

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina Veterinária
Programa de Residência Integrado em Medicina Veterinária

Camila Issa Amaral

**ISOSPOROSE SISTÊMICA EM 3 (TRÊS) ESPÉCIES DE
PASSERIFORMES DE CATIVEIRO: SPOROPHILA MAXIMILIANI
(BICUDO-VERDADEIRO), SERINUS CANARIA (CANÁRIO-BELGA) E
SALTATOR SIMILIS (TRINCA-FERRO)**

Belo Horizonte

2023

Camila Issa Amaral

**ISOSPOROSE SISTÊMICA EM 3 (TRÊS) ESPÉCIES DE
PASSERIFORMES DE CATIVEIRO: SPOROPHILA MAXIMILIANI
(BICUDO-VERDADEIRO), SERINUS CANARIA (CANÁRIO-BELGA) E
SALTATOR SIMILIS (TRINCA-FERRO)**

Monografia apresentada à UFMG, como
requisito parcial para obtenção do título de
Especialista - Residência em Medicina
Veterinária.

Área de concentração: Patologia
Veterinária.

Tutor: Profa. Dra. Roselene Ecco

Belo Horizonte

2023

A485i Amaral, Camila Issa, -1995.
Isosporose sistêmica em 3 (três) espécies de Passeriformes de cativeiro: *Sporophila maximiliani* (Bicudo-verdadeiro), *Serinus canária* (Canário Belga) e *Saltator similis* (Trinca-ferro) / Camila Issa Amaral. – 2023.
39f.: il

Tutora: Roselene Ecco
Monografia apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção de título de Especialista Residência em Medicina Veterinária
Bibliografia: f. 34 - 39

1. Pássaro - Doenças - Teses - 2. Passeriformes - Teses - 3. Patologia veterinária - Teses - I. Ecco, Roselene - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.686 089 6

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

ATA DE DEFESA DE TCR DE **Camila Issa Amaral**

Às **09:00** horas do dia **28/11/2023**, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso, para julgar em exame final, a defesa do TCR intitulado: Isosporose sistêmica em 3 (três) espécies de Passeriformes de cativeiro: *Sporophila maximiliani* (Bicudo-verdadeiro), *Serinus canaria* (Canário Belga) e *Saltator similis* (Trinca-ferro), como requisito final para a obtenção do Título de Especialista em **Patologia Animal**.

Abrindo a sessão, o Presidente da Banca, **Prof.ª Roselene Ecco**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa do TCR, passou a palavra a candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Banca se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento da TCR, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Aprovada	Reprovada
----------	-----------

Prof.ª Roselene Ecco

Prof.ª Ayisa Rodrigues de Oliveira

Prof. Marcelo Pires Nogueira de Carvalho

X	
X	
X	

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado

Reprovado


Nota: **98,0**

Para concluir o Programa, o (a) candidato (a) deverá depositar no repositório Institucional a referida produção acatando, se houver as modificações sugeridas pela banca. Para tanto terá o prazo máximo de 30 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao (a) candidato (a) pelo Presidente da Banca. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Banca Examinadora.

Belo Horizonte, 28 de novembro de 2023.

Assinatura dos membros da Banca:

Documento assinado digitalmente
 ROSELENE ECCO
 Data: 05/12/2023 16:30:52-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador e não poderá conter rasuras)

À minha mãezinha, até o último instante.

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãezinha, meu maior exemplo de vida, obrigada por todo amor, por toda dedicação, pelo seu sacrifício diário, por aguentar tantos anos de sofrimento para que eu tivesse uma infância e adolescência dignas. Muito obrigada, meu amor, por me manter com os pés na terra quando eu parecia mais próxima da lua.

Aos meus amados irmãos, Viviane e Lucas, meus maiores fãs e incentivadores. Obrigada por sempre acreditarem em mim, sem vocês essa caminhada não seria possível.

À minha querida orientadora e amiga, Roselene Ecco, pelos ensinamentos e conselhos e, acima de tudo, pelo voto de confiança. Terminei esse ciclo me lembrando e sendo grata por todas as horas no microscópio, pelas inúmeras correções nos laudos, pelos elogios e puxões de orelha. Professora, obrigada pela convivência, tenho orgulho de ser a Camila da patologia de aves, devo isso a senhora!

Ao meu xuxuzinho e companheiro, Mateus, por mesmo que de longe, segurar firme a minha mão durante esses dois anos. Obrigada meu dengo, por me escutar e por me fazer rir, mesmo que por dentro eu quisesse muito chorar. Só você sabe o que se passa na minha cabecinha e só você a ama do jeitinho que ela é.

As minhas melhores amigas, Isabella, Letícia e Lorena, que são as pessoas mais lindas e amáveis que já passaram na minha vida. Obrigada por tanto!

A todos os professores do Setor de Patologia Veterinária da EV-UFMG (Ayisa Rodrigues de Oliveira, Natália de Melo Ocarino, Renato de Lima Santos, Rogéria Serakides e Roberto Guedes), por todos os ensinamentos e pelo entusiasmo em passar o conhecimento.

As colegas de residência, Daniele, Larissa, Acácia e Nayara, que compartilharam muitas horas comigo, por toda parceria, ajuda, risos, amizade e força. Juntas nós somos uma equipe linda, engraçada e competente!

As funcionárias, Leimar, Valéria e Vitalina, por serem tão carinhosas e compreensíveis comigo, pelo ombro amigo, pelo conforto e por fazerem eu me sentir em um lugar seguro!

Aos meus grandes amigos da pós-graduação, Letícia, Suzyanne, Felipe, Gabriel, Marcelo, Maira, Eric, Clarissa, Daniel, Nayara e Lucas, obrigada por compartilharem tanto comigo!

AMO VOCÊS! OBRIGADA!

RESUMO

A isosporose sistêmica (atoxoplasnose) é uma doença causada por parasitos apicomplexos hospedeiros-específicos do gênero *Isoospora*, com distribuição sistêmica devido a parte do ciclo extraintestinal. Objetivou-se relatar as alterações histológicas e achados moleculares de isosporose sistêmica em quinze passeriformes de três espécies diferentes: *Sporophila maximiliani* (bicudo-verdadeiro), *Serinus canaria* (canário-belga) e *Saltator similis* (trinca-ferro) de cativeiro, provenientes de diferentes propriedades de Minas Gerais-Brasil. Entre os anos de 2017 e 2022 foram recebidos na Escola de Veterinária da UFMG Passeriformes para exame de necropsia completo, bem como fragmentos de tecidos fixados em formalina tamponada 10% para exame histopatológico. Histologicamente, na lâmina própria dos intestinos de 13 aves havia infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário moderado a acentuado com raros heterófilos. No citoplasma de macrófagos e extracelular havia merozoítos compatíveis com *Isoospora* spp. Alterações histológicas em associação com merozoítos no fígado, pulmão, baço e coração também foram descritas. Foi extraído DNA de tecidos congelados de uma ave (trinca-ferro) e submetido a PCR convencional, que amplificou o DNA de *Isoospora* spp. A isosporose sistêmica acomete muitas espécies de passeriformes, entretanto, este é o primeiro relato documentado em bicudos-verdadeiros. O exame histopatológico mostrou-se eficaz para o diagnóstico da infecção protozoária, compatível com isosporose sistêmica.

Palavras chave: atoxoplasnose; aves; histopatologia; protozoários.

ABSTRACT

Systemic isosporosis (atxoplasmosis) is a disease caused by host-specific apicomplexan parasites of the genus *Isospora*, which manifest systemically and have a portion of their life cycle outside the intestine. The objective of the study was to report histological changes along with molecular findings of systemic isosporosis in fifteen Passeriformes of three different species: *Sporophila maximiliani* (great-billed seed finch), *Serinus canaria* (Belgian canary), and *Saltator similis* (green-winged saltator) in captivity from different properties in Minas Gerais State, Brazil. Between the years 2017 and 2022, birds from various locations in Minas Gerais State, Brazil, were received at the Veterinary School of UFMG for a complete necropsy examination, including fragments of tissues fixed in 10% buffered formalin for histopathological examination. Histologically, in the lamina propria of the intestines of 13 animals, there was a moderate to marked lymphocytic and histioplasmacytic inflammatory infiltrate with rare heterophils. Merozoites of *Isospora* spp. were present in the cytoplasm of macrophages and extracellularly. Histological changes in the liver, lung, spleen, and heart were also described. DNA was extracted from frozen tissues of one bird (green-winged saltator), and a PCR assay amplified *Isospora* spp. DNA. Systemic isosporosis affects many species of passerines; however, this is the first documented report in great-billed seed finch. Histopathological examination proved effective for the diagnosis of protozoal infection, consistent with systemic isosporosis.

Keywords: atxoplasmosis; Birds; histopathology; protozoa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. **A.** Imagem macroscópica de cortes transversais do intestino de um bicudo-verdadeiro (caso 14). Parede intensamente espessada com marcada estenose do lúmen intestinal (fragmentos fixados em formalina). **B.** Imagem macroscópica de conjunto de órgãos de um bicudo-verdadeiro. Duodeno intensamente distendido e difusamente congesto (seta). **C.** Imagem macroscópica do intestino de um canário (caso 4). Todos os segmentos intestinais intensamente congestos. **D.** Imagem macroscópica do intestino de um trinca-ferro (caso 5). Duodeno, parede intestinal moderadamente espessada e mucosa com áreas multifocais de hemorragia petequial.

Figura 2. **A.** Imagem macroscópica de um trinca-ferro (caso 5). Fígado moderadamente aumentado de volume e difusamente congesto (seta). Duodeno moderadamente distendido e com uma área segmentar de congestão na serosa (cabeça de seta). **B.** Imagem macroscópica do fígado de um canário (caso 2). Fígado moderadamente aumentado de volume e difusamente congesto. **C.** Imagem macroscópica do fígado de um canário (caso 4). Fígado moderadamente aumentado de volume e com áreas multifocais a coalescentes branco-amareladas e friáveis (necrose)(seta).

Figura 3. Gráfico de distribuição de lesões de acordo com as espécies acometidas

Figura 4. Imagem microscópica de corte transversal do duodeno de um bicudo-verdadeiro (caso 14) evidenciando espessamento intenso de lâmina própria por infiltrado inflamatório que substitui o tecido normal e se estende até a camada serosa (seta) (H&E 10x).

Figura 5. Imagem microscópica do duodeno de um trinca-ferro (caso 5). Lâmina própria intensamente espessada por infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos, associado a intensa quantidade de merozoítos de *Isospora* spp. no interior de macrófagos e linfócitos (setas) (H&E 40x).

Figura 6. Imagem microscópica do fígado de um canário (caso 4). Sinusoides com infiltrado inflamatório linfocítico acentuado. Área focalmente extensa de necrose de hepatócitos associado com fibrina e restos celulares (estrela) (H&E 20x).

Figura 7. Imagem microscópica do fígado de um canário (caso 4). Desorganização da arquitetura normal do órgão e substituição por infiltrado inflamatório linfo-histiocitário associado a merozoítos de *Isospora* spp. intraleucocitárias (seta) (H&E 60x).

Figura 8. Imagem microscópica do pulmão de um canário (caso 3). Septos dos capilares aéreos moderadamente espessados por infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário (setas) (H&E 20x).

Figura 9. Imagem microscópica do coração de um canário (caso 2). Epicárdio intensamente espessado por infiltrado inflamatório linfo-histiocitário (setas) que se estende discretamente para o miocárdio (H&E 10x).

Figura 10. Imagem microscópica do coração de um trinca-ferro. Infiltrado inflamatório linfocitário discreto entre os cardiomiócitos. Evidenciado pela seta há merozoítos de *Isospora* spp. intralesionais (H&E 60x).

Figura 11. A. Gel de eletroforese sob luz ultravioleta demonstrando uma banda positiva para a subunidade cromossômica grande de RNA ribossômico do gene 23S (TF: amostra). **B.** Gel de eletroforese sob luz ultravioleta demonstrando uma banda positiva para o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (TF: amostra).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos de isosporose sistêmica recebidos na Escola de Veterinária da UFMG de 2017-2022.

Tabela 2. Classificação das lesões histológicas intestinais de acordo com a intensidade.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 Relato dos casos	14
2.2 Histopatologia	16
2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Sinais clínicos	17
3.2 Patologia macroscópica	18
3.3 Histopatologia	20
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	29
3.5 Controle e prevenção	30
4 DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÕES	34
6 REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

A Isosporose sistêmica, anteriormente chamada de atoxoplasmose, é uma doença infecciosa causada por protozoários apicomplexos do gênero *Isospora*. Estes parasitos podem causar doenças restritas ao sistema gastrointestinal, bem como podem levar a alterações sistêmicas, causando lesões em múltiplos órgãos. Essa doença já foi relatada em uma grande variedade de espécies de Passeriformes, incluindo pardais (*Passer domesticus*) (Gill *et al.*, 2008), canários (*Serinus canaria*) (Quiroga *et al.*, 2000, Maslin e Latimer, 2009, Sánchez-Cordón *et al.*, 2007), verdilhões (*Carduelis chloris*) (Cooper *et al.*, 1989), bico-grosso-do-peito-rosa (*Pheucticus ludovicianus*) (Khan *et al.*, 1971), estorninho-de-bali (*Leucospar rothschildi*) (Partington *et al.*, 1989), diferentes espécies de tendilhões (Pennycott *et al.*, 1998) (Lindstrom *et al.*, 2009), diferentes espécies de traupídeos (Adkesson *et al.*, 2005), pássaro-riso-de-Courtois (*Dryonastes courtoisi*) (Mohr *et al.*, 2017), trinca-ferro (*Saltator similis*) (Oliveira *et al.*, 2018), pintassilgos (Gosbel *et al.*, 2020), entre outros. A isosporose sistêmica é uma importante doença protozoária e embora seja relatada com frequência em Passeriformes, a patogênese e a taxonomia do parasita vem sendo discutida há muitos anos (Cushing *et al.*, 2011).

O ciclo de vida desses coccídios tem sido o foco de estudos experimentais e descritivos, mas ainda não é completamente compreendido. Em resumo, o parasita é transmitido pela via fecal-oral (Levine, 1982) e a reprodução assexuada (merogonia) ocorre nas células intestinais e em células mononucleares (macrófagos e linfócitos), o que resulta na disseminação de merozoítos para outros órgãos (Adkesson *et al.*, 2005). A reprodução sexuada (gametogonia) ocorre nos enterócitos, principalmente no duodeno, do mesmo hospedeiro.

A forma sistêmica dessa doença é uma causa significativa de mortalidade em Passeriformes, principalmente em aves jovens e mantidas em cativeiro. O estresse causado por estar em cativeiro resulta em maior eliminação de oocistos infecciosos e pode agravar o quadro clínico (Giacomo *et al.*, 1997). Portanto, além de prejuízos econômicos em criatórios comerciais, essa doença pode ser um fator limitante em programas de reprodução de espécies ameaçadas de extinção. Os sinais clínicos são inespecíficos e incluem perda de peso, redução da musculatura peitoral, evidenciação dos ossos da quilha, penas eriçadas e diarreia (Ball *et al.*, 1998). Consequentemente, o diagnóstico e o

tratamento são desafiadores. O diagnóstico *ante mortem* é baseado na identificação do parasita dentro de células mononucleares em esfregaços de sangue, citologia e biópsias hepáticas (Adkesson *et al.*, 2005 e Cushing *et al.* 2011). O tratamento com medicamentos anti-protozoários pode ser feito, entretanto, não há estudos suficientes acerca da real eficácia (Landolfi *et al.*, 2020). Na histopatologia, diversos órgãos como intestino, fígado e baço podem apresentar infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, os quais podem conter agregados de merozoítos intracitoplasmáticos (Maslin e Latimer, 2009, Sánchez-Cordón *et al.*, 2007).

Apesar de já ter sido relatada em uma grande variedade de espécies de Passeriformes, este é o primeiro relato documentado desta doença em bicudo-verdadeiros (*Sporophila maximiliani*). Essa ave é atualmente classificada como globalmente ameaçada de extinção pela Organização Internacional União para a Conservação (IUCN) (BirdLife International 2017) e criticamente ameaçada segundo as autoridades brasileiras (Brasil, 2016). O presente relato descreve as lesões histológicas juntamente com achados moleculares de isosporose sistêmica em passeriformes de três espécies diferentes: *Sporophila maximiliani* (bicudo-verdadeiro), *Serinus canaria* (canário belga) e *Saltator similis* (trinca-ferro) de cativeiro provenientes de diferentes propriedades de Minas Gerais- Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Relato dos casos

Entre os anos de 2017-2022, 15 aves das espécies *Sporophila maximiliani* (bicudo-verdadeiro) (10/15), *Serinus canaria* (canário-belga) (4/15) e *Saltator similis* (trinca ferro) (1/15) foram recebidas para exame *post mortem* e histopatologia na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as aves morreram naturalmente e eram provenientes de criatórios comerciais ou familiares distintos localizados em Minas Gerais (Tabela 1).

Tabela 1. Casos de isosporose sistêmica recebidos na Escola de Veterinária da UFMG de 2017-2022.

Caso No.	Ano recebimento	Espécie (nome)	Família	Criatório	Idade
1	2022	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	A	Filhote
2	2022	<i>Serinus canaria</i> (canário-belga)	Fringillidae	B	Filhote
3	2022	<i>Serinus canaria</i> (canário-belga)	Fringillidae	B	Filhote
4	2022	<i>Serinus canaria</i> (canário-belga)	Fringillidae	B	Filhote
5	2022	<i>Saltator similis</i> (trinca-ferro)	Fringillidae	C	Adulto
6	2021	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	D	Adulto
7	2021	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	D	Adulto
8	2021	<i>Serinus canaria</i> (canário-belga)	Fringillidae	D	Filhote
9	2018	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	E	Adulto
10	2018	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	E	Filhote

11	2017	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	F	Adulto
12	2017	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	F	Adulto
13	2017	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	G	Adulto
14	2017	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	H	Filhote
15	2017	<i>Sporophila maximiliani</i> (bicudo-verdadeiro)	Thraupidae	H	Adulto

2.2.Histopatologia

Amostras de fígado, baço, pâncreas, proventrículo, ventrículo, intestino delgado, intestino grosso, rins, pulmões, músculo peitoral, coração e encéfalo foram colhidas, fixadas em formalina tamponada 10%, submetidas a processamento de rotina, embebidos em parafina, seccionados a 4µm e corados com hematoxilina e eosina (H&E).

2.3.Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA foi extraído de amostras de tecido congelado (fígado baço e intestino) de um caso (*Saltator similis*, caso 5) com o Kit Qiagen DNeasy (Valência, Califórnia). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar uma porção de 1.495 pb (Mugridge *et al.*, 2000; Schrenzel *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2018) da subunidade cromossômica grande de RNA ribossômico do gene 23S (rRNA 23S). Foi utilizado 0,2 µM de cada oligonucleotídeo nomeados 23S- F 5'-

TACCCGCTGAACTTAAGC-3' e 23S-R 5'-CMACCAAGATCTGCACTAG-3'. Os componentes da PCR totalizavam uma solução de 25 µl (PCR Master Mix, Promega, Madison, WI, USA) adicionando 1 µl (400 ng) do DNA total obtido na extração. O controle positivo foi obtido de amostras positivas previamente confirmadas por sequenciamento (Oliveira *et al.*, 2018) e como controle negativo foram utilizados os oligonucleotídeos juntamente com o PCR Master Mix e água ultrapura livre de nucleases. Os parâmetros de ciclos para amplificação foram: 95°C por 6 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e para extensão final 72°C por 8 minutos. Adicionalmente, foi realizada a mesma reação para o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 de 810 pb. Os oligonucleotídeos (CO1-F 5'-GGTTCAGGTGTTGGTTGGAC-3' e CO1-R 5'-AATCCAATAACCGCACCAAG-3'), com 0,2 µM de cada, foram adicionados a solução de PCR Master Mix, juntamente com 1 µl (400 ng) do DNA total obtido na extração totalizando uma solução de 25 µl. Os parâmetros de ciclos para amplificação foram: 95°C por 6 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e para extensão final 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados pelo sistema de eletroforese em cuba horizontal em gel de agarose a 1,5% contendo 1X de tampão tris-borato-EDTA e 15µl de GelRed™ coloração em gel de ácido nucleico a 120V por 70 minutos. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita por transiluminação do gel em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado a um padrão de peso molecular (LowRanger 100bp DNA Ladder- Norgen®) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

3. RESULTADOS

3.1. Sinais clínicos

Os sinais clínicos apresentados foram semelhantes em todas as aves e incluíam inapetência, plumagem eriçada, hiporexia, redução da atividade, diarreia e morte. A progressão da doença foi de dois a dez dias e a mortalidade variou entre os criatórios de 5% a 33,3%. Todos os animais viviam em gaiolas individualizadas e eram alimentados com mix de sementes e frutas.

Os canários dos casos 2, 3 e 4 eram provenientes de um criatório familiar composto por 15 animais da mesma espécie, dez adultos e cinco filhotes. Quatro filhotes morreram, mas apenas três foram encaminhados para o exame de necropsia. O início da mortalidade coincidiu com a introdução de uma nova ave adulta e da mesma espécie no local.

O bicudo-verdadeiro do caso 1 era proveniente de um criatório comercial composto por 15 aves da mesma espécie. O animal foi medicado com enrofloxacin por cinco dias, entretanto, não houve melhora clínica. No mês anterior um animal da mesma espécie que vivia em uma gaiola ao lado morreu com os mesmos sinais clínicos. Os animais dos casos 14 e 15 também receberam tratamento (toltrazuril), entretanto, não houve melhora clínica. Dos bicudos-verdadeiros dos casos 9, 10, 11, 12 e 13, foram recebidos somente fragmentos de órgãos (intestino, fígado, pulmões, coração e proventrículo) fixados em formalina tamponada 10% para exame histopatológico, não foi fornecido histórico clínicos e dados epidemiológicos.

3.2. Patologia macroscópica

Um total de 12 aves (sete bicudos-verdadeiros, quatro canários-belga e um trincaferro) foram recebidas para exame *post mortem* completo e/ou foram enviados relatórios macroscópicos juntamente com os órgãos fixados em formalina 10%. Os achados macroscópicos foram semelhantes em todos os animais. Todos os cadáveres estavam em estado leve, moderado ou acentuado de autólise. Dez dos pássaros estavam com condição corporal ruim, evidenciadas por uma quilha proeminente e músculo peitoral intensamente atrofiado, enquanto os dois restantes estavam com condição corporal regular a boa.

No exame macroscópico de dois bicudos-verdadeiros (3/7), os segmentos de duodeno e jejuno estavam com a parede difusamente branca e intensamente espessada com estenose acentuada do lúmen intestinal (Figura 1A). Em quatro aves (4/7) havia dilatação moderada a acentuada dos segmentos intestinais do duodeno e jejuno e em menor intensidade do íleo, com hiperemia difusa e moderada da serosa (Figura 1B), espessamento discreto da parede intestinal e conteúdo sanguinolento no lúmen.

Em apenas um dos canários (1/4) foram visualizadas alterações macroscópicas intestinais evidentes, a qual era caracterizada por distensão difusa e moderada de todos os segmentos intestinais, hiperemia difusa da serosa e lúmen preenchido por conteúdo

sanguinolento (Figura 1C). Em dois canários (2/4) o fígado estava moderadamente aumentado e difusamente vermelho-escuro (congestão)(Figura 2B). Em uma dessas aves (1/4) o fígado apresentou áreas multifocais a coalescentes branco-amareladas e friáveis que se aprofundavam no parênquima (Figura 2C). O pulmão (3/4) estava não colapsado, hipocreptante e difusamente vermelho. Adicionalmente, o baço de um canário estava moderadamente aumentado e vermelho-claro.

No trinca-ferro havia distensão de todos os segmentos intestinais, hiperemia difusa e moderada da serosa, espessamento moderado da parede nos segmentos de duodeno e jejuno e mucosa com áreas multifocais de hemorragia na forma de petéquias (Figura 1D). O fígado e o baço estavam discretamente aumentados e vermelho-escuros (Figura 2A). O pulmão estava não colapsado, hipocreptante e difusamente vermelho.

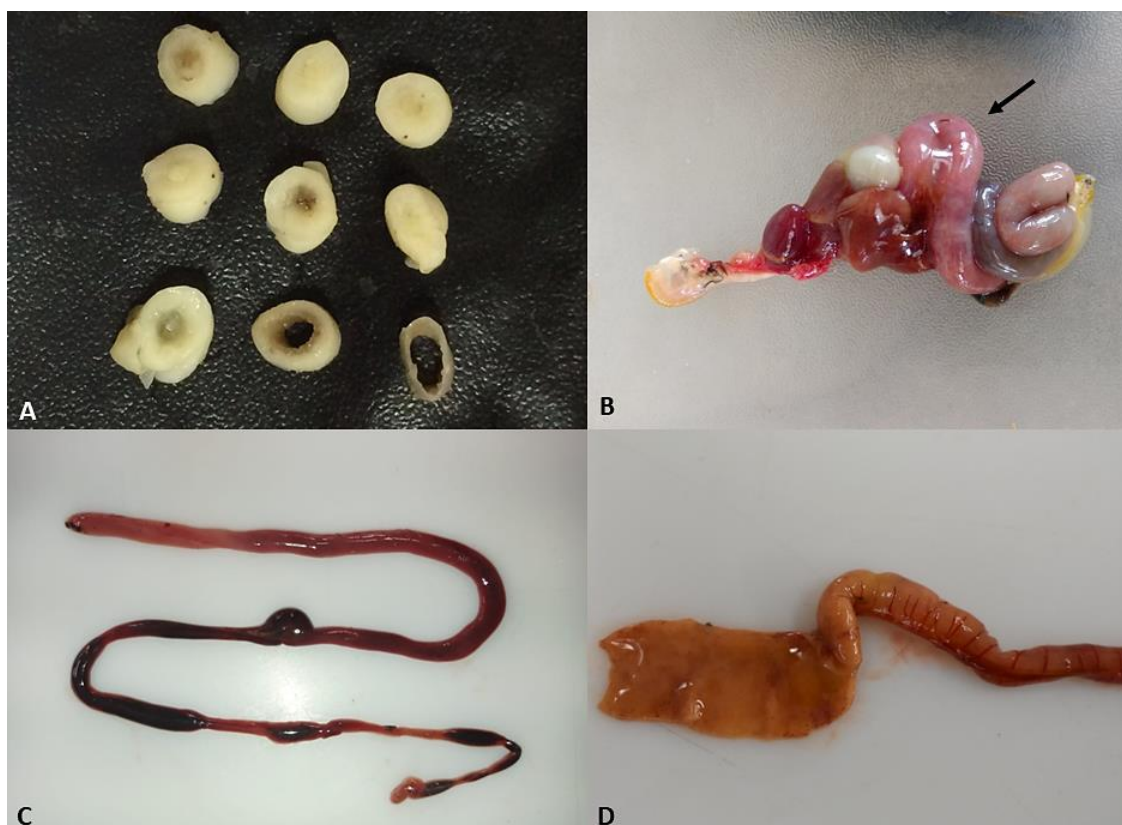


Figura 1. **A.** Imagem macroscópica de cortes transversais do intestino de um bicudo-verdadeiro (caso 14). Parede intensamente espessada com estenose acentuada do lúmen intestinal (tecido fixado em formalina). **B.** Imagem macroscópica de conjunto de órgãos de um bicudo-verdadeiro. Duodeno intensamente distendido e difusamente hiperêmico (seta). **C.** Imagem macroscópica do intestino de um canário (caso 4). Todos os segmentos intestinais intensamente congestos. **D.** Imagem macroscópica do intestino de um trinca-

ferro (caso 5). Duodeno, parede intestinal moderadamente espessada e mucosa com petéquias multifocais.



Figura 2. **A.** Imagem macroscópica de um trinca-ferro (caso 5). Fígado moderadamente aumentado e difusamente congesto (seta). Duodeno moderadamente distendido e com uma área segmentar de hiperemia na serosa (cabeça de seta). **B.** Imagem macroscópica do fígado de um canário (caso 2). Fígado moderadamente aumentado e difusamente congesto. **C.** Imagem macroscópica do fígado de um canário (caso 4). Fígado moderadamente aumentado e com áreas multifocais a coalescentes branco-amareladas a cinzas e friáveis (necrose) (seta).

3.3.Histopatologia

As alterações no intestino foram semelhantes em 13 das 15 aves com variação na intensidade e distribuição de lesões (Tabela 2) (Figura 3). Lesões intestinais acentuadas

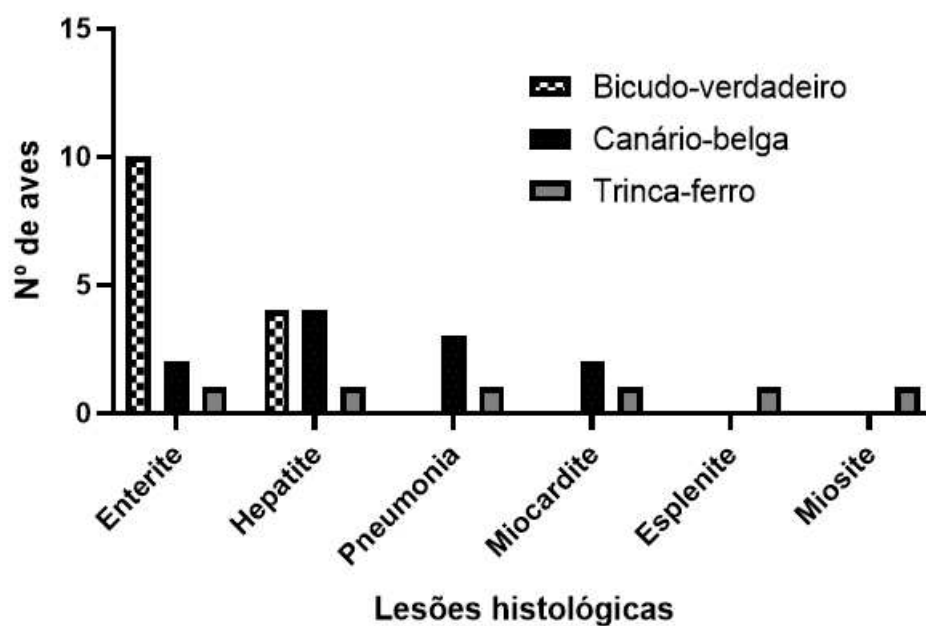
foram observadas em dez aves (10/13), e estavam localizadas nos segmentos de duodeno, jejuno e íleo. Nestes casos houve substituição e desorganização transmural da arquitetura do órgão, com perda da conformação das vilosidades e criptas intestinais por intenso infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos e em menor quantidade por macrófagos. Nestas aves, ocasionalmente o infiltrado inflamatório ultrapassava a parede intestinal e estendia-se até a superfície serosa (Figura 4). Lesões leves a moderadas foram observadas em três aves (3/13) e estavam localizadas principalmente nos segmentos intestinais de duodeno e jejuno. Essas lesões consistiam em expansão moderada a acentuada da lâmina própria e substituição de criptas por infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos e macrófagos e deposição moderada de fibrina entremeada ao infiltrado. Não havia infiltrado inflamatório transmural e nem perda da arquitetura das vilosidades. Em todas as secções analisadas foram visualizadas, no interior de macrófagos e linfócitos, células epiteliais e extracelulares, merozoítos de 2-3 μm , arredondados, basofílicos e envoltos por um halo claro (Figura 5).

Lesões hepáticas foram observadas em nove aves (9/15) e foram caracterizadas por áreas extensas e multifocais aleatórias de perda e substituição de hepatócitos por infiltrado inflamatório composto por linfócitos, macrófagos e em menor quantidade por heterófilos. No citoplasma de macrófagos e extracelulares havia quantidade variável de merozoítos. Em uma ave (1/9), associado ao infiltrado inflamatório, havia áreas multifocais a coalescentes de necrose (Figuras 6 e 7).

Em três aves (3/15) foram observadas lesões pulmonares de pneumonia intersticial linfocitária e histiocitária difusa acentuada associada a merozoítos intra-histiocitários e extracelulares (Figura 8). Alterações histológicas cardíacas de miocardite e epicardite linfo-histiocitária foram observadas em duas aves (2/15) (Figuras 9 e 10). Na ave 5 (trinca-ferro), além de lesões intestinais, hepáticas e cardíacas, havia esplenite e miosite linfo-histiocitária multifocal a coalescente moderada associada a merozoítos intra-histiocitários.

Tabela 2. Classificação das lesões histológicas intestinais de acordo com a intensidade.

Intensidade das lesões histológicas intestinais	Bicudo-verdadeiro	Canário-belga	Trinca-ferro
Acentuada	8	2	0
Moderada	1	0	1
Leve	1	0	0

**Figura 3.** Gráfico de distribuição de lesões de acordo com as espécies acometidas.

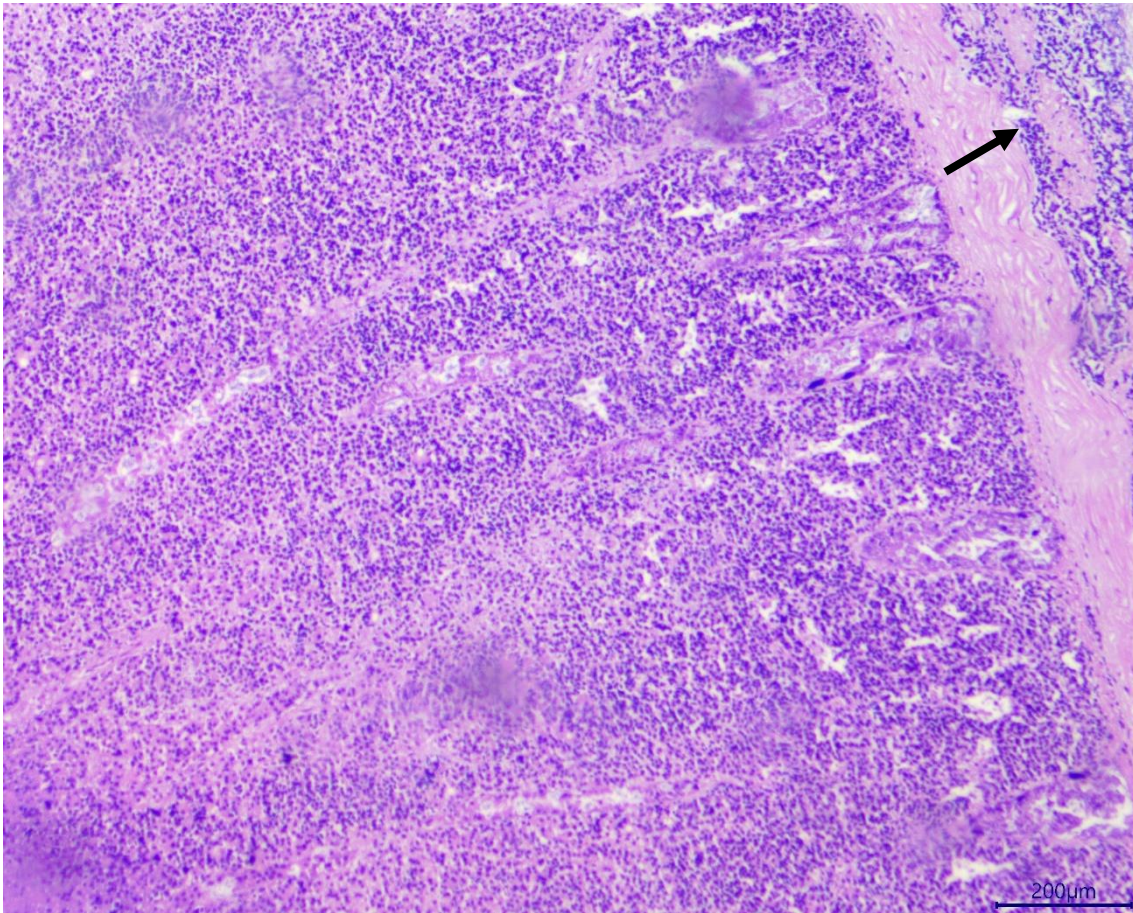


Figura 4. Imagem microscópica de corte transversal do duodeno de um bicudo-verdadeiro (caso 14) evidenciando espessamento intenso de lâmina própria por infiltrado inflamatório linfocitário que substitui o tecido normal e se estende até a camada serosa (seta) (H&E 10x).

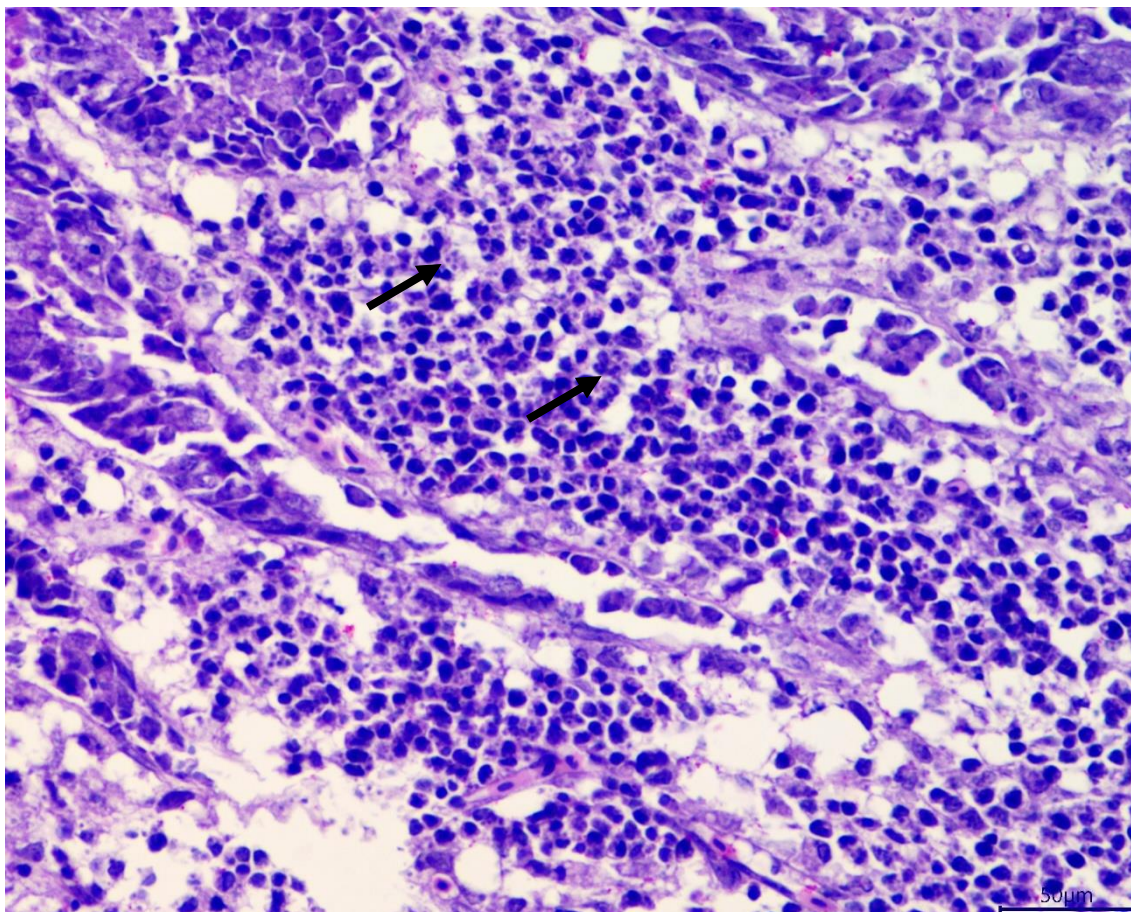


Figura 5. Imagem microscópica do duodeno de um trinca-ferro (caso 5). Lâmina própria intensamente espessada por infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos, associado a intensa quantidade de merozoítos de *Isospora* spp. no interior de macrófagos e linfócitos (setas) (H&E 40x)

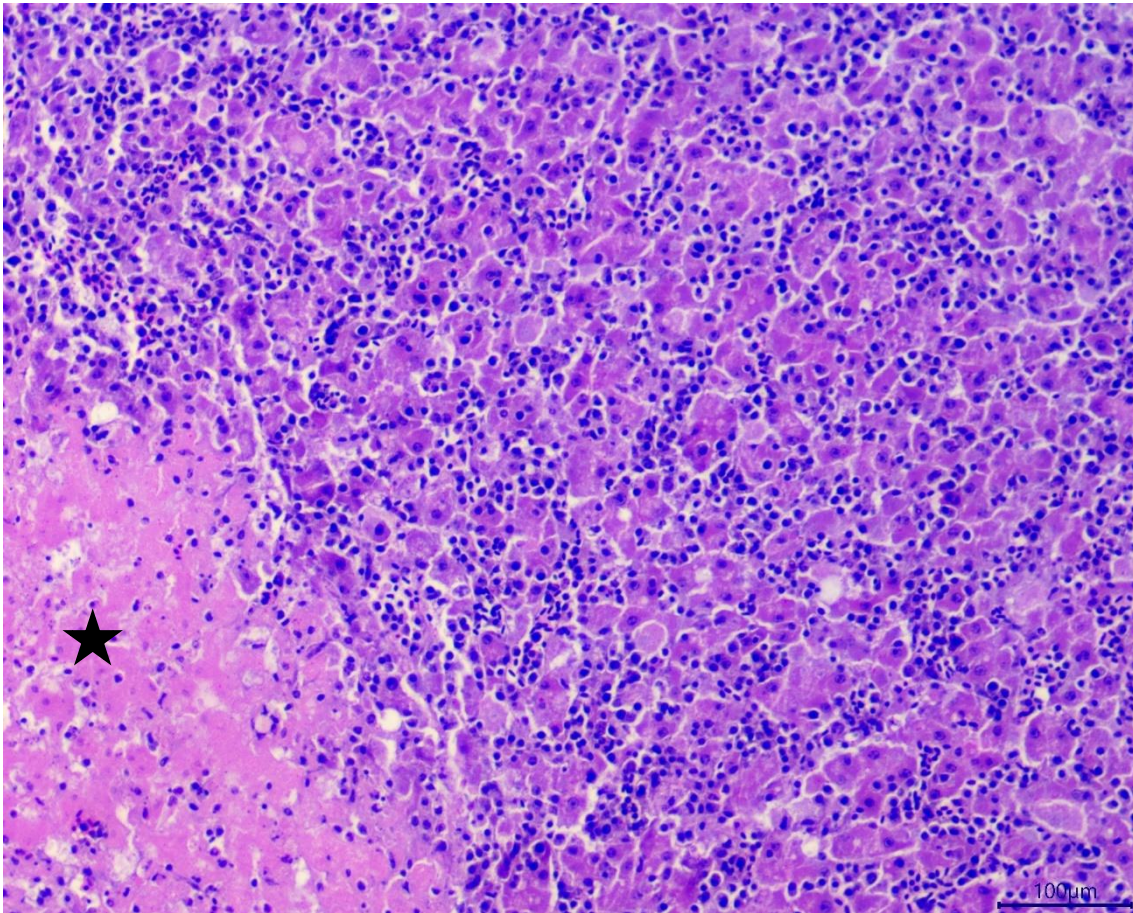


Figura 6. Imagem microscópica do fígado de um canário (caso 4). Infiltrado inflamatório linfocitário acentuado entre os cordões de hepatócitos. Área focalmente extensa de necrose de hepatócitos associado com fibrina e restos celulares (estrela) (H&E 20x).

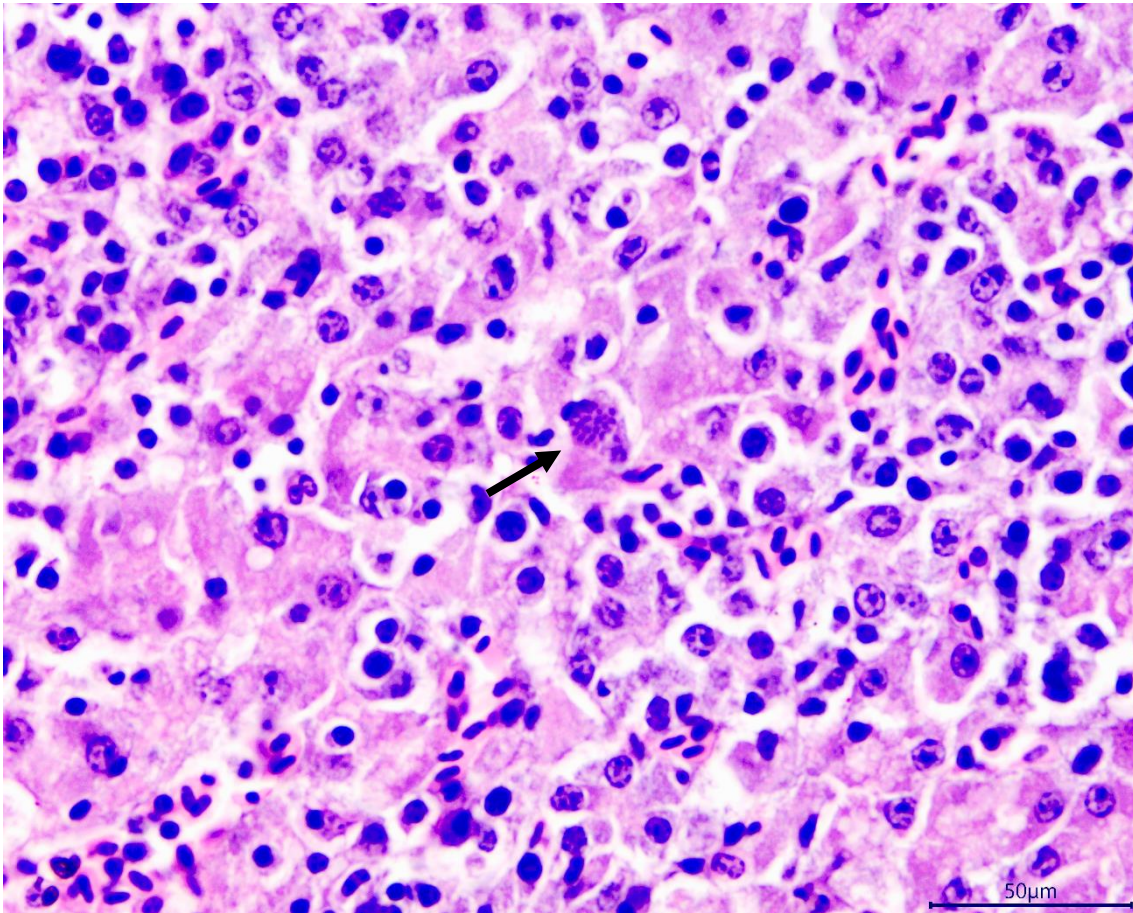


Figura 7. Imagem microscópica do fígado de um canário (caso 4). Desorganização da arquitetura normal do órgão e substituição por infiltrado inflamatório linfo-histiocitário associado a merozoítos de *Isospora* spp. intracitoplasmáticos (seta) (H&E 60x).

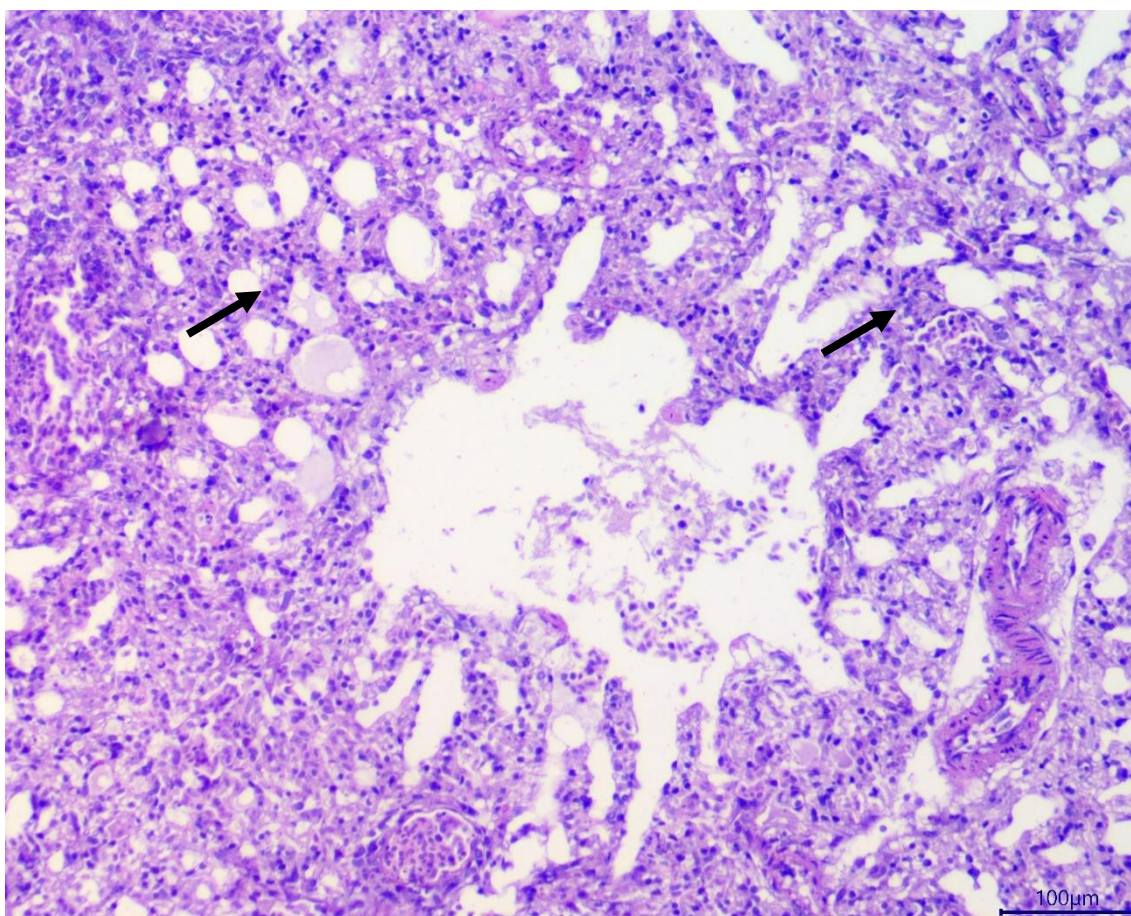


Figura 8. Imagem microscópica do pulmão de um canário (caso 3). Septos dos capilares aéreos moderadamente espessados por infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário (setas) (H&E 20x).

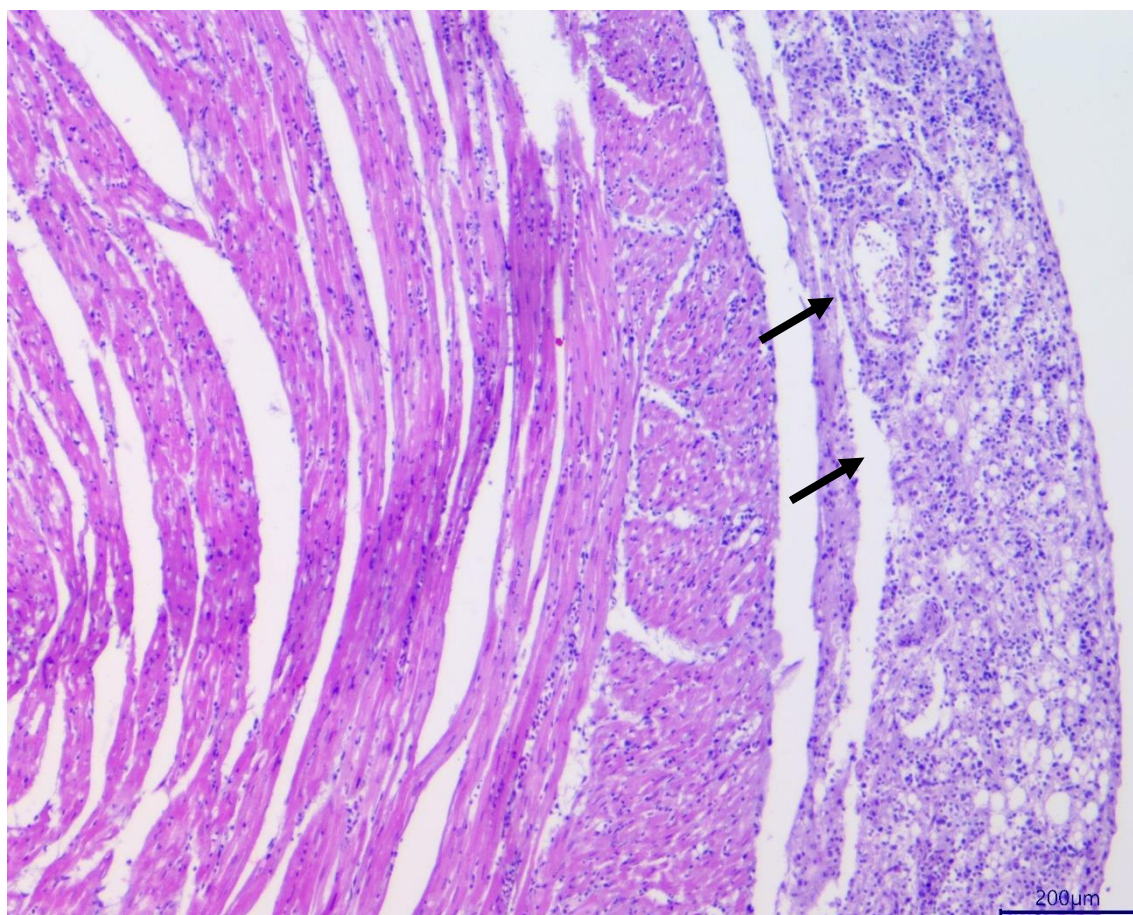


Figura 9. Imagem microscópica do coração de um canário (caso 2). Epicárdio intensamente espessado por infiltrado inflamatório linfo-histiocitário (setas) que se estende discretamente para o miocárdio (H&E 10x).

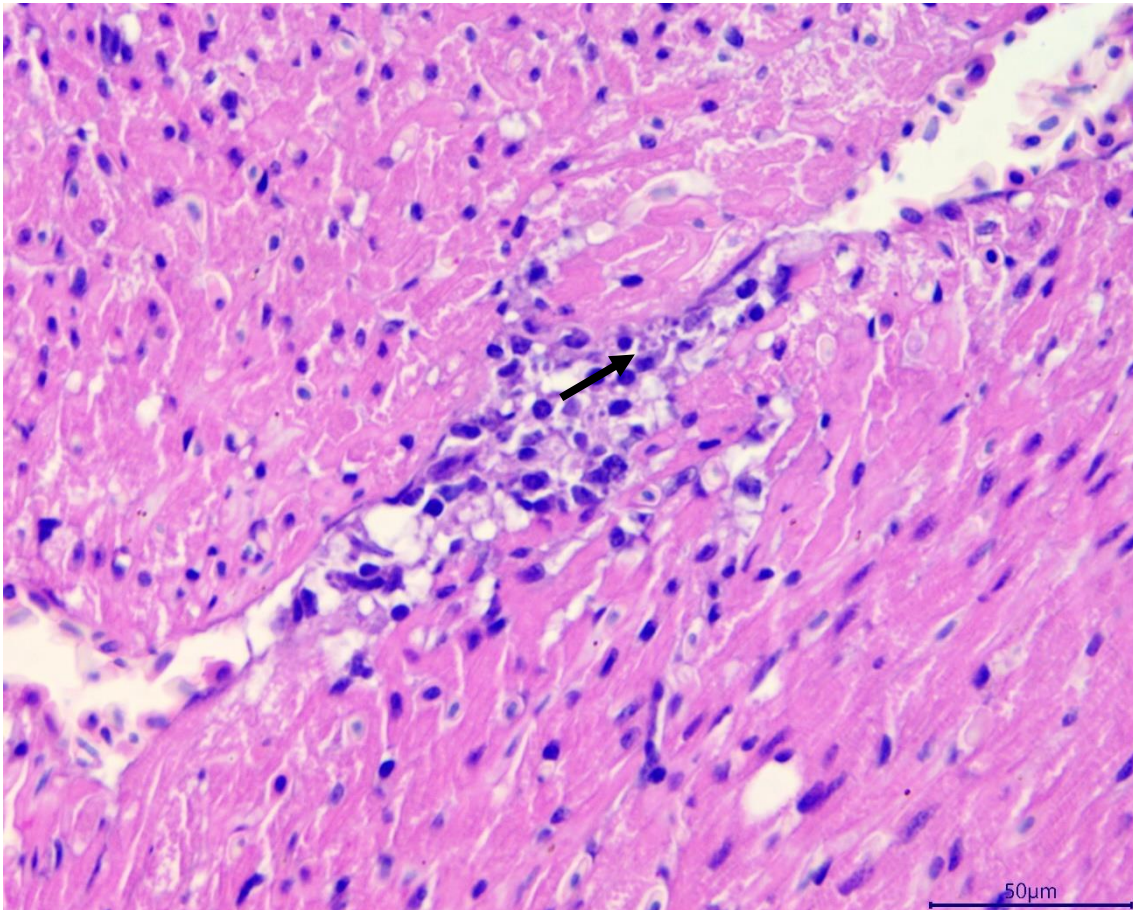


Figura 10. Imagem microscópica do coração de um trinca-ferro. Infiltrado inflamatório linfocitário discreto entre dos cardiomiócitos. Evidenciado pela seta há merozoítos de *Isospora* spp. intralesionais (H&E 60x).

3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para o caso 5 (trinca-ferro) obteve-se resultado positivo (amplificação) para PCR tanto para a subunidade cromossômica grande de RNA ribossômico do gene 23S (rRNA 23S) (Figura 11A) quanto para o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (Figura 11B). Esse resultado confirma a infecção por *Isospora* spp. nesta ave, entretanto, a análise de sequenciamento genético é necessária para evidenciar a espécie específica deste agente.

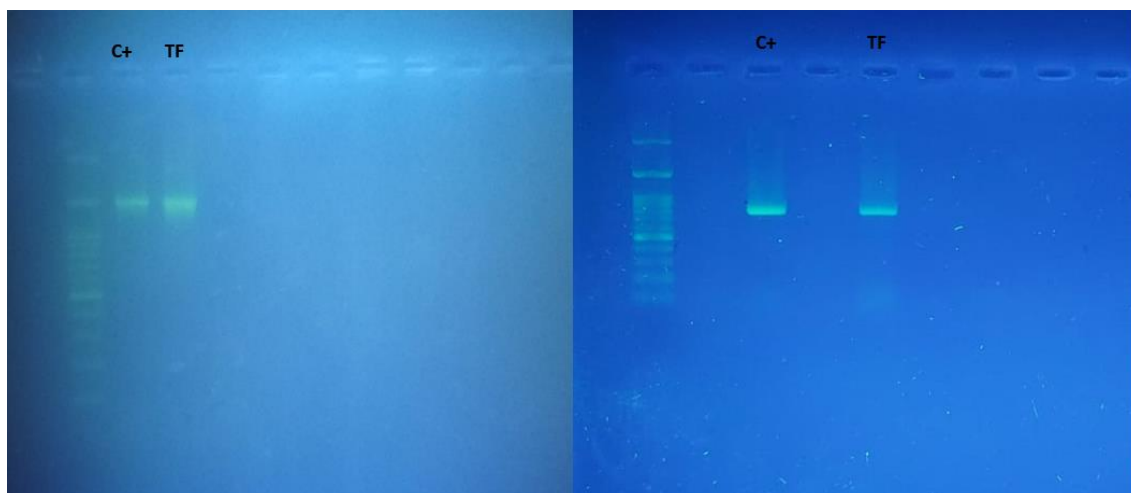


Figura 11. A. Gel de eletroforese sob luz ultravioleta demonstrando uma banda positiva para a subunidade cromossômica grande de RNA ribossômico do gene 23S (TF: amostra). **B.** Gel de eletroforese sob luz ultravioleta demonstrando uma banda positiva para o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (TF: amostra).

3.5. Controle e prevenção

Após a confirmação do diagnóstico, foi recomendado para os criatórios A, B e C o tratamento do restante das aves, bem como um manejo sanitário e ambiental adequado. Para as aves foi recomendado a utilização de toltrazuril por via oral durante 14 dias. Para o ambiente foi recomendado higiene e desinfecção de todas as gaiolas, instalações e utensílios, bem como evitar alojar muitos indivíduos e prover água e dieta de boa qualidade. Durante o período de tratamento e após não morreu mais nenhuma ave nos três criatórios.

4. DISCUSSÃO

A isosporose entérica é uma doença comum em diversas ordens de aves, entretanto, a isosporose sistêmica ocorre apenas em aves da ordem Passeriformes (Flach *et al.*, 2022). Esta é a maior e mais diversa ordem de aves, mais da metade de todas as aves são classificadas nesta ordem (Trupklewicz *et al.*, 2018). Embora haja muitos relatos desta doença em uma grande variedade de espécies, ainda há lacunas a serem preenchidas quanto à taxonomia e patogênese destes coccídeos.

Desde os primeiros relatos deste parasita em 1909, há um debate considerável

sobre como ele deveria ser classificado. Desde então, a isosporose sistêmica já foi atribuída a parasitas do gênero *Haemoproteus*, *Toxoplasma*, *Atoxoplasma* e *Lankesterella*. Em 1950, Garnham propôs o nome *Atoxoplasma*, pois considerou-se que este nome abordava o fato de que o parasita se assemelhava ao *Toxoplasma*, mas não era *Toxoplasma* (Levine *et al.*, 1982). Desde então, foi determinado que esses parasitos pertencem à família Eimeriidae e se assemelham a *Isospora* spp.

Ambos os oocistos contêm dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (Box, 1975). Inicialmente alguns estudos indicaram que existiam espécies de *Isospora* em que os ciclos de vida eram exclusivamente intestinais e outras espécies diferentes com ciclos de vida que incluíam um estágio de merogonia extraintestinal (manifestação sistêmica) (Box, 1977). Entretanto, estudos moleculares recentes apontam que as formas sexuais e assexuadas intestinais e os merozoítos extraintestinais podem ser diferentes estágios do ciclo de vida de um mesmo organismo (Schrenzel *et al.*, 2005). Os fatores que determinam o estágio extraintestinal do parasito permanecem incertos, mas podem estar relacionados com linhagens específicas desses coccídios, idade e diferentes níveis de estresse fisiológico a que essas aves são submetidas (Schrenzel *et al.*, 2005). Na natureza, esses parasitas são endêmicos em níveis teciduais baixos (van Riper *et al.*, 1987, Flech *et al.*, 2022), porém é provável que os níveis teciduais estejam subestimados devido à dificuldade em identificar os merozoítos circulantes (Middleton *et al.*, 1983). A isosporose sistêmica tornou-se uma das principais causas de mortalidade em zoológicos e instalações de pesquisa que utilizam colônias de aves passeriformes capturadas na natureza (Rossi *et al.*, 1997). O estresse de estar em cativeiro e as más condições sanitárias foram identificadas como causas que contribuem para a alta morbidade nessas instalações (McNamee *et al.*, 1995, Flech *et al.*, 2022). No presente relato, todos os animais avaliados eram de cativeiro e provavelmente o estresse atribuído por estar nessas instalações contribuiu para o avançado quadro clínico e morte desses animais.

Embora a isosporose sistêmica tenha sido relatada em muitas espécies de passeriformes, no Brasil os relatos não são frequentes e doença nunca foi documentada em bicudos-verdadeiros. O bicudo ou pintinho-de-bico-grande, *Sporophila maximiliani*, é considerado ameaçado de extinção devido a rápida redução de sua população nativa em geral, com amplas áreas de extirpação completa no sudeste do Brasil (BirdLife International, 2023). Este passeriforme resiste a pressões da captura intensiva, uma vez que é muito apreciado como animal de estimação, sofrendo com comércio ilegal e

também com a degradação do seu habitat (Destro *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2015). Este relato documenta casos de isosporose sistêmica causando doença fatal em dez bicudos-verdadeiros de cativeiro. Atualmente no Brasil há programas de conservação de bicudos-verdadeiros *ex-situ*, ou seja, há programas que estabelecem áreas protegidas para criação dessas aves em cativeiro prevendo sua reintrodução na natureza (Machado *et al.*, 2013). Portanto, a isosporose sistêmica deve ser considerada como uma doença importante em programas de conservação *ex-situ* para essa espécie. Embora a maioria das linhagens de parasitas sejam provavelmente específicas do hospedeiro, a transmissão interespecie pode ocorrer e merece consideração no manejo de passeriformes, especialmente espécies ameaçadas de extinção (Schrenzel *et al.*, 2005).

A isosporose sistêmica pode acometer tanto aves jovens quanto adultas (Adkesson *et al.*, 2005). Estudos sugerem que estágios extraintestinais desses cocídeos são altamente patogênicos para aves jovens, com mortalidade chegando a 80% (Adkesson *et al.* 2005, Jamriška *et al.*, 2013). No presente caso não houve diferença relevante do número de casos em filhotes e adultos, 53% dos animais eram filhotes e 47% eram adultos. Entretanto, os canários 2, 3 e 4 eram provenientes de um mesmo criatório familiar, e nesse local a mortalidade em filhotes foi de 80% (4/5). Adicionalmente, o início da mortalidade coincidiu com a introdução de uma ave adulta e da mesma espécie no local. Estudos indicam que aves adultas podem não apresentar sinais clínicos e eliminar grande quantidade de oocistos infectantes no ambiente (Maslin e Latimer 2009).

Não foram realizados exames de pesquisa de oocistos nas fezes da ave adulta, entretanto, é possível que esse animal tenha sido a fonte de infecção para os filhotes. Além da exposição a animais infectados, a infecção e doença podem ser influenciadas por outras condições de criação (por exemplo, aglomeração, saneamento abaixo do ideal com acumulação de oocistos infectados e estresse) (Maslin e Latimer 2009). Os relatórios epidemiológicos obtidos para esse estudo foram incompletos, contudo, é possível que algum desses fatores de risco ou um conjunto deles esteja relacionado com a mortalidade das outras aves.

O diagnóstico de isosporose sistêmica baseia-se na localização do parasita dentro de macrófagos e linfócitos em esfregaços de sangue, esfregaços de impressão de órgãos e biópsias de fígado (Adkesson *et al.* 2005, Maslin e Latimer, 2009, Cushing *et al.*, 2011). A avaliação citológica de aspirados com agulha fina do fígado em aves com hepatomegalia também pode ser usado (Máinez e Juan-Sallés, 2016). Entretanto, esses

procedimentos de diagnóstico têm limitações, devido ao tamanho reduzido, à fragilidade e à maior susceptibilidade ao estresse que estas aves apresentam (Sanchez e Godoy, 2014). A identificação de oocistos esporulados nas fezes por flutuação de rotina pode ser realizado, entretanto, esses oocistos são eliminados de maneira intermitente, o que pode gerar resultados falso negativos (Terio e Adkesson, 2019).

A condição corporal de aves com isosporose sistêmica pode variar de acordo com o curso da doença. Em casos em que o curso da doença é mais longo a condição corporal é ruim devido ao intenso acometimento intestinal, o que prejudica a absorção de nutrientes (Terio e Adkesson, 2019). Estudos demonstraram uma ligação estatisticamente significativa entre o aumento da espessura da lâmina própria do intestino causado pela infiltração linfocitária e o peso de pintassilgos infectados com isosporose sistêmica (Gosbel *et al.*, 2020). A condição corporal destes animais pode ser normal em casos agudos da doença (Terio e Adkesson, 2019), constatação que pode justificar a diferença de condição corporal observada nos animais deste relato.

Em fringílídeos e traupídeos, as lesões macroscópicas mais consistentes são espessamento acentuado do duodeno, esplenomegalia, hepatomegalia e atrofia de tecido adiposo e músculos esqueléticos (Terio e Adkesson, 2019). No presente caso foram observadas variações na apresentação macroscópica dos intestinos avaliados. A hiperemia da serosa e presença de hemorragia na mucosa e no lúmen foram os achados mais consistentes.

Dependendo da espécie hospedeira e do estágio da infecção, a ocorrência de lesões histológicas podem ser mais variáveis entre os órgãos. No intestino, podem ser encontradas lesões de diferentes intensidades e localizações, desde lesões moderadas a leves com infiltrado inflamatório restrito a lâmina própria associado a necrose e hemorragia (Oliveira *et al.*, 2018; Terio e Adkesson, 2019) até lesões graves com infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário que se estende da lâmina própria até a serosa, semelhante ao linfoma (Cushing *et al.*, 2011). Ainda há divergências na literatura com relação a natureza da lesão intestinal acentuada. Nestes casos há um desafio diagnóstico para distinguir linfoma intestinal e enterite linfocitária. A presença do agente intralesional e a ausência de evidências conclusivas de transformação neoplásica dessas células, como a clonalidade das células infiltrativas, suportam a teoria de que se trata de lesões inflamatórias.

Em 8/10 dos bicudos-verdadeiros deste relato foram observadas lesões intestinais

acentuadas constituídas por numerosos linfócitos e macrófagos transmuralis e as lesões em outros órgãos foram escassas. Tendo em vista que este é o primeiro relato documentado em bicudos-verdadeiros, pode ser que esta seja a apresentação mais comum desta doença nesta espécie. Em trinca-ferros essa doença afeta principalmente o baço, o fígado e o intestino delgado, entretanto, lesões em rins, coração e pulmão também podem ser encontradas (Oliveira *et al.*, 2018). No presente caso os achados no trinca-ferro (caso 5) foram semelhantes com alterações em diversos órgãos e com predomínio em intestino delgado, fígado, baço e coração.

Os protocolos de tratamento recomendados são amplamente empíricos e variam muito em eficácia, pois os medicamentos afetam a produção de oocistos, mas não influenciam nos estágios intracelulares (Landolfi *et al.*, 2020). Foi demonstrado que o tratamento com toltrazuril é eficaz contra os estágios intestinais da isosporose sistêmica. Entretanto, ainda não há evidências de que os estágios extraintestinais do parasita são eliminados totalmente pelo Toltrazuril (Jamriška *et al.*, 2013). Há relatos de melhora do quadro clínico e sobrevivência de aves infectadas após o tratamento com toltrazuril combinado com a enrofloxacina (Campos *et al.*, 2017). Dois animais deste relato receberam tratamento com toltrazuril e não houve melhora clínica, entretanto, não foi informado nos relatórios clínicos se a dosagem e os dias de tratamento foram adequados.

5. CONCLUSÕES

A associação de achados macroscópicos, microscópios e por PCR possibilitaram o diagnóstico definitivo da ocorrência de isosporose sistêmica nas aves do presente estudo. A isosporose sistêmica em bicudos-verdadeiros é uma doença que afeta principalmente o intestino delgado, no qual causa lesão grave com infiltrado intenso de linfócitos e macrófagos transmural. Seguido do intestino, o fígado também é frequentemente acometido. Ainda não se sabe do impacto dessa doença em populações de bicudos-verdadeiros de vida livre. Entretanto, esse relato demonstra a importância dessa doença em populações de cativeiro. As alterações histológicas nos canários e no trinca-ferro são semelhantes as relatadas anteriormente e canários jovens são possivelmente mais sensíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adkesson MJ, Zdziarski JM, Little SE. Atoxoplasmosis in tanagers. *J Zoo Wildl Med.* 2005;36:265–272. DOI: 10.1638/03-091.1.
2. Ball SJ, Brown MA, Daszak P, Pittilo RM. Atoxoplasma (Apicomplexa: Eimeriorina: Atoxoplasmatidae) in the greenfinch (*Carduelis chloris*). *J Parasitol.* 1998 Aug;84(4):813-7. PMID: 9714216.
3. BirdLife International. Species factsheet: *Sporophila maximiliani*. [Internet]. Downloaded from <http://datazone.birdlife.org/species/factsheet/great-billed-seed-finch-sporophila-maximiliani> on 2023 Nov 16.
4. Brasil (2016) Sumário executivo—Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção.
5. Campos SDE, Machado CSC, de Souza TVT, Cevalrolli RC, Almosny NRP. Extraintestinal isosporoid coccidian causing atoxoplasmosis in captive green-winged saltators: clinical and hematological features. *Pesq Vet Bras.* 2017 Nov;37(11):1327-1330. doi: 10.1590/S0100-736X2017001100021.
6. Cooper JE, Gschmeissner S, Greenwood AG. Atoxoplasma in greenfinches (*Carduelis chloris*) as a possible cause of “going light.” *Vet Rec.* 1989;124(5):343–344. DOI: 10.1136/vr.124.13.343.
7. Cushing TL, Schat KA, States SL et al. Characterization of the host response in systemic Isosporosis (Atoxoplasmosis) in a Colony of captive American goldfinches (*Spinus tristis*) and house sparrows (*Passer domesticus*). *Vet Path.* 2011;985:985–992. DOI: 10.1177/0300985810391114.

8. Destro GFG, Lucena T, Monti R, et al. Efforts to combat wild animals trafficking in Brazil. In: Lameed GA, editor. Biodiversity enrichment in a diverse world. Intech Open, London; 2012. p. 33–36. <http://dx.doi.org/10.5772/48351>.
9. Destro GFG, Lucena T, Monti R, et al. Eforts to combat wild animals trafcking in Brazil. In: Lameed GA, editor. Biodiversity enrichment in a diverse world. Intech Open, London; 2012. pp 33–36. <http://dx.doi.org/10.5772/48351>.
10. Flach EJ, Dodhia HS, Guthrie A, Blake DP. Systemic isosporiasis (atoxoplasmosis) in passerine birds at the Zoological Society of London, London Zoo. *J Zoo Wildl Med*. 2022 Mar;53(1):70-82. doi: 10.1638/2021-0087. PMID: 35339151.
11. Giacomo R, Stefania P, Ennio T, Giorgina VC, Giovanni B, Giacomo R. Mortalidade em filhotes pretos (*Carduelis atrata*) com coccidiose sistêmica. *J Wildl Dis*. 1997;33:152–157.
12. Gill H, Paperna I. Proliferative visceral Isospora (atoxoplasmosis) with morbid impact on the Israeli sparrow (*Passer domesticus biblicus* Hartert, 1904). *Parasitol Res*. 2008;103(3):493–499. DOI: 10.1007/s00436-008-0986-4.
13. Gosbell MC, Olaogun OM, Luk K, Noormohammadi AH. Investigation of systemic isosporosis outbreaks in an aviary of greenfinch (*Carduelis chloris*) and goldfinch (*Carduelis carduelis*) and a possible link with local wild sparrows (*Passer domesticus*). *Aust Vet J*. 2020 Jul;98(7):338-344. doi: 10.1111/avj.12947. Epub 2020 May 20. PMID: 32430906.

14. Jamriška J, Lavilla LA, Thomasson A, Barbon AR, Lopéz JF, Modrý D. Treatment of atoxoplasmosis in the Blue-crowned Laughing Thrush (*Dryonastes courtoisi*). *Avian Pathol.* 2013;42(6):569-571. doi:10.1080/03079457.2013.854309.
15. Khan RA, Desser SS. Avian Lankesterella infections in Algonquin Park, Ontario. *Can J Zool.* 1971;49(8):1105–1110.
16. Khan RA, Desser SS. Avian Lankesterella infections in Algonquin Park, Ontario. *Can J Zool.* 1971;49(8):1105–1110. DOI: 10.1139/z71-171.
17. Landolfi JA, Adkesson MJ, Ahmed N, Smith CR, Smith RL, Snyder T, Terio KA. A QPCR assay and testing guidelines for the molecular diagnosis of systemic isosporosis (formerly atoxoplasmosis) in passerine birds. *J Zoo Wildl Med.* 2020 Jun;51(2):391-397. doi: 10.1638/2019-0176. PMID: 32549570.
18. Levine ND. The genus *Atoxoplasma* (Protozoa, Apicomplexa). *J Parasitol.* 1982 Aug;68(4):719-23. PMID: 7119994.
19. Lindstrom KM, Dolnik O, Yabsley M, Hellgren O, O'Connor B, Parn H, Foufopoulos J. Feather mites and internal parasites in small ground finches (*Geospiza fuliginosa*, Emberizidae) from the Galapagos Islands (Ecuador). *J Parasitol.* 2009;95(1):39–45.
20. Machado RB, Silveira LF, Gomes da Silva MIS, Ubaid FK, Medolago CA, Francisco MR, Dianese JC. Reintroduction of songbirds from captivity: the case of the Great billed Seed finch (*Sporophila maximiliani*) in Brazil. *Biodivers Conserv.* 2019. doi:10.1007/s10531-019-01830-8.
21. Maínez Ferrández M, Juan- Sallés C, Cardona T, Such R, Hernández A. Citología hepática para el diagnóstico y seguimiento de atoxoplasmosis en jilgueros (*Carduelis carduelis major*). XV Congreso de Especialidades Veterinarias, 8 y 9 de abril de 2016, Zaragoza.

22. Maslin WR, Latimer KS. Atoxoplasmosis in canary fledglings: severe lymphocytic enteritis with preferential parasitism of B lymphocytes. *Avian Dis.* 2009;3:473-476. DOI: 10.1637/8557-121008-Case.1.
23. McNamee P, Pennycott T, McConnel S. Clinical and pathological changes associated with atoxoplasma in a captive bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*). *Vet Rec.* 1995; 136(3):221–222. DOI: 10.1136/vr.136.9.221.
24. Middleton AL, Julian RJ. Lymphoproliferative disease in the American goldfinch, *Carduelis tristis*. *J Wildl Dis.* 1983 Jul;19(3):280-5. doi: 10.7589/0090-3558-19.3.280. PMID: 6644928.
25. Mohr F, Betson M, Quintard B. Investigation of the presence of *Atoxoplasma* spp. in Blue-crowned Laughingthrush (*Dryonastes courtoisi*) adults and neonates. *J Zoo Wildl Med.* 2017;48(1):1–6. doi:10.1638/2016-0044.1.
26. Mugridge NB, Morrison DA, Jäkel T, Heckerroth AR, Tenter AM, Johnson AM. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family Sarcocystidae. *Mol Biol Evol.* 2000 Dec;17(12):1842-53. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026285. PMID: 11110900.
27. Oliveira AR, Souza TD, Mol JPS, Flecher MC, Hiura E, Santos RL. Pathological and molecular characterization of systemic isosporosis (atoxoplasmosis) in captive green-winged saltator (*Saltator similis*). *Vet Parasitol.* 2018 May 15;255:98-101. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.04.007. Epub 2018 Apr 13. PMID: 29773145.

28. Partington CJ, Gardiner CH, Fritz D, Phillips LG, Montail RJ. Atoxoplasmosis in Bali mynahs (*Leucospa rothschildi*). *J Zoo Wildl Med*. 1989;20(3):328–335. DOI:10.2307/41262613.
29. Pennycott TW, Ross HM, McLaren IM, Park A, Hopkins GF, Foster G. Causes of death of wild birds of the family Fringillidae in Britain. *Vet Rec*. 1998;143(3):155–158. DOI: 10.1136/vr.143.6.155.
30. Quiroga MI, Aleman N, Vazquez S, Nieto JM. Diagnosis of atoxoplasmosis in a canary (*Serinus canarius*) by histopathologic and ultrastructural examination. *Avian Dis*. 2000;44:465–469. PMID: 10879930.
31. Rossi G, Perrucci S, Taccini E, Vitali CG, Braca G, Renzoni G. Mortality in black siskins (*Carduelis atrata*) with systemic coccidiosis. *J Wildl Dis*. 1997 Jan;33(1):152-7. doi: 10.7589/0090-3558-33.1.152.
32. Sanches TC, Godoy SN. Passeriformes (Canário, Sabiá, Pássaro-preto e Trinca ferro). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editors. *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*, 2 ed. São Paulo: Roca; 2014. p. 698-715.
33. Sánchez-Cordón PJ, Gómez-Villamandos JC, Gutiérrez J, Sierra MA, Pedrera M, Bautista MJ. Atoxoplasma spp. infection in captive canaries (*Serinus canaria*). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2007;54(1):23–26. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2007.00909.x.
34. Schrenzel MD, Maalouf GA, Gaffney PM, Tokarz D, Keener LL, McClure D, Griffey S, McAloose D, Rideout BA. Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. *J Parasitol*. 2005 Jun;91(3):635-47. doi: 10.1645/GE-3310. PMID: 16108559.
35. Terio KA, Adkesson MJ. Systemic isosporosis in passerine birds. In: Miller ER, Lamberski N, Calle P (eds.). *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*, Volume 9. St. Louis (MO): Elsevier; 2019. p. 454–458. <https://doi.org/10.1638/2021-0087>.

36. Trupklewicz J, Garner MM, Juan-Sallés C. Passeriformes, Caprimulgiformes, Coraciiformes, Piciformes, Bucerotiformes e Apodiformes. In: Terio KA, McAloose D, St. Leger J (eds.). Patologia da vida selvagem e dos animais do zoológico. São Luís (MO): Elsevier; 2018. pág. 799–823. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805306-5.00033-X>. Box ED. Exogenous stages of *Isospora serini* (Aragão) and *Isospora canaria* sp. n. in the canary (*Serinus canarius* Linnaeus). J Protozool. 1975 May;22(2):165-9. doi: 10.1111/j.1550-7408.1975.tb05844.x. PMID: 1151906.
37. van Riper C 3rd, van Riper S, Laird M. Discovery of Atoxoplasma in Hawaii. J Parasitol. 1987 Oct;73(5):1071-3. PMID: 3656008.