERO (*Furnarius rufus*). SAMPLE PEE29, MAY GRÜNWARD-GIEMSA STAIN. SCALE-BAR = 5 μ M



Blood samples from 33 birds (12 wild passerines and 21 captive Yellow Cardinals) were tested with a nested PCR targeting *Haemoproteus/Plasmodium* (Table 1). Five samples were PCR-positive: one smear-positive Grayish Baywing, two smear-positive Great Kiskadee, one smear-positive Rufous Hornero, and one smear-negative captive Yellow Cardinal (from the facility at Foz do Iguaçu). The blood samples from the Rufous Hornero and one of the Great Kiskadees were PCR-positive but, despite several sequencing attempts, it was not possible to obtain *cyt-b* sequences with sufficient quality. The sequence obtained from the smear-negative captive Yellow Cardinal (431 bp) and from one Great Kiskadee infected with *H. tyranni* (411 bp) were identical in the segment in which they overlapped (411 bp). Bayesian tree analysis confirmed that these sequences and that from the Grayish Baywing infected with *H. quisqualus* were clustered with lineages of the subgenus *Parahaemoproteus* (Fig. 5 and Fig. S4).

FIGURE 5. BAYESIAN PHYLOGENETIC TREE OF A 479 BP SEGMENT OF THE CYT-B GENE OF HAEMOSPORIDA (BLUE = *Haemoproteus*, GREEN = *Plasmodium*, PINK = *Leucocytozoon*). THE PHYLOGENETIC BRANCH WITH THE LINEAGES IDENTIFIED IN THIS STUDY IS SHOWN TO THE RIGHT. BRANCH LENGTHS ARE DRAWN PROPORTIONALLY TO THE EXTENT OF CHANGES (SCALE-BARS ARE SHOWN). VALUES ADJACENT TO NODES REPRESENT POSTERIOR PROBABILITIES. MALAVI LINEAGE NAMES ARE PROVIDED FOR LINEAGES. LINEAGES OBTAINED IN THIS STUDY ARE HIGHLIGHTED IN RED.

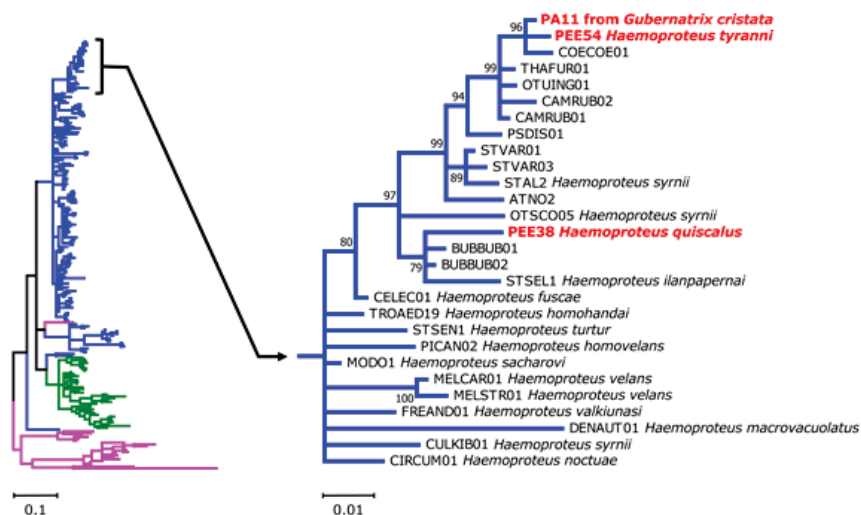


FIGURE S4 BAYESIAN PHYLOGENETIC TREE OF A 479 BP SEGMENT OF THE CYT-B GENE OF HAEMOSPORIDA. BRANCH LENGTHS ARE DRAWN PROPORTIONALLY TO THE EXTENT OF CHANGES (SCALE-BAR IS SHOWN). VALUES ADJACENT TO NODES REPRESENT POSTERIOR PROBABILITIES. MALAVI LINEAGE NAMES ARE PROVIDED FOR LINEAGES. LINEAGES OBTAINED IN THIS STUDY ARE HIGHLIGHTED IN RED

3.4 DISCUSSION

The prevalence of parasites by microscopy in wild passerines at Espinilho State Park (n=64) was 14.1% for microfilariae, 9.4% for *Haemoproteus*, and 1.6% for unidentified *Haemoproteus/Plasmodium*. White et al. (1978) compiled the largest dataset on microscopy surveys of blood parasites in the Pampas and Chaco biomes, and found a pooled prevalence of 9.7% for *Haemoproteus* and 0.1% for microfilariae (n=807), and also found records of *Plasmodium* and *Trypanosoma* (prevalence not estimated). Our results are generally consistent with those from that survey, except for the considerably higher prevalence of microfilariae. For comparison, the massive dataset on microscopy surveys of blood parasites compiled by Woodworth-Lynas et al. (1989) for wild passerines in São Paulo, southeast Brazil (Atlantic Forest and Cerrado biomes), revealed a prevalence of 3.2% for *Haemoproteus*, 0.7% for *Plasmodium*, 1.3% for *Trypanosoma* and 2.6% for microfilariae (n=15,574).

In this study, nested PCR followed by gene sequencing of a subset of wild passerines at Espinilho State Park (n = 12) revealed a prevalence of 16.7% for *Haemoproteus* and 16.7% for unidentified *Haemoproteus/Plasmodium*. Table 2 compares these results to those of previous PCR surveys on haemosporidian parasites in passerines in the Pampas biome, illustrating the marked variation in the estimated prevalence of these parasites among different studies. These differences may be attributed to regional differences in avian community and sample composition, and could also reflect seasonal differences or differences in sensitivity of different PCR protocols employed. For context, a large-scale PCR survey of haemosporidian parasites in wild passerines in South America employing the same nested PCR protocol as in this study found prevalences ranging from 0.7% to 5.5% for *Haemoproteus* and 6.6% to 14.7% for *Plasmodium* depending on the biome (excluding the Pampas) (Fecchio et al. 2019).

TABLE 2. SUMMARY OF MOLECULAR SURVEYS ON THE PREVALENCE OF HAEMOSPORIDIAN PARASITES IN WILD PASSERIFORMES BIRDS IN

THE PAMPAS BIOME. LEGEND: H = *Haemoproteus*, P = *Plasmodium*, H/P = *Haemoproteus* or *Plasmodium*.

Country	Method	Sample size	H	P	H/P	Reference
Uruguay	PCR	322	3.7%	17.7%	–	Durrant et al. 2006
	PCR	16	0%	6.3%	–	Doussang et al. 2019
	PCR	36	0%	0%	–	Doussang et al. 2021
Argentina	Nested PCR	9	–	–	66.6%	Marzal et al. 2011
	PCR	6	0	33.3%	–	Doussang et al. 2019
	PCR	20	5.0%	0	–	Doussang et al. 2021
Brazil	Nested PCR	5	–	–	40.0%	Marzal et al. 2011
	Nested PCR	366	10.9%	7.4%	–	Fecchio et al. 2019
	Nested PCR	12	16.7%	–	16.7%	This study

The *Haemoproteus* genus has two recognized subgenera, *Haemoproteus* and *Parahaemoproteus* (Valkiūnas 2005). Species of the subgenus *Haemoproteus* are vectored by louse flies (Hippoboscidae), whereas species of the subgenus *Parahaemoproteus* are vectored by biting midges (Ceratopogonidae) (Valkiūnas 2005; Martinsen et al. 2008). The lineages detected in this study were genetically clustered with lineages known to belong to the subgenus *Parahaemoproteus* and are therefore presumably vectored by biting midges. All three *Haemoproteus* morphospecies identified in this study are known to occur in the Neotropical region. *Haemoproteus erythrogravidus* has been recorded in Colombia, Peru, Mexico, United States of America, and in Atlantic Forest areas of Brazil (Mantilla et al. 2016; Oliveira et al. 2020). *Haemoproteus tyranni* has been recorded in Canada, USA, Panama, Venezuela, and in Atlantic Forest areas of Brazil (Bennett et al. 1986; Valkiūnas 2005). *Haemoproteus quisqualis* has been recorded in Canada and USA (Burry-Caines and Bennett 1992; Valkiūnas 2005). This study therefore provides the southernmost records for all three of these morphospecies, and their first record for the Pampas biome.

Haemoproteus erythrogravidus was described from Rufous-collared Sparrows (*Zonotrichia capensis*) captured in Colombia (Mantilla et al. 2016), and the morphological characters observed in this study were identical to those in the original description. In contrast, however, this study provides the first records of *H. tyranni* and *H. quiscalus* infecting Great Kiskadees and Grayish Baywings, respectively, and provides the first *cyt-b* sequences for these morphospecies, which will be useful for future phylogenetic studies. It is not clear whether the slight morphological differences observed in *H. tyranni* and *H. quiscalus* relative to the original descriptions reflect lineage-specific variations or morphological plasticity due to host-specific variations. Host-specific variation in parasite morphology was previously demonstrated in other avian haemosporidian parasites, both in natural and laboratory settings, with the same parasite strain presenting slightly different morphological characters depending on the host (Laird and Van Riper 1981; Valkiūnas 2005; Mantilla et al. 2016). The morphological divergence noted in *H. quiscalus* is particularly significant because the filling of the erythrocyte poles by fully-grown gametocytes is considered one of the main diagnostic features for this species (Valkiūnas 2005), yet it was not present in the specimens evaluated in this study. We therefore recommend caution in using this morphological character as a key diagnostic feature for this species.

Unfortunately, the parasite from Rufous Hornero could not be identified. The morphological characters of the two gametocytes observed were thought to be generally consistent with those of *Plasmodium elongatum*, a common generalist parasite of birds worldwide (Valkiūnas 2005), but due to the low parasitemia and inability to obtain high-quality *cyt-b* sequences it was not possible to rule out other parasites such as *Haemoproteus furnarius* or other *Plasmodium* spp.

A previous PCR survey detected *Plasmodium* in all three wild Yellow Cardinals sampled in the Pampas biome, with the identification of lineages DENPET03 (*P. nucleophilum*) and FURLEU01 (morphospecies unknown) (Fecchio et al. 2019), whereas no haemosporidian parasites were seen in the blood smears of three wild Yellow Cardinals in this study. We detected DNA from *Haemoproteus* sp. in the blood of one captive Yellow Cardinal (n=30), which based on a partial *cyt-b* sequence may be presumed to correspond to *H.*

tyranni. No parasites were seen in the blood smear of that individual. Considering that *H. tyranni* is only known to infect hosts of the Tyrannidae family (Valkiūnas 2005), it seems plausible that this was an abortive infection.

All wild Yellow Cardinals (n=3) and 43% of the captive Yellow Cardinals (n=30) examined in this study had microfilariae in their blood smears. This is in agreement with previous microscopy surveys of avian blood parasites in southeast Brazil, which found microfilariae to be remarkably abundant in Thraupidae and Turdidae birds (Woodworth-Lynas et al. 1989). Furthermore, ecological studies in the Neotropical region have revealed that microfilariae prevalence is generally higher at low altitudes and in hosts with larger body size that forage at mid-high to canopy strata and have solitary habits (González et al. 2014; De La Torre and Campiã 2021). These characteristics all apply to Yellow Cardinals at Espinilho State Park, which may help explaining the high microfilariae prevalence documented in this study. Further studies are necessary to assess whether this parasite is pathogenic for this threatened bird species. Although most filarid infections in birds are not significantly pathogenic to their hosts (Huang et al. 2017), in some cases they may cause negative effects on host fitness, such as weight loss (Atawal et al. 2019) and ataxia (Law et al. 1993). Nevertheless, the fact that these parasites appear to be widespread in both captive and wild Yellow Cardinals suggests that their detection in release candidates should not necessarily be disqualifying in a future population supplementation program.

We detected *Trypanosoma* sp. in a Yellow Cardinal for the first time, which can be considered an important finding to understand better the host-parasite interaction and management of this species. The prevalence of avian trypanosomes is usually low in Brazil (Woodworth-Lynas et al. 1989; Ribeiro et al. 2005; Fecchio et al. 2007; Sebaio et al. 2012), and these parasites were previously known to occur in the Pampas/Chaco region (Woodworth-Lynas et al. 1989). Trypanosomes are transmitted by arthropods (mainly insects) and leeches, however some species can be transmitted directly between vertebrates. Even though they appear not to harm their avian hosts, a variety of trypanosomes is known to cause significant disease in humans and domestic livestock (Hamilton et al. 2007; Zídková et al. 2012).

In conclusion, this study provides valuable data to support conservation management of the Yellow Cardinal and other threatened passerines from the Pampas biome. Specifically, our findings show that captive Yellow Cardinal present a high prevalence of microfilariae, emphasizing the importance of further studies to evaluate the pathogenicity of these parasites and potentially developing treatment protocols for these infections in release candidates. Post-mortem analysis of Yellow Cardinals that die in captivity would be particularly valuable to identify the helminth species involved in these infections and to assess the anatomic distribution and pathological effects of the adult worms. The detection of *Trypanosoma* sp. in a captive Yellow Cardinal also merits further investigation to fully characterize the parasite, evaluate its health effects and determine its vectors and host distribution in the Pampas biome.

3.5 ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Secretaria Estadual do Meio Ambiente e Infraestrutura do Rio Grande do Sul (SEMA) and Espinilho State Park staff for permitting to research in a protected area and for all the support during fieldwork, and Fazenda São Marcos owners for granting access to one of the study sites. We also thank Pai Passo farm Owners (especially Paulo, Pedro Bastos and Maria) and Condomínio Agropecuário Ceolin for its huge support and ICMBio for the financial support on logistics and transportation during field expeditions. This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 422053/2016-3) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-00645-18). FCF was supported by National Science Foundation grant 1717498 as part of the joint NSF-NIH-USDA Ecology and Evolution of Infectious Diseases program. CSF was supported by CNPq grant 309438/2016-0 and 310608/2019-8. EMB was granted by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 304334/2019-7)

REFERENCES

Atawal AF, Mgbeahuruike AC, Hammers M (2019) Microfilarial infections associated with body mass loss of Village Weavers *Ploceus cucullatus*. *Ostrich* 90:41–44. <https://doi.org/10.2989/00306525.2018.1539418>

Beier C, Repenning M, da Pereira MS, et al (2017) Cooperative breeding and demography of Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata* in Brazil. *Rev Bras Ornitol* 25:12–19. <https://doi.org/10.1007/BF03544371>

Bennett GF, Caines JR, Whiteway MA (1986) Avian Haemoproteidae. 20. The haemoproteids of the avian families Apodidae (swifts), Bucconidae (puffbirds), and Indicatoridae (honeyguides). *Can J Zool* 64:766–770. <https://doi.org/10.1139/z86-113>

Bennett GF, Campbell A (1972) Avian Haemoproteidae. I. Description of *Haemoproteus fallisi* n. sp. and a review of the haemoproteids of the family Turdidae. *Can J Zool* 50:1269–1275

Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris J (2009) MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Mol Ecol Resour* 9:1353–1358

BirdLife International (2022) Species factsheet: *Gubernatrix cristata*. In: BirdLife Int. Data Zone. <http://datazone.birdlife.org/species/factsheet/yellow-cardinal-gubernatrix-cristata>. Accessed 6 Jun 2022

Burry-Caines JR, Bennett GF (1992) The Haemoproteidae (Apicomplexa: Haemosporina) of the avian families Fringillidae and Emberizidae s.l. *Can J Zool* 70:1149–1160. <https://doi.org/10.1139/z92-161>

Clark NJ, Adlard RD, Clegg SM (2015) Molecular and morphological characterization of *Haemoproteus (Parahaemoproteus) ptilotis*, a parasite infecting Australian honeyeaters (Meliphagidae), with remarks on prevalence and potential cryptic speciation. *Parasitol Res* 114:1921–1928

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

De La Torre GM, Campiã KM (2021) Bird habitat preferences drive hemoparasite infection in the Neotropical region. *Integr Zool* 16:755–768. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12515>

Dimitrov D, Valkiūnas G, Zehtindjiev P, et al (2013) Molecular characterization of haemosporidian parasites (Haemosporida) in yellow wagtail (*Motacilla flava*), with description of in vitro ookinetes of *Haemoproteus motacillae*. *Zootaxa* 3666:369–381

Doussang D, González-Acuña D, Torres-Fuentes LG, et al (2019) Spatial distribution, prevalence and diversity of haemosporidians in the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Parasit Vectors* 12:2. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3243-4>

Doussang D, Sallaberry-Pincheira N, Cabanne GS, et al (2021) Specialist versus generalist parasites: the interactions between host diversity, environment and geographic barriers in avian malaria. *Int J Parasitol* 51:899–911. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.04.003>

Durrant KL, Beadell JS, Ishtiaq F, et al (2006) Avian Hematozoa in South America: A Comparison of Temperate and Tropical Zones. *Ornithol Monogr* 98–111. <https://doi.org/10.2307/40166831>

Fecchio A, Bell JA, Pinheiro RBP, et al (2019) Avian host composition, local speciation and dispersal drive the regional assembly of avian malaria parasites in South American birds. *Mol Ecol* 28:2681–2693. <https://doi.org/10.1111/mec.15094>

Fecchio A, Marini MÂ, Braga ÉM (2007) Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no Cerrado do Brasil Central. *Neotropical Biol Conserv* 2:127–135

González AD, Matta NE, Ellis VA, et al (2014) Mixed species flock, nest height, and elevation partially explain avian haemoparasite prevalence in Colombia. *PLoS ONE* 9:e100695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100695>

Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR (2007) Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol Phylogenet Evol* 44:15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.023>

Hellgren O, Waldenström J, Bensch S (2004) A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J Parasitol* 90:797–802

Huang Y-L, Tsai S-S, Thongchan D, et al (2017) Filarial nematode infection in eclectus parrots (*Eclectus roratus*) in Taiwan. *Avian Pathol* 46:188–194. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1237014>

ICMBio (2018) Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume III – Aves. Ministério do Meio Ambiente, Brasília

Iezhova TA, Valkiūnas G, Loiseau C, et al (2010) *Haemoproteus cyanomitrae* sp. nov. (Haemosporida: Haemoproteidae) from a widespread African songbird, the olive sunbird, *Cyanomitra olivacea*. *J Parasitol* 96:137–143

Jaramillo A (2020) Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*). In: del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, de Juana E (eds) *Birds of the World*. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca

Križanauskienė A, Iezhova TA, Palinauskas V, et al (2012) *Haemoproteus nucleocondensus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae) from a Eurasian songbird, the Great Reed Warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Zootaxa* 3441:36–46

Križanauskienė A, Pérez-Tris J, Palinauskas V, et al (2010) Molecular phylogenetic and morphological analysis of haemosporidian parasites (Haemosporida) in a naturally infected European songbird, the blackcap *Sylvia atricapilla*, with description of *Haemoproteus pallidulus* sp. nov. *Parasitology* 137:217–227

Kumar S, Stecher G, Li M, et al (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Laird M, Van Riper C (1981) Questionable reports of *Plasmodium* from birds in Hawaii, with the recognition of *P. relictum* ssp. *capistranoae* (Russell, 1932) as the avian malária parasite there. In: Parasitological topics - a presentation volume to P.C.C. Garnham, F.R.S. on the occasion of his 80th birthday. Society of Protozoologists, Lawrence, pp 159–165

Law JM, Tully TN, Stewart TB (1993) Verminous encephalitis apparently caused by the filarioid nematode *Chandlerella quisicali* in emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Avian Dis* 37:597–601

Mantilla JS, González AD, Lotta IA, et al (2016) *Haemoproteus erythroavidus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae): description and molecular characterization of a widespread blood parasite of birds in South America. *Acta Trop* 159:83–94

Marchiori JNC, Alves FDS (2014) O inhanduvá (*Prosopis affinis* Spreng.) no Rio Grande do Sul. 8 – Aspectos fitogeográficos. *Balduinia* 0:13–20. <https://doi.org/10.5902/2358198014133>

Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ (2008) A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol* 47:261–273

Martins-Ferreira C, Freitas TRO (2010) Genetic diversity and population structure of the endangered yellow cardinal *Gubernatrix cristata* and implications to its conservation efforts. In: Proceedings of the 25th International Ornithological Congress. International Ornithological Congress, Campos do Jordão, p 868

Marzal A, Ricklefs RE, Valkiūnas G, et al (2011) Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS One* 6:e21905

Nandi N, Bennett GF (1994) Re-description of *Trypanosoma corvi* Stephens and Christophers, 1908 emend. Baker, 1976 and remarks on the trypanosomes of the avian family Corvidae. Mem Inst Oswaldo Cruz 89:145–151

Oliveira L de, Barino GTM, Rossi MF, et al (2020) Morphological and molecular characterization of *Haemoproteus coatneyi* and *Haemoproteus erythroavidus* (Haemosporida: Haemoproteidae) in Passeriformes in Brazil's Atlantic Forest. Rev Bras Parasitol Veterinária 29:e011520. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020074>

Olson DM, Dinerstein E, Wikramanayake ED, et al (2001) Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. BioScience 51:933. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0933:TEOTWA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0933:TEOTWA]2.0.CO;2)

Paperna I, Yosef R (2010) Description of a new species of *Haemoproteus* (Haemosporidia, Apicomplexa) from an Orange-tufted Sunbird *Nectarinia osea*. Acta Parasitol 55:103–107

Piacentini VQ, Aleixo A, Agne CE, et al (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee/Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. Rev Bras Ornitol 23:91–298

Redin CG, Longhi RV, Watzlawick LF, Longhi SJ (2011) Composição florística e estrutura da regeneração natural do Parque Estadual do Espinilho, RS. Ciênc Rural 41:1195–1201

Ribeiro SF, Sebaio F, Branquinho FCS, et al (2005) Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. Parasitology 130:261–267. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006596>

Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, et al (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol 61:539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675

Sebaio F, Braga ÉM, Branquinho F, et al (2012) Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 21:7–15. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000100003>

Serafini PP (2013) *Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho*. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília

Tostes R, Vashist U, Scopel KKG, et al (2015) *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. infection in birds of the Brazilian Atlantic Forest detected by microscopy and polymerase chain reaction. *Pesqui Veterinária Bras* 35:67–74. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000100014>

Valkiūnas G (2005) *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton

Valkiūnas G, Križanauskienė A, Iezhova TA, et al (2007) Molecular phylogenetic analysis of circumnuclear hemoproteids (Haemosporida: Haemoproteidae) of sylviid birds, with a description of *Haemoproteus parabelopolskyi* sp. nov. *J Parasitol* 93:680–687

Viggers K, Lindenmayer D, Spratt D (1993) The Importance of Disease in Reintroduction Programmes. *Wildl Res* 20:687. <https://doi.org/10.1071/WR9930687>

White EM, Greiner EC, Bennett GF, Herman CM (1978) Distribution of the hematozoa of Neotropical birds. *Rev Biol Trop* 26:43–102

Woodworth-Lynas CB, Caines JR, Bennett GF (1989) Prevalence of avian haematozoa in São Paulo state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84:515–526. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000400009>

Zídková L, Cepicka I, Szabová J, Svobodová M (2012) Biodiversity of avian trypanosomes. *Infect Genet Evol* 12:102–112.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.022>

4. CAPÍTULO 3. PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS DE CARDEAIS-AMARELOS (*Gubernatrix cristata*) SILVESTRES E CATIVOS NO BRASIL

RESUMO

Existem apenas aproximadamente 50 cardeais-amarelos, *Gubernatrix cristata* (VIEILLOT, 1817), de vida livre no Brasil (espécie criticamente ameaçada), e os valores de referência para monitoramento sanitário das populações não são conhecidos. O presente estudo avaliou os parâmetros leucocitários (diferencial de leucócitos e relação de heterófilo:linfócito) em cardeais-amarelos do Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo (PCCA) e de vida livre. Foram coletadas amostras de sangue de 30 cardeais-amarelos do PCCA e de três indivíduos de vida livre capturados com rede de neblina no Parque Estadual do Espinilho. Amostras de sangue foram obtidas da veia ulnar para confecção imediata das extensões sanguíneas. As lâminas foram coradas pela técnica de May Grünwald-Giemsa e as leituras foram realizadas em microscópio óptico em objetiva de imersão (100X). Na contagem diferencial de leucócitos dos cardeais-amarelos cativos verificou-se relação de heterófilo:linfócito média de 0,97. Essa relação está elevada provavelmente devido à resposta de estresse dos cardeais-amarelos cativos. E a relação de heterófilo:linfócito média dos cardeais-amarelos de vida livre foi de 0,74. Este estudo estabeleceu parâmetros de referência para o diferencial de leucócitos e avaliação da relação heterófilo:linfócito de cardeais-amarelos de vida livre e de cativeiro, essencial para aprimorar o diagnóstico laboratorial dessa espécie criticamente ameaçada.

Palavras-chave: campos sulinos, espinilho, estresse, leucócitos, passeriformes.

4.1 INTRODUÇÃO

Parâmetros fisiológicos e biológicos comumente utilizados para avaliar a saúde de aves incluem exames hematológicos para verificação do eritrograma e leucograma, assim como medidas morfométricas

(FAIRBROTHER et al. 1990, MAXWELL 1993, MORENO et al. 2002, KILGAS et al. 2006).

Os leucócitos das aves são produzidos na medula óssea e podem ser classificados em duas categorias, os granulócitos e os agranulócitos, ou também chamados de mononucleares. O primeiro grupo é representado pelos basófilos, eosinófilos e heterófilos, enquanto o segundo grupo é representado pelos linfócitos e monócitos (CAMPBELL, 2004; GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 2005; FERNANDES et al., 2013). A maturação dos linfócitos ocorre nos órgãos linfóides, como timo e bursa de Fabricius e atuam na imunidade, através da resposta específica a patógenos e produção de anticorpos (CAMPBELL, 2015).

Os heterófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos são responsáveis principalmente pela primeira linha de defesa imune, chamada de imunidade inata (DAVISON et al., 2008). Os heterófilos atuam de forma semelhante aos neutrófilos dos mamíferos, eles são células fagocíticas que agem em respostas inflamatórias fagocitando bactérias através da quimiotaxia, opsonização, fagocitose e lise (CÂNDIDO, 2008; CAPITELLI; CROSTA, 2013). As funções específicas dos eosinófilos e basófilos ainda são incertas nas aves, porém ambos são associados às reações de hipersensibilidade, enquanto suspeita-se que os eosinófilos estão relacionados às infecções parasitárias (KIESECKER, 2002; MITCHELL; JOHNS, 2008). Enquanto que função dos monócitos é fagocitar e degradar microrganismos, detritos celulares e células anormais (CAMPBELL, 2015).

Aproximadamente 80% dos leucócitos de aves são compostos pelos heterófilos e linfócitos (RUPLEY, 1997). A proporção entre essas duas células pode variar dependendo da concentração de corticosteróides na circulação (DAVIS et al., 2008; WOJCZULANIS-JAKUBAS et al., 2015). Altos níveis de corticosteróides na circulação promovem maior demanda de heterófilos que predominará em relação aos linfócitos, afetando assim a razão entre heterófilos:linfócitos (H:L), que é considerado um parâmetro indicativo de leucograma de estresse (GROSS; SIEGEL, 1983; DAVIS et al., 2008). O principal hormônio corticosteróide liberado em situações de estresse nas aves é a corticosterona. A produção e liberação é feita pelas glândulas adrenais em

resposta a eventos estressantes, resultando em heterofilia (MOAWAD E RANDA 2017).

A relação H:L é uma opção confiável para estimar o estresse, aplicabilidade em questões ecológicas, pouco oneroso, de possível realização em animais de porte pequeno, e mesmo com isso, poucas aves brasileiras foram estudadas e tem suas relações H:L estabelecidas (Ribeiro et al. 2020). Desta forma, o objetivo desse estudo consistiu em analisar pela primeira vez o perfil leucocitário e estabelecer a proporção H:L de cardeais-amarelos (*Gubernatrix cristata*) de vida livre do Parque Estadual do Espinilho e cativos do PCCA.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local do estudo

O estudo foi realizado na Unidade de Conservação Parque Estadual do Espinilho (30° 12' S; 57° 30' W), localizada no município de Barra do Quaraí, estado do Rio Grande do Sul; e nos mantenedores de fauna pertencentes ao PCCA, localizados nos municípios de Pomerode (ZooPomerode) no estado de Santa Catarina, Foz do Iguazu (Parque da Aves) no Paraná e em Gramado (GramadoZoo) no Rio Grande do Sul.

4.2.2 Passeriformes

4.2.2.1 Silvestres

Foram avaliados três cardeais-amarelos de vida livre em fevereiro (1 cardeal-amarelo) e dezembro (2 cardeais-amarelos) de 2019, durante duas expedições de campo. Para captura dos cardeais-amarelos foi realizada busca ativa nos territórios através do método de playback (atração sonora com o canto da ave), utilizando redes de neblina de 12 m de comprimento e 2,5 m de altura (malha de 16 mm). Os indivíduos capturados foram acondicionados por alguns minutos em sacos de contenção individuais para posterior processamento (coleta de material biológico e anilhamento), sendo soltos imediatamente após sua manipulação.

4.2.2.2 Cativos

Os cardeais-amarelos cativos do PCCA foram avaliados entre julho de 2018 e junho de 2019. Foram avaliados 31 indivíduos, sete eram provenientes do ZooPomerode, 17 do Parque das Aves e sete do GramadoZoo.

4.2.3 Coleta de amostras

Amostras de sangue dos cardeais-amarelos foram obtidas por punção da veia ulnar e imediata coleta da gota de sangue com capilar de microhematócrito, utilizando luvas descartáveis sem talco. Foram coletados no máximo 1% do peso corporal de sangue de cada indivíduo, utilizando agulhas descartáveis (12,7 x 0,33 mm). Imediatamente após as coletas foram realizadas as extensões sanguíneas.

4.2.4 Exames laboratoriais

As extensões sanguíneas foram coradas pela técnica de May Grünwald-Giemsa no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR. A contagem diferencial de leucócitos (100 células) foi realizada nas extensões sanguíneas coradas, em microscópio óptico em objetiva de imersão (100X). Os leucócitos foram avaliados quanto à imaturidade (heterófilos bastonetes).

4.3 RESULTADOS

No presente estudo, foram avaliados três cardeais-amarelos silvestres e 31 cardeais-amarelos cativos, sendo sete provenientes do ZooPomerode, 17 do Parque das Aves e sete do GramadoZoo. Os parâmetros leucocitários dos cardeais-amarelos silvestres estão apresentados na Tabela 1 e os parâmetros leucocitários dos cardeais-amarelos do PCCA estão na Tabela 2. Os parâmetros leucocitários de todos os indivíduos estão no ANEXO 7.4.

TABELA 1. PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS EM CARDEAIS-AMARELOS SILVESTRES DO PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO - RS, 2019.

	Cardeal-amarelo 1	Cardeal-amarelo 2	Cardeal-amarelo 3
Heterófilos (%)	23	17	39
Bastonetes (%)	0	0	0
Linfócitos (%)	27	45	40
Eosinófilos (%)	1	11	2
Monócitos (%)	20	11	6
Basófilos (%)	29	16	16
Heterófilos:Linfócitos	0,85	0,38	0,98

TABELA 2. PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS EM CARDEAIS-AMARELOS DO PCCA (ZOOPOMERODE-SC, PARQUE DAS AVES-PR E GRAMADOZOO-RS), 2018 E 2019.

	ZooPomerode SC (7)	Parque das Aves PR (17)	GramadoZoo RS (7)	PCCA (31)
Heterófilos (%)				
(máx.-min.)	26-41	6-66	12-34	6-66
Bastonetes (%)				
(máx.-min.)	0-1	0-1	0-1	0-1
Linfócitos (%)				
(máx.-min.)	22-39	12-57	23-70	12-70
Eosinófilos (%)				
(máx.-min.)	2-24	0-24	0-3	0-24
Monócitos (%)				
(máx.-min.)	3-20	3-48	4-16	3-48
Basófilos (%)				
(máx.-min.)	7-27	0-34	6-26	0-34
Heterófilos:Linfócitos				
(média)	1,11	1,11	0,69	0,97

4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, os valores da relação H:L apresentaram diferenças entre os animais e seus ambientes. Os cardeais-amarelos são territorialistas e precisam de grandes áreas para seu sucesso reprodutivo (BEIER et al., 2017) e bem-estar. Os indivíduos cativos avaliados no presente estudo estavam em ambientes completamente diferentes do seu habitat natural, em viveiros ou gaiolas, próximos uns aos outros, que gera competição por território (por meio do canto dos machos), além do contato com seres humanos e animais de outras espécies, e alguns em condições climáticas que não ocorrem em ambiente natural, aumentando assim o estresse. Estudos recentes realizados com soldadinhos (*Antilophia galeata*) de vida livre do cerrado sugeriram que a reprodução e a antropização são fatores causadores de alteração no perfil leucocitário desses passeriformes, demonstrando estresse nos indivíduos (RIBEIRO et al. 2020).

Machado-Filho et al. (2010) verificaram que guaracavas-de-topete-uniforme (*Elaenia cristata*) e chibum (*Lesser elaenia*) apresentaram maior valor da razão H:L durante a estação seca em um ambiente de Cerrado, e os autores atribuíram esse estresse a escassez de alimento. Em outro estudo recente com pinguins (*Pygoscelis antarctica*), Palacios et al. 2017 evidenciaram maior proporção de leucócitos nos indivíduos que estavam passando por muda de pena quando comparados aos que não estão. No presente estudo a razão H:L encontrada nos cardeais-amarelos variaram de 0,38 a 1,11, enquanto que Machado-Filho et al. (2010) encontraram valores bem superiores para duas espécies de vida livre, onde a razão H:L média das guaracavas foi 8,0 e dos chibums 3,7.

No presente estudo os indivíduos de vida livre sofrem forte pressão antrópica, devido à redução do seu bioma natural. Bauerová et al. 2017 verificaram as razões H/L e a quantidade de contaminação por chumbo, cádmio, cobre e crômio presente nas penas de chapins-reais (*Parus major*) correlacionaram-se positivamente. Brown et al. 1997 afirmam que a poluição atmosférica causa estresses às aves, pois podem absorver facilmente gases ou partículas do ar, devido a necessidade de grandes volumes de ar para o voo.

A relação média H:L dos cardeais-amarelos cativos avaliados foi superior à dos indivíduos de vida livre, respectivamente eles apresentaram H:L média de 0,97, enquanto que os indivíduos de vida livre apresentaram razão H:L média de 0,74. Tais valores sugerem que as alterações abruptas pelas quais essas aves passaram, no seu habitat, podem ser fatores estressantes que desencadearam uma maior liberação e concentração de glicocorticóides na circulação sanguínea, resultando em mais heterófilos circulantes.

Perfis leucocitários podem ser considerados uma ferramenta útil para abordar questões ecológicas que são relevantes para a conservação de espécies em ambientes degradados. Mais estudos são encorajados para aumentar o banco de dados de saúde desses indivíduos, contribuindo para ações de conservação.

4.5 CONCLUSÃO

O presente trabalho foi o primeiro a examinar os parâmetros leucocitários de cardeais-amarelos de vida livre e de cativeiro, e considerando a ameaça de extinção da espécie, servirá de ferramenta para o entendimento da associação do estresse agudo com medidas de conservação e reintrodução na natureza.

REFERENCIAS

AMMERSBACH, M., BEAUFRÈRE, H., ROLLICK, A. G., & TULLY, T. (2015a). Laboratory blood analysis in Strigiformes-part I: hematologic reference intervals and agreement between manual blood cell counting techniques. **Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, 44(1), 94- 108. doi: 10.1111/vcp.12229.

AMMERSBACH, M., BEAUFRÈRE, H., ROLLICK, A. G., & TULLY, T. (2015b). Laboratory blood analysis in Strigiformes-Part II: plasma biochemistry reference intervals and agreement between the Abaxis Vetscan V2 and the Roche Cobas c501. **Veterinary Clinical Pathology**, 44(1), 128-140. doi: 10.1111/vcp.12230.

BAUEROVÁ, P.; VINKLEROVÁ, J.; HRANÍČEK, J.; ČORBA, V.; VOJTEK, L.; SVOBODOVÁ, J.; VINKLER, M. Associations of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species. **Science of The Total Environment**, v. 601, n. 1, p. 1556-1565, 2017.

BEIER, C., REPENNING, M., PEREIRA, M., PEREIRA, A., & FONTANA, C.) Cooperative breeding and demography of Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata* in Brazil. **Revista Brasileira De Ornitologia - Brazilian Journal Of Ornithology**, 25(1), 12-19, 2017.

BROWN, R. E.; BRAIN, J. D.; WANG, N. The avian respiratory system: a unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 2, p. 188-200, 1997.

CAMPBELL, T. W. Hematology of birds. In: THRALL, M. A. (Ed.) *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 225-257. 2004

CAMPBELL, T. W. **Exotic animal hematology and cytology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 402p. 2015.

CÂNDIDO, M. V. **Hematologia, bioquímica sérica e nutrição em aves: Cracidae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, 38f. 2008.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 71-120, 2013.

DAVIS, A. K., MANEY, D. L., & MAERZ, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, 22(5), 760-772. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.

DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A.; KAISER, P. **Avian Immunology**. Oxford: Academic Press, 482p. 2008.

FAIRBROTHER, A.; M.A. CRAIG; K. WALKER & D. O'LOUGHLIN. 1990. Changes in mallard (*Anas platyrhynchos*) serum chemistry due to age, sex, and reproductive condition. **Journal of Wildlife Diseases** 26: 67-76.

FERNANDES, D. C; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSSO, P. F.; LOUREIRO, B. A. Biologia do sistema imune de aves. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 5, p. 131-140, 2013.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varela, 206 p. 2005.

GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Diseases**, v. 27, n. 4, p. 972-979, 1983.

KIESECKER, J. M. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 15, p. 9900-9904, 2002.

KILGAS, P.; R. MAND; M. MAGI & V. TILGAR. 2006. Hematological parameters in brood-rearing great tits in relation to habitat, multiple breeding and sex. **Comparative Biochemistry and Physiology** 114: 224-231.

MACHADO-FILHO, R. A.; BALSAMÃO, G. M.; MARINI, M. Â. Seasonal differences in immune profiles and body conditions of migratory and permanent resident neotropical flycatchers. **The Condor**, v. 112, n. 3, p. 579-590, 2010.

MAXWELL, M.H. 1993. Avian blood leukocyte responses to stress. **World Poultry Science** 49: 34-43.

MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n.3, p. 501-522, 2008.

MOAWAD, U. K. & RANDA, M. H. Histocytological and histochemical features of the adrenal gland of Adult Egyptian native breeds of chicken (*Gallus Gallus domesticus*). Beni-Suef Univ. **J. Basic Appl. Sci.** 6, 199–208 (2017).

MORENO, J.; S. MERINO; J.J. SAZ & E. ARRIERO. 2002. An indicator of maternal stress immunity in Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus*. **Annales Zoologici Fennici** 38: 111-116

RIBEIRO, P. V. A., BAESSE C. Q., CURY M. C. & DE MELO C. Leukocyte profile of the helmeted manakin, *Antilophia galeata* (Passeriformes: Pipridae) in a Cerrado forest fragment. **Zoologia** 37: 1-8, 2020.

WOJCZULANIS-JAKUBAS, K.; JAKUBAS, D.; CHASTEL, O.; KULASZEWICZ, I. A big storm in a small body: seasonal changes in body mass, hormone concentrations and leukocyte profile in the little auk (*Alle alle*). **Polar Biology**, v. 38, p. 1203-12, 2015.

5. CAPÍTULO 4. MICROBIOTA CLOACAL E DE OROFARINGE DE CARDEAIS-AMARELOS (*Gubernatrix cristata*) SILVESTRES E CATIVOS NO BRASIL

RESUMO

O cardeal-amarelo, *Gubernatrix cristata* (Vieillot, 1817), está criticamente ameaçado de extinção no Brasil, onde restam cerca de 50 indivíduos de vida livre. Informações sobre a microbiota dessas aves são importantes para avaliação sanitária dos indivíduos cativos e silvestres, embasando planos de conservação. O presente estudo avaliou a microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos silvestres do Parque Estadual do Epinilho e do Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo (PCCA). Foram coletadas amostras de microbiota cloacal e de orofaringe de 30 cardeais-amarelos cativos e três cardeais-amarelos silvestres. As amostras foram obtidas utilizando suabes uretrais estéreis, armazenadas em meio Stuart e acondicionadas entre 2 a 8° C imediatamente após a coleta. As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório da Estação Ecológica de Carijós/ICMBio seguindo metodologia padronizada. Para identificação das enterobactérias foi utilizado o kit comercial API®20E (bioMérieux) seguindo as instruções do fabricante. Das amostras coletadas de cardeais-amarelos cativos e silvestres foram isoladas 152 colônias de bactérias. Nos cardeais-amarelos silvestres e de cativeiro a predominância de crescimento nas culturas foi de bactérias gram-negativas, sendo de 55,6% e 76,6% respectivamente. As enterobactérias isoladas em cardeais-amarelos silvestres foram: *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Cronobacter* sp. e *Enterobacter cloacae*. Nos cardeais-amarelos cativos foram identificadas: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Raoultella ornithinolytica*, *Cronobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia plymuthica*, *Pantoea* sp., *Pseudomonas oryzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia odorifera*, *Serratia rubidaea*, *Escherichia hermannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Kluyvera* sp., *Aeromonas salmonicida*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia* sp., *Pseudomonas luteola* e *Ochrobactrum anthropi*. A avaliação da microbiota oral e cloacal dos cardeais-amarelos deste estudo possibilitou a obtenção de dados ainda não descritos para a espécie, fornecendo informações da saúde atual de uma

população selecionada e um ponto de referência para futuras avaliações e interpretações de resultados laboratoriais em planos de conservação.

Palavras-chave: bactéria, campos sulinos, passeriformes, conservação, microbiologia.

5.1 INTRODUÇÃO

As aves são susceptíveis a várias doenças, sendo importante o conhecimento sobre espécies, anatomia e manejo para entender a sua susceptibilidade aos diferentes tipos de enfermidades. Nas aves de vida livre há influência do fator ambiental, porque as doenças variam de acordo com o habitat (SHIVAPRASAD, 2002). Devido o potencial risco de infecções por microrganismos, os estudos microbiológicos nos pássaros silvestres e são de extrema importância para reduzir doenças emergentes e contribuir com a conservação da biodiversidade (BRACONARO, 2015).

Apesar de existirem poucos dados sobre o assunto, tem sido observado que a microbiota entérica de passeriformes em vida livre é composta principalmente por bacilos e cocos gram-positivos (GLÜNDER, 1981; HARRISON; MCDONALD, 2006). Em contraste, a colonização do trato gastrointestinal por bactérias gram-negativas é mais comum quando as aves estão em cativeiro (BENSKIN et al., 2009).

Algumas espécies da Ordem Passeriformes, principalmente as apreendidas por captura ilegal e mantidas em centros de reabilitação, são incluídas em estudos de prevalência de doenças (BRAZ et al., 2014; GOMES et al., 2010; LIMA et al., 2011). Entretanto, considerando que vários microrganismos considerados de risco infectam as aves sem causar doença e também a grande quantidade de espécies de passeriformes no país, há iminente necessidade de aumentar o número de aves avaliadas para ampliar a base de dados de ocorrência das doenças e dos microrganismos. Em aves de

produção existem mais dados sobre a ocorrência e fatores de risco associados aos diferentes tipos de microrganismos (DE SÁ et al., 2015).

A reintrodução de aves apreendidas do tráfico na natureza pode disseminar patógenos que representam uma ameaça à biodiversidade, à saúde pública e a produção agrícola (SMITH et al., 2009). No Brasil, estima-se que 78% dos animais apreendidos sejam devolvidos à natureza sem critérios sanitários (GODOY; MATUSHIMA, 2010).

Em estudos prévios realizados com aves marinhas foram isoladas bactérias gram-negativas com potencial zoonótico tanto de aves saudáveis quanto doentes, essas bactérias incluíam *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. Com exceção dos últimos dois agentes etiológicos, que não causam doença em condições normais, as demais são responsáveis por gastroenterites, sintomas respiratórios, septicemia e até mortalidade em humanos (BENSKIN et al., 2009).

O presente estudo realizou pela primeira vez uma avaliação da microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos silvestres do Parque Estadual do Espinilho e cativos do PCCA.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local do estudo

O estudo foi realizado na Unidade de Conservação Parque Estadual do Espinilho (30° 12' S; 57° 30' W), localizada no município de Barra do Quaraí, estado do Rio Grande do Sul; e nos mantenedores de fauna pertencentes ao PCCA, localizados nos municípios de Pomerode (ZooPomerode), no estado de Santa Catarina; Foz do Iguaçu (Parque da Aves), no estado do Paraná e no município de Gramado (GramadoZoo), no estado do Rio Grande do Sul.

5.2.2 Passeriformes

Os cardeias-amarelos de vida livre (3) avaliados foram capturados em fevereiro e dezembro de 2019, durante duas expedições de campo, com a colaboração de equipe multidisciplinar de pesquisadores e em parceria com o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE/ICMBio), engajados na implementação do “Plano de Ação Nacional para Conservação das Aves dos Campos Sulinos”. As capturas foram realizadas através da busca ativa nos territórios utilizando o método de playback (atração sonora com o canto da ave). Os passeriformes capturados foram acondicionados por alguns minutos em sacos de contenção individuais para posterior processamento (coleta de material biológico e anilhamento), sendo soltos imediatamente após sua manipulação.

Os cardeais-amarelos de cativeiro foram avaliados entre julho de 2018 e junho de 2019. Dos 30 indivíduos cativos, seis eram provenientes do ZooPomerode, 17 do Parque das Aves e sete do GramadoZoo.

5.2.3 Coleta de amostras

Foram realizadas coletas de microbiota cloacal e de orofaringe dos 33 cardeais-amarelos utilizando suabes uretrais estéreis, utilizando luvas descartáveis sem talco, armazenadas separadamente em meio Stuart e acondicionadas entre 2 e 8° C imediatamente após a coleta, por até 48 horas até processamento no laboratório.

5.2.4 Exames laboratoriais

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Análise da Água e Microbiologia da Estação Ecológica de Carijós do ICMBio. As amostras foram semeadas em caldo BHI (*brain heart infusion*) e em caldo Rappaport-Vassiliadis, foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa. Posteriormente, foram congeladas a -20°C com 30 % de glicerina. Quando descongeladas, foram estriadas em placas de petri com ágar sangue, ágar MacConkey e ágar Salmonella Shigella, acondicionadas em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente as colônias que cresceram foram caracterizadas morfológicamente, coradas pela técnica de Gram e testadas para a prova da

catalase. Para identificação das enterobactérias foi utilizado o kit comercial API®20E (bioMérieux, Durham, USA) seguindo as instruções do fabricante.

5.3 RESULTADOS

Dos cardeais-amarelos silvestres (N=3) foram isoladas nove colônias de bactérias (TABELA 1), sendo quatro (44,4%) de bactérias gram-positivas e cinco (55,6%) de bactérias gram-negativas identificadas como: *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca* (97,3% de identidade), *Cronobacter* spp. (56,2%) e duas identificadas como *Enterobacter cloacae* (>94%), todas isoladas de amostras cloacais. Das amostras avaliadas de cardeais-amarelos silvestres 10 não apresentaram crescimento nas placas.

Dos cardeais-amarelos cativos do ZooPomerode (N=8) foram isoladas 13 colônias de bactérias (TABELA 1), sendo 10 (76,9%) de bactérias gram-positivas e três (23,1%) de bactérias gram-negativas identificadas como *Escherichia coli*, isoladas de amostras de orofaringe. Das amostras avaliadas dos cardeais-amarelos do ZooPomerode 23 não apresentaram crescimento nas placas.

Dos cardeais-amarelos cativos do Parque das Aves (N=15) foram isoladas 103 colônias de bactérias (TABELA 1), sendo 11 (10,7%) de bactérias gram-positivas e 92 (89,3%) de bactérias gram-negativas identificadas como: *Enterobacter cloacae* (33), *Escherichia coli* (14), *Raoultella ornithinolytica* (8), *Cronobacter* spp (9), *Klebsiella pneumoniae* (5), *Pseudomonas aeruginosa* (4), *Serratia plymuthica* (3), *Pantoea* spp (2), *Pseudomonas oryzihabitans* (2), *Stenotrophomonas maltophilia* (2), *Serratia odorifera* (2), *Serratia rubidaea* (1), *Escherichia hermannii* (1), *Klebsiella oxytoca* (1), *Kluyvera* spp (1), *Aeromonas salmonicida* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Proteus mirabilis* (1), *Yersinia* spp. (1). Das amostras avaliadas de cardeais-amarelos do Parque das Aves, 17 não tiveram crescimento nas placas.

Dos cardeais-amarelos cativos do GramadoZoo (N=7) foram isoladas 27 colônias de bactérias (TABELA 1), sendo 14 (51,9%) de bactérias gram-positivas e 13 (48,1%) de bactérias gram-negativas identificadas como:

Pantoea spp. (5), *Escherichia coli* (3), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Klebsiella oxytoca* (1), (1), *Pseudomonas luteola* (1) e *Ochrobactrum anthropi* (1). Das amostras avaliadas de cardeais-amarelos do GramadoZoo, 21 não tiveram crescimento nas placas.

De todas as colônias isoladas (N=152) resultantes de suabes de orofaringe e cloacais no trabalho, a predominância foi de colônias gram-negativas, correspondendo a 74,3% (N=113) do total (TABELA 1), enquanto que as bactérias gram-positivas foram isoladas em 25,7% (N=39) das placas.

TABELA 1. CRESCIMENTO MICROBIANO DAS AMOSTRAS DE MICROBIOTA CLOACAL E DE OROFARINGE DE CARDEAIS-AMARELOS CATIVOS E DE VIDA LIVRE DO PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO, COLETAS DE FEVEREIRO E DEZEMBRO DE 2019.

	Local do estudo	Total de placas	Colônias Isoladas	Gram-positivas	Gram-negativas	Sem crescimento
	GramadoZoo	48	27	14	13	21
Cativeiro	ZooPomerode	36	13	10	3	23
	Parque das Aves	120	103	11	92	17
Vida livre	Parque Estadual do Espinilho	19	9	4	5	10
	Total	223	152	39	113	71
	(%)	100%	68,2%	17,5%	50,1%	31,8%

5.4 DISCUSSÃO

As populações microbianas encontradas dentre os diferentes habitats avaliados do cardeal-amarelo diferiram bastante. As colônias isoladas dentre os mantenedores de fauna diferiram na predominância de colônias gram-positivas e gram-negativas assim como não foram semelhantes entre os cardeais-amarelos de vida livre do Parque do Espinilho avaliados no estudo. Ao todo 223 placas foram avaliadas sendo que foi identificado crescimento em 152 delas, representando um percentual de 68,2% de crescimento, valor

semelhante ao encontrado por Braconaro et al. (2015) que obtiveram taxa de crescimento de 62,5%.

No presente estudo foram isolados 15 diferentes gêneros bacterianos, sendo eles (*Aeromonas spp.*, *Cronobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia sp.*, *Klebsiella spp.*, *Kluyvera spp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Pantoea spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Raultella spp.*, *Serratia spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Yersinia spp.*). Braconaro et al. (2015) realizaram um estudo em São Paulo, Brasil, no qual foram coletados suábies cloacais de 253 passáros de vida livre apreendidos do tráfico ilegal de animais de várias espécies, os quais eram destinadas à reintrodução, nesse estudo foram isolados 15 diferentes gêneros bacterianos; (*Acinetobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia sp.*, *Klebsiella spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus spp.*, and *Streptococcus spp.*).

Foi identificado um total de 20 colônias de *E. coli*, o que representa 13,5% de todas as colônias, tal achado apresenta uma disparidade grande quando comparado ao estudo realizado por Gaio et al. (2019), no qual registraram uma taxa de isolamento de 40,8% (49/120) em passeriformes silvestres resgatados do tráfico no estado do Ceará. Enquanto que esse valor se assemelha muito ao encontrado por Braconaro et al. (2015), no qual os autores constataram 10,7% de isolamento de *E. coli* em passeriformes mantidos em um centro de reabilitação em São Paulo.

Klebsiella sp., *Enterobacter sp.* e *Citrobacter sp.* são patógenos pertencentes a família Enterobacteriaceae conhecidos na clínica de aves por causarem infecções respiratórias ou gastrintestinais (BENSKIN et al., 2009). No atual estudo foram isoladas e identificadas colônias pertencentes a essas famílias de Enterobacteriaceae. Godoy e Matushima (2010) relataram infecções por esses agentes como causa de morte de passeriformes apreendidos do tráfico de animais silvestres

Estudos sobre avaliação microbiológica cloacal e/ou de orofaringe de aves de vida livre são escassos e essa é a primeira avaliação de microbiota

cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos. É importante que sejam realizados mais estudos avaliando aves antes e após a reintrodução em seu *habitat* e alterações que existem nas microbiotas.

5.5 CONCLUSÃO

A investigação da microbiota cloacal e de orofaringe dos cardeais-amarelos de vida livre do Parque Estadual do Espinilho e do PCCA estudados, contempla ações previstas no PAN para a Conservação das Aves dos Campos Sulinos, iniciativas para reverter o estado crítico de ameaça destas espécies. O estudo apresenta a situação sanitária parcial dessas aves e além fornecer dados para estabelecer parâmetros normais ainda não existentes para a espécie. O presente trabalho contribui para o estabelecimento do potencial de soltura e revigoração/reintrodução dos cardeais-amarelos mantidos em cativeiro.

REFERÊNCIAS

BENSKIN, C. M. H.; WILSON, K.; JONES, K.; HARTLEY, I. R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. **Biological Reviews**, v. 89, p. 349-373, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00076.x>

BRACONARO, P.; SAIDENBERG, B.S.; BENITES, N.; ZUNIGA, E.; SILVA, A.M.J.; SANCHES, T.; ZWARG, T.; BRANDÃO, P.E.; MELVILLE, P.A. Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 65-72, 2015.

BRAZ, M.A.; SILVA, D.C.; SANTIAGO, M.E.B.; GARCIA, S.D. NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, M.V. Detecção e classificação molecular de *Chlamydophila psittaci* em amostras fecais de aves assintomáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 161-167, 2014.

DE SÁ, S.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; VILELA, S.M.O.; MORAES, E. P.B.X.; ALBUQUERQUE, P.P.F.; FERREIRA, D.R.A.; MOTA, R. A. Occurrence and risk factors assessment associated with *Mycoplasma gallisepticum* (MG) infection in chickens in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p.531-535, 2015.

GAIO, F. C., LOPES, E. S., LIMA, B. P., CARMO, C. C., MARQUES, A. R., OLIVEIRA, F. R., FILHO, N. M. P., CARREIRA, A. S., HAVT, A., & MACIEL, W. C. Bactérias zoonóticas isoladas de Passeriformes silvestres recuperados do

tráfico de animais no estado do Ceará / Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 5, p. 1488–1496, 2019.

GLÜNDER, G. Occurrence of Enterobacteriaceae in feces of granivorous passeriforme birds. **Avian Diseases**, v. 25, n. 1, p. 195-198, 1981. doi: <http://dx.doi.org/10.2307/1589841>.

GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R. A survey of diseases in passeriform birds obtained from illegal wildlife trade in Sao Paulo city, Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 3, p. 199-209, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1647/2009-029.1>.

HARRISON, G. J.; MCDONALD, D. Nutritional considerations section II: nutritional disorders. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. (Eds.). **Clinical avian medicine**. 1 st ed. Palm Beach, FL: Spix Publishing, 2006. p. 109-140.

LIMA, V.Y.; LANGONI, H.; SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; DE CASTRO, A.P.; DA SILVA, R.C.; ARAÚJO JR, J.P. Chlamydophila psittaci and Toxoplasma gondii infection in pigeons (Columba livia) from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 9-14, 2011.

SHIVAPRASAD H.L. **Pathology of birds** – an overview. Presented at the C.L. Davis Foundation Conference on Gross Morbid Anatomy of Animals, AFIP, Washington DC, 2002.

SMITH, K. F.; BEHRENS, M.; SCHLOEGEL, L. M.; MARANO, N.; BURGIEL, S.; DASZAK, P. Reducing the risks of the wildlife trade. **Science**, v. 324, n. 5927, p. 594- 595, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1174460>.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro estudo para o estabelecimento de um perfil de saúde para o cardeal-amarelo no Brasil, com determinação de parâmetros leucocitários e pesquisa de agentes infecciosos, fornecendo resultados extremamente importantes e valiosos para apoiar o manejo de conservação dessa espécie criticamente ameaçada de extinção e outros passeriformes ameaçados do bioma Pampa.

A pesquisa contemplou parte das metas do “Plano de Ação Nacional para a Conservação das Aves dos Campos Sulinos”, elaborado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, uma autarquia em regime especial vinculada ao Ministério do Meio Ambiente, cujo objetivo é melhorar o estado de conservação das espécies alvo do PAN; bem como atividades previstas no “Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo” que tem como objetivo estabelecer populações cativas viáveis representativas da população brasileira para contemplar programas de revigoramento e reintrodução, avaliando os cardeais-amarelos *in situ* e *ex situ*.

Esse estudo detectou *Trypanosoma* sp. em um cardeal-amarelo pela primeira vez. A identificação de Adenovirus em um cardeal-amarelo de cativeiro é um indicativo que o vírus pode estar circulante no ambiente e ainda infectar contactantes. A alta prevalência de microfilárias enfatiza a importância de mais estudos sobre a patogenicidade desses parasitas e tratamento para essas infecções em candidatos a liberação. As avaliações leucocitárias fornecem dados importantes a fim de comparar o grau de estresse desses passeriformes através da relação H/L, os cardeais-amarelos de vida livre apresentaram valores que sugerem menor estresse. As pesquisas realizadas fornecem parâmetros como base de comparação para futuras.

Os resultados orientam e instruem os gestores desta área protegida para a tomada de decisões e priorização de ações de conservação, subsidiando também o manejo *ex-situ* e *in-situ*, visando à conservação desta espécie; além de elucidar o estado atual de conservação destas aves (tamanhos populacionais, territórios, qualidade e extensão do ambiente disponível, etc).

Recomendamos estudos adicionais e o contínuo monitoramento da população brasileira de cardeais-amarelos e das populações de aves ameaçadas na região da formação vegetal parque espinilho, o ideal seria a realização de pelo menos duas expedições anuais. O incremento de mais membros na equipe, somando-se mais um veículo para o trabalho de campo, são importantes para permitir o aumento do esforço de busca ativa e prospecção.

REFERÊNCIAS

- Absalón A.E., Morales-Garzón A., Vera-Hernández P.F., Cortés-Espinosa D.V., Uribe-Ochoa S.M., García L.J. & Lucio-Decanini E. 2017. Complete genome sequence of a non-pathogenic strain of Fowl Adenovirus serotype 11: minimal genomic differences between pathogenic and nonpathogenic viruses. *Virology* 501:63-69. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.006>> <PMid:27865971>
- AMMERSBACH, M., BEAUFRÈRE, H., ROLLICK, A. G., & TULLY, T. (2015a). Laboratory blood analysis in Strigiformes-part I: hematologic reference intervals and agreement between manual blood cell counting techniques. *Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 44(1), 94- 108. doi: 10.1111/vcp.12229.
- AMMERSBACH, M., BEAUFRÈRE, H., ROLLICK, A. G., & TULLY, T. (2015b). Laboratory blood analysis in Strigiformes-Part II: plasma biochemistry reference intervals and agreement between the Abaxis Vetscan V2 and the Roche Cobas c501. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(1), 128-140. doi: 10.1111/ vcp.12230.
- ARAÚJO, F.A.A. Febre do Nilo Ocidental. Capítulo 58. P.1250 In Cubas, Z.; Silva, J.C.R.; Catão-Dias J.L. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. 2.ed. São Paulo:Roca. 2470 pp., 2014.
- Araujo J., Azevedo Júnior S.M., Gaidet N., Hurtado R., Walker D., Thomazelli L.M., Ometto T., Seixas M.M.M., Rodrigues R., Galindo D.B., Silva A.C.S., Rodrigues A.M.M., Bomfim L.L., Mota M.A., Larrazábal M.E., Branco J.O., Serafini P., Neto I.S., Franks J., Webby R.J., Webster R.G. & Durigon E.L. 2014. Avian influenza virus (H11N9) in migratory shorebirds wintering in the Amazon Region, Brazil. *PLoS One* 9(10):e110141. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0110141>> <PMid:25329399>
- Araujo J., Petry M.V., Fabrizio T., Walker D., Ometto T., Thomazelli L.M., Scherer A.L., Serafini P.P., Neto I.S., Krauss S., Webster R.G., Webby R.J. & Durigon E.L. 2018. Migratory birds in southern Brazil are a source of multiple avian influenza virus subtypes. *Influenza Other Respir. Viruses* 12(2):220231. <<https://dx.doi.org/10.1111/irv.12519>> <PMid:29143465>
- Asthana M., Chandra R. & Kumar R. 2013. Hydropericardium syndrome: current state and future developments. *Arch. Virol.* 158(5):921-931. <<https://dx.doi.org/10.1007/s00705-012-1570-x>> <PMid:23242777>
- Atawal AF, Mgbeahuruike AC, Hammers M (2019) Microfilarial infections associated with body mass loss of Village Weavers *Ploceus cucullatus*. *Ostrich* 90:41–44. <https://doi.org/10.2989/00306525.2018.1539418>
- Azpiroz A.B. 2012. *Aves de las Pampas y Campos de Argentina, Brasil y Uruguay: una guía de identificación*. Pressur, Nueva Helvecia, Uruguay.
- AZPIROZ A.B., ALFARO M. & JIMÉNEZ S. *Lista roja de las aves del Uruguay: una evaluación del estado de conservación de la avifauna nacional con base en*

los criterios de la Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza. Montevideo: Dirección Nacional de Medio Ambiente, 2012.

BAUEROVÁ, P.; VINKLEROVÁ, J.; HRANÍČEK, J.; ČORBA, V.; VOJTEK, L.; SVOBODOVÁ, J.; VINKLER, M. Associations of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species. *Science of The Total Environment*, v. 601, n. 1, p. 1556-1565, 2017.

BECKMANN, KM; BOREL, N.; POCKNELL, AM; DAGLEISH, MP; SACHSE, K.; JOHN, SK; POSPISCHIL, A.; CUNNINGHAM, AA; LAWSON, B. Chlamydiosis in British Garden Birds (2005-2011): Retrospective diagnosis and Chlamydia psittaci genotype determination. *Ecohealth*, v. 11, n. 4, p. 544-563, 2014.

BEIER, C; FONTANA, C. S. Breeding biology of the endangered Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata* in Brazil. *Revista Brasileira de Ornithologia - Brazilian Journal of Ornithology*, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 44-52, jul. 2019. ISSN 2178-7875.

BEIER, C., REPENNING, M., PEREIRA, M., PEREIRA, A., & FONTANA, C.) Cooperative breeding and demography of Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata* in Brazil. *Revista Brasileira De Ornithologia - Brazilian Journal Of Ornithology*, 25(1), 12-19, 2017.

Bello M.B., Yusoff K., Ideris A., Hair-Bejo M., Peeters B. & Omar A.R. 2018. Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle disease virus in poultry: the current and emerging perspectives. *BioMed Res. Int.* 2018(4):1-18. <<https://dx.doi.org/10.1155/2018/7278459>> <PMid:30175140>

BELTON, W. Aves do Rio Grande do Sul: Distribuição e biologia. São Leopoldo: Ed. UNISINOS. 1994. BLANCO, J.M.; WILDT, D.E.; HOFLE, U. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, v. 71, p. 200-213, 2009.

Bennett GF, Caines JR, Whiteway MA (1986) Avian Haemoproteidae. 20. The haemoproteids of the avian families Apodidae (swifts), Bucconidae (puffbirds), and Indicatoridae (honeyguides). *Can J Zool* 64:766–770. <https://doi.org/10.1139/z86-113>

Bennett GF, Campbell A (1972) Avian Haemoproteidae. I. Description of *Haemoproteus fallisi* n. sp. and a review of the haemoproteids of the family Turdidae. *Can J Zool* 50:1269–1275

Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris J (2009) MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Mol Ecol Resour* 9:1353–1358

BENSKIN, C. M. H.; WILSON, K.; JONES, K.; HARTLEY, I. R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews*, v. 89, p. 349-373, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00076.x>

BirdLife International (2022) Species factsheet: Gubernatrix cristata. In: BirdLife Int. Data Zone. <http://datazone.birdlife.org/species/factsheet/yellow-cardinal-gubernatrix-cristata>. Accessed 6 Jun 2022

BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Gubernatrix cristata*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22721578A131888081.en>. Downloaded on 03 October 2021.

BRACONARO, P.; SAIDENBERG, B.S.; BENITES, N.; ZUNIGA, E.; SILVA, A.M.J.; SANCHES, T.; ZWARG, T.; BRANDÃO, P.E.; MELVILLE, P.A. Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. *Microbial Pathogenesis*, v. 88, p. 65-72, 2015.

BRASIL - Plano de Ação Nacional para Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho - PAN Campos Sulinos e Espinilho Portaria nº 214, de 8 de julho de 2009. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, 212. 2009. Legislação Federal.

BRAZ, M.A.; SILVA, D.C.; SANTIAGO, M.E.B.; GARCIA, S.D. NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, M.V. Detecção e classificação molecular de *Chlamydophila psittaci* em amostras fecais de aves assintomáticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 1, p. 161-167, 2014.

BROWN, R. E.; BRAIN, J. D.; WANG, N. The avian respiratory system: a unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality. *Environmental Health Perspectives*, v. 105, n. 2, p. 188-200, 1997.

Burry-Caines JR, Bennett GF (1992) The Haemoproteidae (Apicomplexa: Haemosporina) of the avian families Fringillidae and Emberizidae s.l. *Can J Zool* 70:1149–1160. <https://doi.org/10.1139/z92-161>

CAMPBELL, T. W. Hematology of birds. In: THRALL, M. A. (Ed.) *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 225-257. 2004

CAMPBELL, T. W. *Exotic animal hematology and cytology*. New Jersey: John Wiley & Sons, 402p. 2015.

CÂNDIDO, M. V. Hematologia, bioquímica sérica e nutrição em aves: Cracidae. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, 38f. 2008.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, v. 16, n. 1, p. 71-120, 2013

Caron A., Cappelle J. & Gaidet N. 2017. Challenging the conceptual framework of maintenance hosts for influenza A viruses in wild birds. *J. Appl. Ecol.* 54(3):681-690. <<https://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.12839>>

CHAZAR, A.; LOISEAU, C.; VALKIUNAS, G.; IEZHOVA, T.; SMITH, T. B.; SEHGAL, R. N. M. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Molecular Ecology*, v. 18, p. 4121-4133, 2009.

Chmielewicz B., Goltz M. & Ehlers B. 2001. Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Res.* 75(1):87-94. <[https://dx.doi.org/10.1016/s0168-1702\(00\)00252-5](https://dx.doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00252-5)> <PMid:11311431>

Clark NJ, Adlard RD, Clegg SM (2015) Molecular and morphological characterization of *Haemoproteus (Parahaemoproteus) ptilotis*, a parasite infecting Australian honeyeaters (Meliphagidae), with remarks on prevalence and potential cryptic speciation. *Parasitol Res* 114:1921–1928

CLYDE, V. L.; PATTON, S. Diagnosis, Treatment, and Control of Common Parasites in Companion and Aviary Birds, *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v. 5, n. 2 p. 75-84, 1996 CLSI - CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Document M100-S22 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Informational Supplement. Twenty-Second. v.32, n.3, 184p., 2012.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

DAVIS, A. K., MANEY, D. L., & MAERZ, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760-772. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.

DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A.; KAISER, P. *Avian Immunology*. Oxford: Academic Press, 482p. 2008.

De La Torre GM, Campião KM (2021) Bird habitat preferences drive hemoparasite infection in the Neotropical region. *Integr Zool* 16:755–768. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12515>

De la Torre D., Nuñez L., Santander Parra S.H., Astolfi-Ferreira C.S. & Piantino Ferreira A.J. 2018. Molecular characterization of fowl adenovirus group I in commercial broiler chickens in Brazil. *Virusdisease* 29(1):83-88. <<https://dx.doi.org/10.1007/s13337-018-0430-z>> <PMid:29607363>

DE MATOS, R.; MORRISEY, J.K. Emergency and critical care of small psittacines and passerines. *Seminars in avian and exotic pet medicine*, v. 14, n. 2, p. 90-105, 2005.

DE SÁ, S.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; VILELA, S.M.O.; MORAES, E. P.B.X.; ALBUQUERQUE, P.P.F.; FERREIRA, D.R.A.; MOTA, R. A. Occurrence and risk factors assessment associated with *Mycoplasma gallisepticum* (MG) infection in chickens in the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 6, p.531-535, 2015.

Dhama, K., V. Gowthaman, K. Karthik, R. Tiwari, S. Sachan, M. A.Kumar, M. Palanivelu, Y. S. Malik, R. K. Singh, and M. Munir. 2017. Haemorrhagic enteritis of turkeys – current knowledge. *Vet. Q.* 37:31–42.

DIAS, R. A. *Gubernatrix cristata*. pp. 536–537. In: Machado, A. B. M.; Drummond, G. M.; & Paglia, A. P. (eds). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: MMA/Fundação Biodiversitas, 2008.

Dimitrov K.M., Ramey A.M., Qiu X., Bahl J. & Afonso C.L. 2016. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infect. Genet. Evol.* 39:22-34. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.008>> <PMid:26792710>

Dimitrov D, Valkiūnas G, Zehtindjiev P, et al (2013) Molecular characterization of haemosporidian parasites (Haemosporida) in yellow wagtail (*Motacilla flava*), with description of in vitro ookinetes of *Haemoproteus motacillae*. *Zootaxa* 3666:369–381

Doussang D, González-Acuña D, Torres-Fuentes LG, et al (2019) Spatial distribution, prevalence and diversity of haemosporidians in the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Parasit Vectors* 12:2. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3243-4>

Doussang D, Sallaberry-Pincheira N, Cabanne GS, et al (2021) Specialist versus generalist parasites: the interactions between host diversity, environment and geographic barriers in avian malaria. *Int J Parasitol* 51:899–911. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.04.003>

Duarte M.A., Silva J.M.F., Brito C.R., Teixeira D.S., Melo F.L., Ribeiro B.M., Nagata T. & Campos F.S. 2019. Faecal virome analysis of wild animals from Brazil. *Viruses* 11(9):803-826. <<https://dx.doi.org/10.3390/v11090803>> <PMid:31480274>

Durrant KL, Beadell JS, Ishtiaq F, et al (2006) Avian Hematozoa in South America: A Comparison of Temperate and Tropical Zones. *Ornithol Monogr* 98–111. <https://doi.org/10.2307/40166831>

EPSTEIN, P. R. Biodiversity, climate change and emerging infectious diseases. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. *Conservation medicine: ecological health in practice*. New York: Oxford University Press, p. 27-39, 2002.

FAIRBROTHER, A.; M.A. CRAIG; K. WALKER & D. O'LOUGHLIN. 1990. Changes in mallard (*Anas platyrhynchos*) serum chemistry due to age, sex, and reproductive condition. *Journal of Wildlife Diseases* 26: 67-76.

Fecchio A, Bell JA, Pinheiro RBP, et al (2019) Avian host composition, local speciation and dispersal drive the regional assembly of avian malaria parasites

in South American birds. *Mol Ecol* 28:2681–2693.
<https://doi.org/10.1111/mec.15094>

FECCHIO, A.; MARINI, M.A.; BRAGA, EM. M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no Cerrado do Brasil Central. *Neotropical Biology and Conservation*, v. 02, p.127-135, 2007.

FECCHIO, A.; LIMA, M.R.; SILVEIRA, P.; BRAGA, EM; MARINI, MA. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. *Emu*, 111; 132-138. 2011.

FERNANDES, D. C; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; LOUREIRO, B. A. Biologia do sistema imune de aves. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v. 17, n. 5, p. 131-140, 2013.

Fitzgerald, S.D., and W.M. Reed. 1989. A review of marble spleen disease of ring-necked pheasants. *J Wildlife Dis.* 25:455–461

FRIEND, M.; THOMAS, N. Disease prevention and control in endangered avian species: Special considerations and needs. *Acts Congressus Internationalis Ornithologici*, v. 20, p. 2331-2337, 1992.

GAIO, F. C., LOPES, E. S., LIMA, B. P., CARMO, C. C., MARQUES, A. R., OLIVEIRA, F. R., FILHO, N. M. P., CARREIRA, A. S., HAVT, A., & MACIEL, W. C. Bactérias zoonóticas isoladas de Passeriformes silvestres recuperados do tráfico de animais no estado do Ceará / Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 71, n. 5, p. 1488–1496, 2019.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. Manual de hematologia veterinária. São Paulo: Varela, 206 p. 2005.

GLÜNDER, G. Occurrence of Enterobacteriaceae in feces of granivorous passeriforme birds. *Avian Diseases*, v. 25, n. 1, p. 195-198, 1981. doi: <http://dx.doi.org/10.2307/1589841>.

GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R. A survey of diseases in passeriform birds obtained from illegal wildlife trade in Sao Paulo city, Brazil. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 24, n. 3, p. 199-209, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1647/2009-029.1>.

GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, v. 27, n. 4, p. 972-979, 1983.

GOMES, A.M.; COSTA, L.L.; VILELA, D.A.R.; MARQUES, M.V.R.; CARVALHAES, A.G.; MARIN, S.Y.; COSTA, M.P.; HORTA, R.S.; RESENDE, J.S.; MARTINS, N.R.S. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.12, p. 75-78, 2010.

González AD, Matta NE, Ellis VA, et al (2014) Mixed species flock, nest height, and elevation partially explain avian haemoparasite prevalence in Colombia. PLoS ONE 9:e100695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100695>

GRELLE, C.E.V.; PAGLIA, A.P.; SILVA, H.S. Análise dos fatores de Ameaça de Extinção: Estudo de caso com os Mamíferos Brasileiros. pp.385-398. In ROCHA, C.F.D., BERGALLO, H.G., SLUYS M.V., ALVES, M.A.S. Biologia da Conservação: Essências. Editora Rima, 582p, 2006.

HARRISON, G. J.; MCDONALD, D. Nutritional considerations section II: nutritional disorders. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. (Eds.). Clinical avian medicine. 1 st ed. Palm Beach, FL: Spix Publishing, 2006. p. 109-140.

Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR (2007) Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Mol Phylogenet Evol 44:15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.023>

Hellgren O, Waldenström J, Bensch S (2004) A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. J Parasitol 90:797–802

Huang Y-L, Tsai S-S, Thongchan D, et al (2017) Filarial nematode infection in eclectus parrots (*Eclectus roratus*) in Taiwan. Avian Pathol 46:188–194. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1237014>

HUBALEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds, Journal of Wildlife Disease, v. 40, p. 639-659, 2004.

Hurtado R. & Vanstreels R.E.T. 2016. Avian influenza in wild birds from South America: review, implications and perspectives. Explor. Res. Hypothesis Med. 1(4):62-74. <<https://dx.doi.org/10.14218/ERHM.2016.00014>>

IBF. Bioma Pampa. Instituto Brasileiro de Florestas. 2020. Disponível em: <<https://www.ibflorestas.org.br/bioma-pampa>>. Acesso em: 03/10/2021,

ICMBio 2018. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Vol.1. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, DF.

Iezhova TA, Valkiūnas G, Loiseau C, et al (2010) *Haemoproteus cyanomitrae* sp. nov.(Haemosporida: Haemoproteidae) from a widespread African songbird, the olive sunbird, *Cyanomitra olivacea*. J Parasitol 96:137–143

JARAMILLO A. 2019. Yellow Cardinal. In: del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J., Christie D.A. & de Juana E. (eds.). Handbook of the birds of the world alive. Barcelona: Lynx Editions. <https://www.hbw.com/node/62098> (Access on 22 April 2019).

Jaramillo, A. 2020. Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*), version 1.0. In Birds of the World (J. del Hoyo, A. Elliott, J. Sargatal, D. A. Christie, and E. de Juana, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA.

Kalthoff D., Globig A. & Beer M. 2010. (Highly pathogenic) avian influenza as a zoonotic agent. *Vet. Microbiol.* 140(3/4):237-245. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.022>> <PMid:19782482>

KIESECKER, J. M. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 15, p. 9900-9904, 2002.

KILGAS, P.; R. MAND; M. MAGI & V. TILGAR. 2006. Hematological parameters in brood-rearing great tits in relation to habitat, multiple breeding and sex. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114: 224-231.

Kim L.M., Suarez D.L. & Afonso C.L. 2008. Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(4):414-425. <doi: 10.1177/104063870802000402> <PMid:18599845>

Kolesnikovas C.K., Niemeyer C., Teixeira R.H., Nunes A.L., Rameh-de-Albuquerque L.C., Sant'Anna S.S. & Catão-Dias J.L. 2012. Hematologic and plasma biochemical values of Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *J. Avian Med. Surg.* 26(3):125-129. <<https://dx.doi.org/10.1647 / 2011-020r1.1>> <PMid:23156973>

Križanauskienė A, Iezhova TA, Palinauskas V, et al (2012) *Haemoproteus nucleococondensus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae) from a Eurasian songbird, the Great Reed Warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Zootaxa* 3441:36–46

Križanauskienė A, Pérez-Tris J, Palinauskas V, et al (2010) Molecular phylogenetic and morphological analysis of haemosporidian parasites (Haemosporida) in a naturally infected European songbird, the blackcap *Sylvia atricapilla*, with description of *Haemoproteus pallidulus* sp. nov. *Parasitology* 137:217–227

Kumar S, Stecher G, Li M, et al (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Laird M, Van Riper C (1981) Questionable reports of *Plasmodium* from birds in Hawaii, with the recognition of *P. relictum* ssp. *capistranoae* (Russell, 1932) as the avian malária parasite there. In: *Parasitological topics - a presentation volume to P.C.C. Garnham, F.R.S. on the occasion of his 80th birthday*. Society of Protozoologists, Lawrence, pp 159–165

Law JM, Tully TN, Stewart TB (1993) Verminous encephalitis apparently caused by the filarioid nematode *Chandlerella quisquali* in emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Avian Dis* 37:597–601

LIMA, V.Y.; LANGONI, H.; SILVA, A.V.; PEZERICICO, S.B.; DE CASTRO, A.P.; DA SILVA, R.C.; ARAÚJO JR, J.P. Chlamydophila psittaci and Toxoplasma gondii infection in pigeons (Columba livia) from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 175, p. 9-14, 2011.

Lugarini C., Hurtado R., Araujo J., Ometto T., Thomazelli L.M., Seixas M.M.M., Durigon E. & Silva J.C. 2018. Lack of Detection of Avian Influenza, Newcastle Disease, and West Nile Viruses in Wild Birds of Northeastern Brazil. *J. Wildl. Dis.* 54(2):422-425. <<https://dx.doi.org/10.7589/2017-09-218>> <PMid:29148889>

MACHADO-FILHO, R. A.; BALSAMÃO, G. M.; MARINI, M. Â. Seasonal differences in immune profiles and body conditions of migratory and permanent resident neotropical flycatchers. *The Condor*, v. 112, n. 3, p. 579-590, 2010.

MANGINI, P. R.; SILVA, J. C. R. Medicina da Conservação: aspectos gerais. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens: medicina Veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p.1258-1268.

Mantilla JS, González AD, Lotta IA, et al (2016) *Haemoproteus erythroavidus* n. sp.(Haemosporida, Haemoproteidae): description and molecular characterization of a widespread blood parasite of birds in South America. *Acta Trop* 159:83–94

Marchiori J.N.C. & Alves F.S. 2011. O inhanduvá (*Prosopis affinis* Spreng.) no Rio Grande do Sul. 8 - Aspectos fitogeográficos. *Balduinia* (29):13-20. <<https://dx.doi.org/10.5902/2358198014133>>

Marks F.S., Rodenbusch C.R., Okino C.H., Hein H.E., Costa E.F., Machado G., Canal C.W., Bretano L. & Corbellini L.G. 2014. Targeted survey of Newcastle disease virus in backyard poultry flocks located in wintering site for migratory birds from Southern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 116(1/2):197-202. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.001>> <PMid:24958456>

MARINI, M. A.; REINERT, B. L.; BORNSCHEIN, M. R.; PINTO, J. C.; PICHORIM, M. A. Ecological correlates of ectoparasitism on Atlantic Forest birds, Brazil. *Ararajuba*, v. 4, n. 2, p. 93-102, 1996.

Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ (2008) A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol* 47:261–273

MARTINS-FERREIRA, C.; BENCKE, G. A.; FONTANA, C. S.; DIAS, R. A.; REPENNING, M.; et al. Plano de Ação Nacional para a conservação dos Passeriformes ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho. Série espécies ameaçadas 31. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2013.

Martins-Ferreira C, Freitas TRO (2010) Genetic diversity and population structure of the endangered yellow cardinal *Gubernatrix cristata* and implications to its conservation efforts. In: Proceedings of the 25th International Ornithological Congress. International Ornithological Congress, Campos do Jordão, p 868

Marzal A, Ricklefs RE, Valkiūnas G, et al (2011) Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS One* 6:e21905

Mazaheri A., Prusas C., Voß M. & Hess M. 1998. Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens. *Avian Pathol.* 27(3):269-276. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079459808419335>> <PMid:18483997>

MAXWELL, M.H. 1993. Avian blood leukocyte responses to stress. *World Poultry Science* 49: 34-43.

Meli M.L., Cattori V., Martínez F., López G., Vargas A., Simón M.A., Zorrilla I., Muñoz A., Palomares F., López-Bao J. V., Pastor J., Tandon R., Willi B., Hofmann-Lehmann R. & Lutz H. 2009. Feline leukemia virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *PLoS One.* 4(3)e4744. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004744>> <PMid:19270739>

MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, v. 11, n.3, p. 501-522, 2008.

MOAWAD, U. K. & RANDA, M. H. Histocytological and histochemical features of the adrenal gland of Adult Egyptian native breeds of chicken (*Gallus Gallus domesticus*). *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 6, 199–208 (2017).

MORENO, J.; S. MERINO; J.J. SAZ & E. ARRIERO. 2002. An indicator of maternal stress immunity in Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus*. *Annales Zoologici Fennici* 38: 111-116

Nääs I.A., Mollo Neto M., Canuto S., Waker R., Oliveira D. & Vendametto O. 2015. Brazilian chicken meat production chain: a 10-year overview. *Braz. J. Poult. Sci.* 17(1):87-94. <https://dx.doi.org/10.1590/1516-635x170187-94>

Nandi N, Bennett GF (1994) Re-description of *Trypanosoma corvi* Stephens and Christophers, 1908 emend. Baker, 1976 and remarks on the trypanosomes of the avian family Corvidae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89:145–151

Niemeyer C., Favero C.M., Shivaprasad H.L., Uhart M., Musso C.M., Rago M.V., Silva-Filho R.P., Canabarro P.L., Craig M.I., Olivera V., Pereda A., Brandão P.E. & Catão-Dias J.L. 2017. Genetically diverse herpesviruses in South American Atlantic coast seabirds. *PLoS One.* 12(6):e0178811. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0178811>> <PMid:28575104>

Oliveira L de, Barino GTM, Rossi MF, et al (2020) Morphological and molecular characterization of *Haemoproteus coatneyi* and *Haemoproteus erythrogravidus* (Haemosporida: Haemoproteidae) in Passeriformes in Brazil's Atlantic Forest. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 29:e011520. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020074>

Olson DM, Dinerstein E, Wikramanayake ED, et al (2001) Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience* 51:933. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0933:TEOTWA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0933:TEOTWA]2.0.CO;2)

Ometto T., Durigon E.L., Araujo J., Aprelon R., Aguiar D.M., Cavalcante G.T., Melo R.M., Levi J.E., Azevedo Júnior S.M., Petry M.V., Simão Neto I., Serafini P., Villalobos E., Cunha E.M.S., Lara M.C.C.S.H., Nava A.F.D., Nardi M.S., Hurtado R., Rodrigues R., Sherer A.L., Shererh J.F.M., Geraldi M.P., Seixas M.M.M., Peterka C., Bandeira D.S., Pradel J., Vachier N., Labruna M.B., Camargo L.M.A., Lanciotti R. & Lefrançois T. 2013. West nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 107(11):723-730. <<https://dx.doi.org/10.1093/trstmh/trt081>> <PMid:24008895>

PACHECO et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee – second edition. *Ornithology Research*, v. 29, n. 2, 2021.

Paperna I, Yosef R (2010) Description of a new species of *Haemoproteus* (Haemosporidia, Apicomplexa) from an Orange-tufted Sunbird *Nectarinia osea*. *Acta Parasitol* 55:103–107

PEREIRA, R. J. G. Reprodução das Aves. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO DIAS, J.L. Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária. 2a ed. São Paulo: Roca, 2014, p. 2235-2269

Piacentini VQ, Aleixo A, Agne CE, et al (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee/Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Rev Bras Ornitol* 23:91–298

Pitcovski, J., D. Goldberg, B. Z. Levi, D. Di-Castro, A. Azriel, S. Krispel, T. Maray, and Y. Shaaltiel, 1998. Coding region of segment A sequence of a very virulent isolate of IBDV— Comparison with isolates from different countries and virulence. *Avian Dis.* 42:497–506

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia da Conservação*. Londrina: Vida, 2001. 327 p.

Redin CG, Longhi RV, Watzlawick LF, Longhi SJ (2011) Composição florística e estrutura da regeneração natural do Parque Estadual do Espinilho, RS. *Ciênc Rural* 41:1195–1201

RIBEIRO, P. V. A., BAESSE C. Q., CURY M. C. & DE MELO C. Leukocyte profile of the helmeted manakin, *Antilophia galeata* (Passeriformes: Pipridae) in a Cerrado forest fragment. *Zoologia* 37: 1-8, 2020.

Ribeiro SF, Sebaio F, Branquinho FCS, et al (2005) Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitology* 130:261–267. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006596>

RIDGELY, R. S. & TUDOR, G. *Field Guide To The Songbirds Of South America: The Passerines*. Austin: University of Texas Press, 2009.

Rivera, S., Jr, J. F. X. W., Mcmanamon, R., Innis, C. J., Garner, M. M., Raphael, B. L., Gregory, C. R., Latimer, K. S., Rodriguez, C. E., Diaz-figueroa, O., Marlar, A. B., Nyaoke, A., Gates, A. E., Gilbert, K., Childress, A. L., Risatti, G. R., & Jr, S. F. (2009). Systemic Adenovirus Infection in Sulawesi Tortoises (*Indotestudo Forsteni*) Caused by a Novel Siadenovirus. June 2014. <https://doi.org/10.1177/104063870902100402>

Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, et al (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

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

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675

SEBAIO, F.; BRAGA, E.M.; BRANQUINHO, F.; FECCHIO, A.; MARINI, M.A. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 1, 2012.

Serafini PP (2013) Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília

SHIVAPRASAD H.L. Pathology of birds – an overview. Presented at the C.L. Davis Foundation Conference on Gross Morbid Anatomy of Animals, AFIP, Washington DC, 2002.

SICK, H. 1997. *Ornitologia Brasileira* 2nd ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira.

SILVA, JSA. et al. Newcastle Disease Virus Infection in Sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) Captured in Poultry Farms of the Agreste Region of the State of Pernambuco. *Braz. J. Poultry Sci.* 8:125-129, 2006.

Silva A.S.G., Matos A.C.D., Cunha M.A.C.R., Rehfeld I., Galinari G.C.F., Marcelino S.A.C., Saraiva L.H.G., Martins N.R.S., Maranhão R.P.A., Lobato Z.I.P., Pierezan F., Guedes M.I.M.C. & Costa E.A. 2019. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. *Transb. Emerg. Dis.* 66(1):445-453. <<https://dx.doi.org/10.1111/tbed.13043>> <PMid:30318735>

SIBLEY, C. G.; MONROE B. L. A supplement to distribution and taxonomy of birds of the world. New Haven: Yale Univ. Press 112p. 1993. SIMPSON, V.R.; BEVAN, B. Chlamydia psittaci infection in robins. *Veterinary Record*, v. 125, p.536, 1989.

SIMPSON, B. Import risk analysis: Passerine hatching eggs from the European Union, Ministry of Agriculture and Forestry, TeManatu Ahuwhenua, Ngaherehere, Wellington, New Zealand, 2006, 246p.

SMITH, K.A.; CAMPBELL, C.T.; MURPHY, J.; STOBIERSKI, M.G.; TENGELSEN, L.A. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (Psittacosis) and pet birds (Avian Chlamydiosis), National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV). *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 20, p. 32-45, 2011.

SMITH, K. F.; BEHRENS, M.; SCHLOEGEL, L. M.; MARANO, N.; BURGIEL, S.; DASZAK, P. Reducing the risks of the wildlife trade. *Science*, v. 324, n. 5927, p. 594- 595, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1174460>.

Somenzari M., Amaral P.P., Cueto V.R., Guaraldo A.C., Jahn A.E., Lima D.M., Lugarini C., Machado C.G., Martinez J., Nascimento J.L.X., Pacheco J.F., Paludo D., Prestes N.P., Serafini P.P., Silveira L.F., Sousa A.E.B.A., Sousa N.A., Souza M.A., Telino-Júnio W.R. & Whitney B.M. 2018. An overview of migratory birds in Brazil. *Papéis Avulsos Zool.* 58:e20185803. <<https://dx.doi.org/10.11606/1807-0205/2018.58.03>>

SOUSA, E. Pesquisa de agentes etiológicos patogênicos para galinhas de produção, em aves selvagens próximas às instalações avícolas. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado). FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

Sousa E., Costa T.P., Werther K., Dugon E.L., De Araujo J., Ferreira C. & Pinto A. 2013. Presence of antibodies against H5, H7 and H9 influenza A virus in wild birds in the state of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Poult. Sci.* 15(3):169-286. <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2013000300001>>

SOUSA, E.; WERTHER, K.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Assessment of Newcastle and infectious bronchitis pathogens, and *Salmonella* spp. in wild birds captured near poultry facilities. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 1, p. 219- 223, 2010.

SPENCER, K. A.; BUCHANAN, K. L.; LEITNER, S. Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 272, p.2037-2043. 2005.

Thomazelli L.M., De Araujo J., Ferreira C.S., Hurtado R., Oliveira D.B.L., Ometto T., Golono M., Sanfilippo L., Demetrio C., Figueiredo M.L. & Durigon E.L. 2012. Molecular surveillance of the Newcastle disease virus in domestic and wild birds on the north eastern coast and amazon bioma of Brazil. *Braz. J. Poult. Sci.* 14(1):1-7. <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2012000100001>>

Tian H. & Xu B. 2015. Anthropogenic factors and societal response to challenges in the transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1). *Annals of GIS* 21(2):149-156. <<https://dx.doi.org/10.1080/19475683.2015.1027790>>

Tostes R, Vashist U, Scopel KKG, et al (2015) *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. infection in birds of the Brazilian Atlantic Forest detected by microscopy and polymerase chain reaction. *Pesqui Veterinária Bras* 35:67–74. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000100014>

TULLY JR T.N. Birds. In: MITCHELL, M.A., TULLY JR T.N. *Manual of exotic pet practice*. Saunders. pp. 250-298. 2009

Urig H.E., Nolting J.M., Mathys D.A., Mathys B.A. & Bolman A. 2017. Influenza A Virus Surveillance in Underrepresented Avian Species in Ohio, USA, in 2015. *J. Wildl. Dis.* 53(2):402-404. <<https://dx.doi.org/10.7589/2016-05-106>> <PMid:28051568>

Valkiūnas G (2005) *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton

Valkiūnas G, Križanauskienė A, Iezhova TA, et al (2007) Molecular phylogenetic analysis of circumnuclear hemoproteids (Haemosporida: Haemoproteidae) of sylviid birds, with a description of *Haemoproteus parabelopolskyi* sp. nov. *J Parasitol* 93:680–687

Van Hemert C., Meixell B.W., Smith M.M. & Handel C.M. 2019. Prevalence and diversity of avian blood parasites in a resident northern passerine. *Parasites Vectors* 12:292. <<https://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3545-1>>

VanDevanter D.R., Warrener P., Bennett L., Schultz E.R., Couter S., Garber R.L. & Rose T.M. 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34(7):1666-1671. <<https://dx.doi.org/10.1128/JCM.34.7.1666-1671.1996>> <PMid:8784566>

Vera-Hernández P.F., Morales-Garzón A., Cortés-Espinosa D.V., Galiote-Flores A., García-Barrera L.J., Rodríguez-Galindo E.T., Toscano-Contreras A., Lucio-Decanini E.L. & Absalón A.E. 2016. Clinicopathological characterization and genomic sequence differences observed in a highly virulent fowl Aviadnavirus serotype 4. *Avian Pathol.* 45(1):73-81. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079457.2015.1125443>> <PMid:26610321>

Vieira M.A., Romano A.P.M., Borba A.S., Silva E.V.P., Chiang J.O., Eulálio K.D., Azevedo R.S.S., Rodrigues S.G., Almeida-Neto W.S. & Vasconcelos P.F.C. 2015a. West Nile virus encephalitis: the first human case recorded in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93(2):377-379. <<https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0170>> <PMid:26055749>

Vieira M.A.C.S., Aguiar A.A.X., Borba A.S., Guimarães H.C.L., Eulálio K.D., Albuquerque Neto L.L. & Lima O.B. 2015b. West Nile fever in Brazil: sporadic case, silent endemic disease or epidemic in its initial stages? *Revta Inst. Med. Trop. S. Paulo* 57(3):276. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000300017>>

Viggers K, Lindenmayer D, Spratt D (1993) The Importance of Disease in Reintroduction Programmes. *Wildl Res* 20:687. <https://doi.org/10.1071/WR9930687>

Walker S.F., Bosch J., James T.Y., Litvintseva A.P., Oliver Valls J.A., Piña S., García G., Rosa G.A., Cunningham A.A., Hole S., Griffiths R. & Fisher M.C. 2008. Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Curr. Biol.* 18(18):R853-R854. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.033>>

Webster R., Cox N. & Stöhr K. 2002. Manual on animal influenza diagnosis and Surveillance Global Influenza Programme. World Health Organization, Geneva. 99p.

Wellehan J.F., Johnson A.J., Harrach B., Benkö M., Pessier A., Johnson C.M., Garner M.M., Childress A. & Jacobson E.R. 2004. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J. Virol.* 78(23):13366-13369. <<https://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.23.13366-13369.2004>> <PMid:15542689>

Wellehan Jr J.F., Greenacre C.B., Fleming G.J., Stetter M.D., Childress A.L. & Terrell S.P. 2009. Siadenovirus infection in two psittacine bird species. *Avian Pathol.* 38(5):413-417. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079450903183660>> <PMid:19937528>

White EM, Greiner EC, Bennett GF, Herman CM (1978) Distribution of the hematozoa of Neotropical birds. *Rev Biol Trop* 26:43–102

WOJCZULANIS-JAKUBAS, K.; JAKUBAS, D.; CHASTEL, O.; KULASZEWICZ, I. A big storm in a small body: seasonal changes in body mass, hormone concentrations and leukocyte profile in the little auk (*Alle alle*). *Polar Biology*, v. 38, p. 1203-12, 2015.

Woodworth-Lynas CB, Caines JR, Bennett GF (1989) Prevalence of avian haematozoa in São Paulo state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84:515–526. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000400009>

Zidková L, Cepicka I, Szabová J, Svobodová M (2012) Biodiversity of avian trypanosomes. *Infect Genet Evol* 12:102–112. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.022>

Zsivanovits P., Monks D.M., Forbes N.A., Ursu K., Raue R. & Benkö M. 2006. Presumptive identification of a novel adenovirus in a Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*), a Bengal eagle owl (*Bubo bengalensis*), and a Verreaux's eagle owl (*Bubo lacteus*). *J. Avian Med. Surg.* 20(2):105-112. <<https://dx.doi.org/10.1647/2005-008.1>>

7. ANEXOS

7.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA SCA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 038/2018, referente ao projeto “**Perfil sanitário das populações de passeriformes dos campos sulinos com foco na reintrodução de espécie criticamente ameaçada de extinção**”, sob a responsabilidade de **Rosângela Locatelli Dittrich** – 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 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 08/06/2018.

Vigência do projeto	Julho/2018 até Dezembro/2020
Espécie/Linhagem	<i>Gubernatrix cristata</i> , <i>Scytalopus iraiensis</i> , <i>Drymornis bridgesii</i> , <i>Leptasthenura platensis</i> , <i>Spartonoica maluroides</i> , <i>Pseudoseisura lophotes</i> , <i>Coryphistera alaudina</i> , <i>Asthenes hudsoni</i> , <i>Limnocites rectirostris</i> , <i>Culicivora caudacuta</i> , <i>Polystictus pectoralis</i> , <i>Alectrurus tricolor</i> , <i>Xolmis dominicanus</i> , <i>Anthus nattereri</i> , <i>Sporophila plumbea</i> , <i>Sporophila hypoxantha</i> , <i>Sporophila ruficollis</i> , <i>Sporophila palustris</i> , <i>Sporophila cinnamomea</i> , <i>Sporophila melanogaster</i> , <i>Sporophila pileata</i> , <i>Xanthopsar flavus</i> (passeriformes)
Número de animais*	120
Peso/Idade	Variável
Sexo	Variável
Origem	Zoológico de Pomerode, Parque das Aves, Criadouro Onça-Pintada, Gramado Zoo, Museu da USP, Brasil

*O número exato de indivíduos de cada espécie será computado ao final da pesquisa, após a captura em vida livre. Posteriormente será emitido errata deste certificado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 038/2018, regarding the project “**Sanitary profile of the passerine populations of the campos sulinos with a focus on the reintroduction of species critically endangered**” under **Rosângela Locatelli Dittrich** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 08/06/2018.

Duration of the project	July/2018 until December/2020
Specie/Line	<i>Gubernatrix cristata</i> , <i>Scytalopus iraiensis</i> , <i>Drymornis bridgesii</i> , <i>Leptasthenura platensis</i> , <i>Spartonoica maluroides</i> , <i>Pseudoseisura lophotes</i> , <i>Coryphistera alaudina</i> , <i>Asthenes hudsoni</i> , <i>Limnocites rectirostris</i> , <i>Culicivora caudacuta</i> , <i>Polystictus pectoralis</i> , <i>Alectrurus tricolor</i> , <i>Xolmis dominicanus</i> , <i>Anthus nattereri</i> , <i>Sporophila plumbea</i> , <i>Sporophila hypoxantha</i> , <i>Sporophila ruficollis</i> , <i>Sporophila palustris</i> , <i>Sporophila cinnamomea</i> , <i>Sporophila melanogaster</i> , <i>Sporophila pileata</i> , <i>Xanthopsar flavus</i> (passerines)
Number of animals*	120
Weight/Age	Variable
Sex	Variable
Origin	Zoológico de Pomerode, Parque das Aves, Criadouro Onça-Pintada, Gramado Zoo, Museu da USP, Brazil.

Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias – UFPR

* The individuals exact number of each species will be computed at the end of the research, after capture in living freely. Subsequently, erratum of this certificate will be issued.

Curitiba, 08 de junho de 2018.

Chayane da Rocha
Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA

7.2 CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA – SISBIO (SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE)



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: 53935-6	Data da Emissão: 21/01/2019 16:14:08	Data da Revalidação*: 21/01/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Patricia Pereira Serafini	CPF: 027.472.819-22
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Avaliação da saúde de cardeais-amarelos e aves nas áreas potenciais de soltura	05/2016	05/2020
2	Avaliação da saúde de cardeais-amarelos mantido nas instituições vinculadas ao Programa de Cativo	05/2016	05/2020
3	Monitoramento e avaliação demográfica das populações de aves campestres nas áreas de estudo	11/2018	11/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Marcio Repenning	Pesquisador	004.113.490-74	Brasileira
2	Rafael Meurer	Pesquisador	081.715.909-69	Brasileira
3	CARLA SUERTEGARAY FONTANA	pesquisadora	459.354.670-20	Brasileira
4	Rosangela Locatelli Dittrich	pesquisadora	728.634.989-91	Brasileira
5	Bianca Ressetti da Silva	pesquisadora	066.392.509-69	Brasileira
6	Luciano Matsumiya Thomazelli	Pesquisador	288.078.428-07	Brasileira
7	Carla Meneguim Barbosa	Pesquisadora	359.887.188-09	Brasileira
8	Thaiane Weinert da Silva	Pesquisadora	014.647.940-81	Brasileira
9	EDUARDO CHIARANI	Pesquisador	986.231.920-87	Brasileira

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

Código de autenticação: 0539350620190121

Página 1/5



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: 53935-6	Data da Emissão: 21/01/2019 16:14:08	Data da Revalidação*: 21/01/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Patricia Pereira Serafini	CPF: 027.472.819-22
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Este documento NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
3	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
9	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Zoológico de Pomerode	Pomerode-SC	Pampa	Não	Fora de UC Federal
2	Área adjacente às áreas de soltura importante para prospecção	Dom Pedrito-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
3	Parque das Aves	Foz do Iguaçu-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

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

Código de autenticação: 0539350620190121

Página 2/5



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: 53935-6	Data da Emissão: 21/01/2019 16:14:08	Data da Revalidação*: 21/01/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Patricia Pereira Serafini	CPF: 027.472.819-22
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
4	Parque Estadual do Espinhaço	Barra do Quaraí-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
5	GramadoZoo	Gramado-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
6	Área de Soltura Experimental potencial	Lavras do Sul-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
7	Criadouro Onça-Pintada	Campina Grande do Sul-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves	-
2	Marcação de animais silvestres in situ	Aves	-
3	Captura de animais silvestres in situ	Passeriformes	-
4	Marcação de animais silvestres in situ	Passeriformes	-
5	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Passeriformes	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Passeriformes	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Passeriformes	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Gubernatrix cristata	-
9	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Gubernatrix cristata	-
10	Captura de animais silvestres in situ	Gubernatrix cristata	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Gubernatrix cristata	-
12	Marcação de animais silvestres in situ	Gubernatrix cristata	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Ectoparasita, Fezes, Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas(suabes de orofaringe e cloacais), Penas
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina, Outros métodos de captura/coleta(captura manual)
3	Método de marcação (Aves)	Anilha de Alumínio (padrão CEMAVE), Anilha, Anilha colorida

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

Código de autenticação: 0539350620190121

Página 3/5



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: 53935-6	Data da Emissão: 21/01/2019 16:14:08	Data da Revalidação*: 21/01/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Patricia Pereira Serafini	CPF: 027.472.819-22
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	Outro

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

Código de autenticação: 0539350620190121

Página 4/5



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: 53935-6	Data da Emissão: 21/01/2019 16:14:08	Data da Revalidação*: 21/01/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Patricia Pereira Serafini	CPF: 027.472.819-22
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 0539350620190121

Página 5/5



Molecular diagnosis of avian viruses in grassland passerines and captive yellow cardinals *Gubernatrix cristata* in Brazil¹

Bianca R. Silva^{2*}, Thais H. Gamon³, Angélica C.A. Campos³,
Luciano M. Thomazelli², Patricia P. Serafini⁴, Eduardo Chiarani⁵,
Thaiane W. Silva¹ and Rosângela Locatelli-Dittrich²

ABSTRACT. Silva B.R., Gamon T.H., Campos A.C.A., Thomazelli L.M., Serafini P.P., Chiarani E., Silva T.W. & Locatelli-Dittrich R. 2021. **Molecular diagnosis of avian viruses in grassland passerines and captive yellow cardinals *Gubernatrix cristata* in Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 41:e06840, 2021. Graduate Program in Veterinary Sciences, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil. E-mail: biaressetti@gmail.com

Avian influenza viruses (AIVs), Newcastle disease virus (NDV), West Nile virus (WNV), adenovirus (AV) and herpesvirus (HV) play an important role in the health of human and animal populations. However, knowledge of the prevalence of these viruses in wild birds is restricted to some groups (e.g. shorebirds) or regions worldwide. Information on grassland birds of South America, which is essential for their conservation, is scarce. The objectives of the present study were to evaluate occurrences of AIV, NDV, WNV, AV and HV for the first time in a bird community of a unique protected area in southern Brazil, which is home for the critically endangered yellow cardinal (*Gubernatrix cristata*), and captive yellow cardinals from fauna maintainers of the Brazilian Captive Program of the Yellow Cardinal. Passerine species of wild life were caught, identified and samples (swabs) were collected from the oropharynx and cloaca of 64 passerines of 26 species (including 3 yellow cardinals) and 30 yellow cardinals of captive, for molecular diagnosis. The samples were subjected to RNA and DNA extraction and the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for AIV, NDV and WNV and nested PCR for AV and HV. One yellow cardinal of captive presented a positive result for AV, this result is important for planning, managing natural attributes and making decisions in relation to integrated conservation of threatened species. This is the first report of AV in yellow cardinal and epidemiological investigation of viruses in wild passerines of the Pampa biome, in Rio Grande do Sul, Brazil.

INDEX TERMS: Molecular diagnosis, avian virus, passerines, yellow cardinals, *Gubernatrix cristata*, Brazil, conservation, pampa, sanitary profile, thornbush, threatened species, wildlife animals.

RESUMO. [Diagnóstico molecular de vírus aviários em passeriformes campestres e cardiais-amarélos *Gubernatrix cristata* cativos no Brasil.] Os vírus da gripe aviária (VGA), vírus da doença de Newcastle (VDN), vírus do Nilo Ocidental (VNO), adenovírus (AV) e herpesvírus (HV) desempenham um

papel importante na saúde das populações humana e animal. No entanto, o conhecimento da prevalência desses vírus em aves selvagens é restrito a alguns grupos (por exemplo, aves limícolas) ou regiões em todo o mundo. As informações sobre as aves campestres da América do Sul, essenciais para a sua

¹ Received on February 16, 2021.

Accepted for publication on March 29, 2021.

² Graduate Program in Veterinary Sciences, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil. E-mail: roslocodi@ufpr.br; *Corresponding author: biaressetti@gmail.com

³ Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo (USP), Av. Professor Lineu Prestes 1374, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. E-mail: thagamon@hotmail.com, camposac@usp.br, lucmt@usp.br

⁴ Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Rodovia Jornalista Maurício Sirotski Sobrinho Km 2, Florianópolis, SC 88053-700, Brazil. E-mail: patricia.serafini@icmbio.gov.br

⁵ Laboratório de Ornitologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Campus Porto Alegre, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil. E-mail: edochiarani@gmail.com, thaisnews@gmail.com

7.4 PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS EM CARDEAIS-AMARELOS SILVESTRES (PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO) E DO PCCA (ZOOPOMERODE-SC, PARQUE DAS AVES-PR E GRAMADOZOO-RS), 2018 E 2019.

	Heterófilos (%)	Bastonetes (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)	Monócitos (%)	Basófilos (%)	Proporção H:L
GramadoZoo RS (7)	12	0	70	3	9	6	0,17
	21	0	48	2	16	13	0,44
	19	0	58	1	4	18	0,33
	26	0	46	0	5	23	0,57
	34	1	23	0	16	26	1,48
	29	1	38	0	7	25	0,76
	34	0	32	1	14	19	1,06
Parque das Aves PR (17)	41	1	22	2	18	16	1,86
	26	1	31	4	11	27	0,84
	27	0	24	4	20	25	1,13
	30	1	33	3	15	18	0,91
	38	1	29	7	12	13	1,31
	27	0	39	9	11	14	0,69
	33	0	33	24	3	7	1,00
	14	0	44	5	23	14	0,32
	29	0	34	10	6	21	0,85
	29	0	19	11	7	34	1,53
	27	0	36	6	18	13	0,75
	6	0	57	8	10	19	0,11
	22	0	45	9	10	14	0,49
	14	0	45	3	19	19	0,31
20	0	27	4	44	5	0,74	
37	0	12	0	48	3	3,08	
66	0	23	0	11	0	2,87	
ZooPomerode SC (7)	41	1	22	2	18	16	1,86
	26	1	31	4	11	27	0,84
	27	0	24	4	20	25	1,13
	30	1	33	3	15	18	0,91
	38	1	29	7	12	13	1,31
	27	0	39	9	11	14	0,69
	33	0	33	24	3	7	1,00
Parque Estadual do Espinilho- RS (3)	23	0	27	1	20	29	0,85
	17	0	45	11	11	16	0,38
	39	0	40	2	6	13	0,98

7.5 PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS DOS PASSERIFORMES DO PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO, BARRADO QUARAÍ-RS, 2019.

	Heterófilos (%)	Bastonetes (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)	Monócitos (%)	Basófilos (%)	Proporção H:L
<i>Coryphistera alaudina</i>	28	0	54	8	7	3	0,52
<i>Paroaria coronata</i>	46	0	39	4	9	2	1,18
<i>Asthenes baeri</i>	28	0	21	28	9	14	1,33
<i>Paroaria coronata</i>	43	0	28	1	11	17	1,54
<i>Zonotrichia capensis</i>	10	0	86	0	0	4	0,12
<i>Asthenes baeri</i>	19	0	14	42	19	6	1,36
<i>Asthenes baeri</i>	26	0	7	36	29	2	3,71
<i>Zonotrichia capensis</i>	26	0	33	4	30	7	0,79
<i>Zonotrichia capensis</i>	13	0	72	7	8	0	0,18
<i>Furnarius rufus</i>	12	0	52	19	12	5	0,23
<i>Drymornis bridgesii</i>	40	0	34	18	5	3	1,18
<i>Paroaria coronata</i>	31	0	58	1	10	0	0,53
<i>Zonotrichia capensis</i>	2	0	85	0	7	6	0,02
<i>Zonotrichia capensis</i>	18	0	67	5	10	0	0,27
<i>Zonotrichia capensis</i>	2	0	81	5	7	5	0,02
<i>Tyrannus melancholicus</i>	27	0	42	14	9	8	0,64
<i>Coryphistera alaudina</i>	51	1	38	1	6	3	1,34
<i>Sicalis flaveola</i>	53	0	26	0	17	4	2,04
<i>Zonotrichia capensis</i>	14	0	44	7	10	25	0,32
<i>Furnarius rufus</i>	24	0	46	18	6	6	0,52
<i>Tangara sayaca</i>	25	0	47	1	18	9	0,53
<i>Serpophaga subcristata</i>	24	0	61	0	12	3	0,39
<i>Tangara sayaca</i>	65	1	9	0	16	9	7,22
<i>Polioptila dumicola</i>	33	0	13	10	14	30	2,54
<i>Polioptila dumicola</i>	19	0	59	2	6	14	0,32
<i>Pitangus sulphuratus</i>	30	0	54	1	14	1	0,56
<i>Troglodytes musculus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pitangus sulphuratus</i>	32	0	32	24	9	3	1,00
<i>Furnarius rufus</i>	18	0	61	8	4	9	0,30
<i>Serpophaga subcristata</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	83	0	7	1	8	1	11,86
<i>Troglodytes musculus</i>	36	0	44	5	10	5	0,82
<i>Zonotrichia capensis</i>	7	0	81	3	8	1	0,09
<i>Agelaioides badius</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sicalis flaveola</i>	5	0	57	3	21	14	0,09
<i>Agelaioides badius</i>	13	0	67	4	6	10	0,19

<i>Paroaria coronata</i>	46	0	40	3	5	6	1,15
<i>Agelaioides badius</i>	25	0	48	8	8	11	0,52
<i>Schoeniophylax phryganophilus</i>	31	0	59	4	6	0	0,53
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i>	14	1	54	22	2	7	0,26
<i>Sublegatus modestus</i>	4	0	72	6	5	13	0,06
<i>Cranioleuca pyrrhophia</i>	7	0	64	5	6	18	0,11
<i>Progne tapera</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Furnarius rufus</i>	12	1	65	16	0	6	0,18
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	9	0	49	5	17	20	0,18
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	45	0	32	7	2	14	1,41
<i>Sicalis flaveola</i>	71	0	14	1	6	8	5,07
<i>Turdus amaurochalinus</i>	48	0	27	7	4	14	1,78
<i>Furnarius rufus</i>	50	1	28	7	3	11	1,79
<i>Sicalis flaveola</i>	10	0	81	0	6	3	0,12
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	20	0	40	8	4	28	0,50
<i>Polioptila dumicola</i>	25	0	66	1	0	8	0,38
<i>Saltator aurantirostris</i>	21	0	46	0	1	32	0,46
<i>Pitangus sulphuratus</i>	45	0	21	15	7	12	2,14
<i>Paroaria coronata</i>	27	1	62	0	6	4	0,44
<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	2	0	93	2	1	2	0,02
<i>Polioptila dumicola</i>	8	2	66	2	2	20	0,12
<i>Mimus saturninus</i>	12	0	40	25	7	16	0,30
<i>Mimus saturninus</i>	20	0	67	5	3	5	0,30
<i>Pseudoseisura lophotes</i>	34	0	55	2	4	5	0,62
<i>Furnarius rufus</i>	40	0	53	5	2	0	0,75

7.6 MICROBIOTA CLOACAL E DE OROFARINGE DOS PASSERIFORMES DO PARQUE ESTADUAL DO ESPINILHO (PARCIAL)

As amostras de microbiota demandam tempo para serem processadas, necessitando de uma série de incubações descritas anteriormente na metodologia do Capítulo 4. Dessa forma, durante a pesquisa priorizamos as amostras dos cardeais-amarelos para o perfil sanitário da espécie e para os passeriformes do Parque Estadual do Espinilho os resultados são parciais, realizados a partir da metodologia descrita no Capítulo 4 e estão apresentados abaixo.

Dos 61 passeriformes silvestres amostrados no presente estudo, somente 13 amostras foram processadas e as demais foram congeladas em meio BHI e glicerina para análise posterior. Das amostras avaliadas de 13 passeriformes foram isoladas 69 colônias de bactérias, sendo 14 (20,3%) de bactérias gram-positivas e 55 (79,7%) de bactérias gram-negativas. Das bactérias gram-negativas 10 foram identificadas, sendo: *Enterobacter cloacae* em *Coryphistera alaudina*, em *Asthenes baeri* e em *Zonotrichia capensis*; *Enterobacter aerogenes* em *Asthenes baeri*; *Klebsiella pneumoniae* em *Coryphistera alaudina* e *Escherichia coli* em *Paroaria coronata*. Das amostras avaliadas de 13 passeriformes, 24 não tiveram crescimento nas placas.

Amostras da microbiota de todos os passeriformes estão congeladas e disponíveis para a continuação das pesquisas.

7.7 RESUMOS APRESENTADOS NO XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ORNITOLOGIA - VILA VELHA - ES 2019



PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS E HEMOPARASITAS DE CARDEAL-AMARELO (*Gubernatrix cristata*) DE CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE

SILVA, B.R.^{1*}; MELLO, B.C.²; SILVA, N.S.²; SERAFINI, P.P.³; CHIARANI, E.⁴; SILVA, T.W.⁴; FONTANA, C.S.⁴;

LOCATELLI-DITTRICH, R.^{1,2}

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

³ Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, Florianópolis, SC, Brasil.

⁴ Laboratório de Ornitologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*biaressetti@gmail.com

INTRODUÇÃO

Restam cerca de 50 cardeais-amarelos, *Gubernatrix cristata* (Vieillot, 1817), de vida livre no Brasil (espécie criticamente ameaçada), não havendo valores de referência para monitoramento sanitário das populações. O presente estudo avaliou a morfologia das células sanguíneas, parâmetros leucocitários (diferencial) e presença de hemoparasitas em cardeais-amarelos do Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo (PCCA) e de vida livre.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de 19 cardeais-amarelos do PCCA e de um indivíduo silvestre capturado com rede de neblina no Parque Estadual do Espinhaço. Amostras de sangue foram obtidas da veia ulnar para confecção imediata das extensões sanguíneas (Figura 1). As lâminas foram coradas pela técnica de May Grünwald-Giemsa.



Figura 1. Coleta de sangue de cardeal-amarelo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No diferencial de leucócitos dos cardeais-amarelos cativos, o número de heterófilos variou de 21 a 83, linfócitos de 11 a 78, monócitos de 01 a 48, basófilos de zero a 21, eosinófilos de zero a 09, e heterófilos bastonetes de zero a 04. Os policromatófilos variaram de 02 a 45 por campo. Na leitura do esfregaço do cardeal-amarelo silvestre, foram contados 23 heterófilos, 27 linfócitos, 20 monócitos, 29 basófilos, 01 eosinófilo, zero heterófilos bastonetes, e 09 policromatófilos por campo. No esfregaço do cardeal-amarelo silvestre e de 08 indivíduos cativos (42,1 %) observaram-se inclusões citoplasmáticas nos linfócitos. Hemoparasitas foram observados no esfregaço de apenas um cardeal-amarelo do PCCA, onde foram identificadas 57 microfílarias (Figura 2). Esses resultados são importantes para avaliação de estresse, resposta inflamatória e doenças, contribuindo para a conservação.

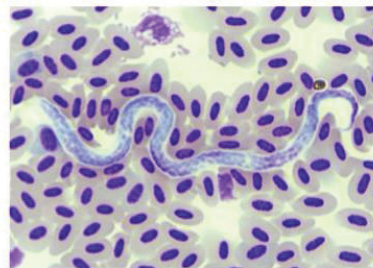


Figura 2. Esfregaço sanguíneo de cardeal-amarelo. Hemácias e microfilaria (100x).

REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes da Conservação. **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinhaço**: Brasília, 2013.



MICROBIOTA CLOACAL E DE OROFARINGE DE CARDEAIS-AMARELOS (*Gubernatrix cristata*) DE CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE

SILVA, B.R.¹; SERAFINI, P.P.²; CHIARANI, E.³; SILVA, T.W.³; FONTANA, C.S.³; MEURER, R.⁴; LOCATELLI-DITTRICH, R.¹

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, Florianópolis, SC, Brasil.

³ Laboratório de Ornitologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Associação R3 Animal, Florianópolis, SC, Brasil.

*biaressetti@gmail.com

INTRODUÇÃO

O cardeal-amarelo, *Gubernatrix cristata* (Vieillot, 1817), está criticamente ameaçado de extinção no Brasil, onde restam cerca de 50 indivíduos de vida livre. Informações sobre a microbiota dessas aves são importantes para avaliação sanitária dos indivíduos cativos e silvestres, embasando planos de conservação. O presente estudo avaliou a microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos do Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo (PCCA) e de vida livre.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de nove cardeais-amarelos cativos e de um indivíduo silvestre, o qual foi capturado com rede de neblina no Parque Estadual do Espinhaço (Barra do Quaraí, RS). Amostras de microbiota cloacal e de orofaringe dos 10 cardeais-amarelos foram obtidas utilizando suabes uretrais estéreis, armazenadas em meio Stuart e acondicionadas entre 2 a 8° C imediatamente após a coleta (Figura 1).



Figura 1. Coleta de amostra de microbiota de orofaringe de cardeal-amarelo

As análises microbiológicas foram realizadas em laboratório na Estação Ecológica de Carijós/ICMBio seguindo metodologia padronizada. Para identificação das enterobactérias foi utilizado o kit comercial API20E (bioMérieux) seguindo as instruções do fabricante (Figura 2).



Figura 2. Galeria do kit API20E para identificação de enterobactéria.

Foram isoladas 15 colônias de bactérias, com predominância de bactérias gram-positivas (n = 13; 86,7%) do gênero *Staphylococcus* sp. e duas espécies de bactérias gram-negativas (13,3%), uma identificada como *Enterobacter cloacae*, de amostra cloacal, e outra como *Escherichia coli*, de amostra de orofaringe.

Entender a microbiota do sistema gastrointestinal dessas aves é importante para relacionar a presença de microrganismos e doenças infecciosas, além de estabelecer parâmetros normais ainda não existentes para a espécie.

REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes da Conservação. **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinhaço**: Brasília, 2013.

7.8 MAPA COM LOCALIZAÇÃO DO BIOMA PAMPA NO BRASIL— IBFLORESTAS 2020.

