

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



PREVALÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS DO GÉNERO *Trichomonas* EM AVES
SELVAGENS EM CENTROS DE RECUPERAÇÃO DE PORTUGAL

ANDREIA FILIPA MARQUES GONÇALVES

ORIENTADOR(A):

Doutor Luís Manuel Madeira de
Carvalho

TUTOR(A):

Mestre Ana Filipa Lopes

2023

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



PREVALÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS DO GÉNERO *Trichomonas* EM AVES
SELVAGENS EM CENTROS DE RECUPERAÇÃO DE PORTUGAL

ANDREIA FILIPA MARQUES GONÇALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Jorge Manuel Jesus Correia

ORIENTADOR(A):

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

VOGAIS:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor José Alexandre Costa Perdigão

Cameira Leitão

TUTOR(A):

Mestre Ana Filipa Lopes

2023

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Andreia Filipa Marques Gonçalves

Título da Tese ou Dissertação: PREVALÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS DO GÉNERO *Trichomonas* EM AVES SELVAGENS EM CENTROS DE RECUPERAÇÃO DE PORTUGAL

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2023

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

Clínica

Produção Animal e Segurança Alimentar

Morfologia e Função

Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 12 de junho de 2023

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: _____ Andreia Gonçalves _____

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, à minha tutora Dra. Ana Filipa Lopes e ao Centro de Recuperação de Animais Selvagens de Santo André (CRASSA), em particular à bióloga Carolina Nunes, por toda a ajuda, ensinamentos e, sobretudo, paciência durante este período de estágio e escrita da dissertação.

Agradeço aos meus amigos da Covilhã e arredores e à minha família, destacando a minha irmã e os meus pais, por serem os pilares da minha vida e por nunca me deixarem desistir.

Às equipas do CRASSA e do CERAS, voluntários inclusive, por terem apoiado e contribuído para este projeto, desde a ajuda na colheita de amostras à forma acolhedora como me receberam. Louvo o vosso trabalho e o vosso amor pela conservação da Natureza. Os centros de recuperação são um local de “Passagem para os que resistem partirem em liberdade” e espero um dia poder trabalhar para este propósito.

Um especial obrigado à Engenheira Telma Brida, colaboradora na Escola Superior Agrária de Castelo Branco, por me ter fornecido material essencial para o processamento das amostras e conclusão do projeto.

À Faculdade de Medicina Veterinária da ULisboa pelos conhecimentos transmitidos e pelas amizades que proporcionou.

Agradeço aos animais que me fizeram companhia durante este período, nomeadamente ao meu gato “Sines” que mesmo a dormir me ajudou a superar quaisquer obstáculos.

Muito obrigada a todos os que resistem!

Prevalência de protozoários do género *Trichomonas* em aves selvagens em centros de recuperação de Portugal

Resumo

A tricomoníase aviária é uma doença causada por protozoários do género *Trichomonas*. Atualmente, é uma das doenças mais relevantes entre as aves selvagens, tanto em ambiente urbano como rural. Está descrita em várias ordens de aves, tais como Columbiformes, Falconiformes, Accipitriformes, Strigiformes, Passeriformes, Psittaciformes, Galliformes, Anseriformes, Gruiformes e Charadriiformes, e estes protozoários são frequentemente encontrados na cavidade oral de Columbiformes, os quais são considerados os principais reservatórios do parasita. É um fator importante no declínio das populações de aves selvagens e pode ter implicações na conservação de espécies em risco, principalmente aquelas que enfrentam múltiplas ameaças.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de protozoários do género *Trichomonas* em aves selvagens nos centros de recuperação de animais selvagens em Portugal. Consistiu na colheita de 68 amostras da cavidade oral, esófago proximal e/ou papo de aves selvagens em dois centros de recuperação localizados na zona Centro e no Alentejo, entre 2021 e 2022. As amostras foram analisadas utilizando o método direto e a coloração de Giemsa.

Verificou-se uma prevalência geral de 6%, com uma prevalência de 36% em Columbiformes. Os casos positivos foram detetados apenas no Centro de Portugal, em rola-turca (*Streptopelia decaocto*). Confirmou-se uma prevalência superior em adultos Columbiformes (40%), quando comparados com as crias (nula).

Este trabalho demonstra uma prevalência elevada do género *Trichomonas* em Columbiformes e destaca a importância da realização de estudos futuros para que se possam tomar medidas no controlo e prevenção desta doença.

Palavras-chave: Parasitas; *Trichomonas*; Tricomoníase aviária; Centros de Recuperação; Portugal.

Prevalence of protozoa of the genus *Trichomonas* in wild birds in rehabilitation centres in Portugal

Abstract

Avian trichomoniasis is a disease caused by the protozoans of the genus *Trichomonas*. Currently, it is one of the most relevant diseases among wild birds, both in urban and rural environments. It has been described in several orders of birds, such as Columbiformes, Falconiformes, Accipitriformes, Strigiformes, Passeriformes, Psittaciformes, Galliformes, Anseriformes, Gruiformes and Charadriiformes, and these protozoans are often found in the oral cavity of Columbiformes, which are considered the main reservoir of the parasite. It is a major factor in the decline of wild bird populations and may have conservation implications for endangered species, particularly those facing multiple threats.

The present study aimed to assess the prevalence of protozoa of the genus *Trichomonas* in wild birds in wildlife rehabilitation centres in Portugal. It consisted of collecting 68 samples from the oral cavity, proximal oesophagus and/or crop of wild birds in two rehabilitation centres located in the Central Portugal and Alentejo province, between 2021 and 2022. The samples were analysed using the direct method and Giemsa staining.

There was an overall prevalence of 6%, with a prevalence of 36% in Columbiformes. Positive cases were detected only in the Central region of Portugal, in eurasian collared dove (*Streptopelia decaocto*). A higher prevalence was confirmed in adults Columbiformes (40%), compared with the young ones.

This work demonstrates a high prevalence of the genus *Trichomonas* in Columbiformes and highlights the importance of carrying out future studies so that measures can be taken to control and prevent this disease.

Key-words: Parasite; *Trichomonas*; Avian trichomoniasis; Rehabilitation Centres; Portugal.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice de ilustrações	viii
Índice de tabelas.....	x
Índice de Gráficos.....	xi
Índice de anexos.....	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
Parte I – Atividades desenvolvidas durante o estágio	1
Parte II – Revisão bibliográfica	4
1 Tricomoníase orofaríngea.....	4
2 <i>Trichomonas gallinae</i>	4
2.1 Nomenclatura	4
2.2 Taxonomia	5
2.3 Morfologia	5
2.4 Ciclo de vida e Transmissão	7
2.5 Patologia e Patogenia	9
2.6 Resposta imunitária	10
2.7 Hospedeiros e ocorrências	11
3 Novas espécies e variantes de tricomoníase orofaríngea	18
3.1 <i>Trichomonas stableri</i>	18
3.2 <i>Trichomonas gypaetini</i>	19
3.3 Novas variantes	20
4 Fatores que desencadeiam a patogenicidade do parasita	21
5 Diagnóstico.....	23
5.1 Diagnóstico clínico	23
5.2 Diagnóstico laboratorial.....	24
6 Tratamento	27

6.1	Tratamento específico e dirigido à tricomoníase	27
6.2	Tratamento de suporte.....	29
7	Prevenção e monitorização	29
Parte III – Prevalência de protozoários do género <i>Trichomonas</i> em aves selvagens em centros de recuperação de Portugal		30
8	Descrição do estudo e objetivos	30
8.1	Ordens de aves incluídas no estudo	30
8.2	Centros de recuperação de animais selvagens incluídos no estudo	31
9	Materiais e métodos	32
9.1	Colheita e caracterização da amostra	32
9.2	Metodologia laboratorial.....	35
10	Resultados	36
10.1	Distribuição dos animais e das amostras colhidas	36
10.2	Prevalência do género <i>Trichomonas</i>	40
10.3	Achados Incidentais.....	46
11	Discussão	48
12	Conclusão e perspectivas futuras	52
Bibliografia.....		53
Anexos		74

Índice de ilustrações

Figura 1 - Taxonomia de <i>Trichomas gallinae</i> . Adaptado de Gómez (2018).	5
Figura 2 - <i>Trichomonas gallinae</i> : À esquerda, adaptado de Martínez-Díaz (2014), barra de escala 10 µm. À direita, original: A – núcleo; B – flagelos anteriores; C – membrana ondulante; D e E – axóstilo	7
Figura 3 - Transmissão de tricomoníase entre aves selvagens. Adaptado de Pearson (2001).	8
Figura 4 - Microfotografia de trofozoítos do género <i>Trichomonas</i> : <i>T. gallinae</i> (A), forma delgada <i>T. stableri</i> (B) e forma redonda <i>T. stableri</i> (C). Barras de escala 5 µm. Adaptado de Girard et al. (2013).	19
Figura 5 - <i>Trichomonas gypaetini</i> detetado em abutre-do-Egipto (c) e em abutre-preto (d). Barra de escala 10µm. Adaptado de Martínez-Díaz (2014).	20
Figura 6 - Localização dos centros de recuperação envolvidos no estudo (CRASSA e CERAS). Adaptado de Google Maps.	31
Figura 7 - Distritos de Portugal e Ilhas. Cor amarela correspondente à área geográfica do Alentejo e cor vermelha correspondente à área geográfica do Centro de onde foram resgatados os indivíduos em estudo. Adaptado de SEFSTAT – Portal de Estatística.	37
Figura 8 – Placas firmes e amareladas com pequenas projeções centrais em forma de esporão na cavidade oral da rola-turca 4697/22 que ingressou no CERAS vista cranial. Original.	41
Figura 9 – Placas firmes e amareladas com pequenas projeções centrais em forma de esporão na cavidade oral da rola-turca 4759/22 que ingressou no CERAS vista lateral direita. Original.	41
Figura 10 - Trofozoítos de <i>Trichomonas</i> sp. (pontas de setas pretas) na preparação de método direto, a partir de esfregaço da cavidade orofaríngea e esófago proximal da rola-turca 4598/22. Objetiva 40x. Barra de escala 250 µm. Original.	42
Figura 11 – Trofozoítos de <i>Trichomonas</i> sp. (pontas de setas pretas) na preparação de coloração, a partir de esfregaço da cavidade orofaríngea e esófago proximal da rola-turca 4598/22. Objetiva 100x. Barra de escala 100 µm. Original.	42
Figura 12 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase a nível do papo da rola-turca 4598/22 que ingressou no CERAS. Original.	43
Figura 13 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase a nível do papo da rola-turca 4598/22 que ingressou no CERAS. Original.	44
Figura 14 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase na cavidade oral da rola-turca 4697/22 que ingressou no CERAS. Original.	44

Figura 15 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase na cavidade oral e esôfago proximal da rola-turca 4697/22 que ingressou no CERAS. Original.....	45
Figura 16 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase na cavidade oral da rola-turca 4759/22 que ingressou no CERAS. Original.....	45
Figura 17 – Ovo de <i>Capillaria</i> sp. na preparação de método direto, a partir de esfregaço da cavidade oral da coruja-do-mato 4570/22 CERAS. Objetiva 40x. Barra de escala 250 µm. Original.	46
Figura 18 - Ovos de <i>Capillaria</i> sp. na preparação de método direto, a partir de esfregaço da cavidade oral da águia-d'asa-redonda 4583/22 CERAS. Objetiva 40x. Barra de escala 250 µm. Original.....	46
Figura 19 - Ovo de <i>Serratospiculum seurati</i> na preparação de método direto, a partir de esfregaço da cavidade oral do falcão peregrino 3885/21 CRASSA. Objetiva 40x. Barra de escala 250 µm. Original.	47
Figura 20 – Formas adultas de <i>Serratospiculum seurati</i> no saco aéreo abdominal do falcão peregrino 3885/21. Original.	47
Figura 21 - Lesões características de tricomoníase na cavidade oral da bufo-real 4629/22 que ingressou no CERAS. Original.	48
Figura 22 - Frequência relativa de tricomoníase em aves selvagens. Adaptado de Pearson (2001).	49

Índice de tabelas

Tabela 1 - Novas espécies e variantes de tricomonadídeos orofaríngeos detetados em aves. Adaptado de Gómez (2018).	21
Tabela 2 – Substâncias utilizadas perante tricomoníase aviária.	28
Tabela 3 - Sinais compatíveis com tricomoníase de acordo com a revisão bibliográfica	34
Tabela 4 - Casos positivos para a deteção do protozoário do género <i>Trichomonas</i> em aves selvagens em centros de recuperação de Portugal.	43
Tabela 5 - Causa de entrada e resolução dos casos positivos ingressados no CERAS.	45

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Causas de entrada dos animais que ingressaram entre 12/09/2021 e 31/12/2021.....	2
Gráfico 2 - Resolução dos animais que ingressaram entre 12/09/2021 e 31/12/2021.....	3
Gráfico 3 - Distritos de resgate das aves envolvidas no estudo.....	36
Gráfico 4 - Ordens das aves envolvidas no estudo.....	37
Gráfico 5 - Idades das aves envolvidas no estudo.....	38
Gráfico 6 - Sexo das aves envolvidas no estudo.....	38
Gráfico 7 - Causa de entrada das aves envolvidas no estudo.....	39
Gráfico 8 - Época do ano da colheita de amostras das aves envolvidas no estudo.....	39
.....	39
Gráfico 9 - Local de colheita da amostra das aves envolvidas no estudo.....	40

Índice de anexos

Anexo 1 - Indivíduos em estudo com pelo menos um dos sinais clínicos compatíveis com tricomoníase.....	74
Anexo 2 - Amostras recolhidas nos centros de recuperação envolvidos no estudo.....	75
Anexo 3 - Presença ou ausência de sinais clínicos compatíveis com tricomoníase listados em 9.1 nas aves envolvidas no estudo.	75
Anexo 4 - Presença ou ausência de lesões características de tricomoníase nas aves envolvidas no estudo.....	75
Anexo 5 - Período de colheita das amostras das aves envolvidas no estudo. .	76
Anexo 6 - Material biológico das amostras das aves envolvidas no estudo.	76
Anexo 7 - Forma adulta de <i>Serratospiculum seurati</i> do falcão peregrino 3885/21 numa preparação microscópica com Lactofenol. Ext. posterior de um macho. Objetiva 40x. Barra de escala 25 µm. Original.....	77
Anexo 8 - Forma adulta de <i>Serratospiculum seurati</i> do falcão peregrino 3885/21 numa preparação microscópica com Lactofenol. Ext. posterior de um macho. Objetiva 40x. Barra de escala 250 µm. Original.....	77
Anexo 9 – Inquérito “Prevalência de protozoários do género <i>Trichomonas</i> em aves selvagens em Centros de Recuperação de Portugal”. Original.....	78
Anexo 10 - Protocolo "Prevalência de protozoários do género <i>Trichomonas</i> em aves selvagens em Centros de Recuperação de Portugal”. Original.....	80

Lista de abreviaturas

% - Percentagem

µm – Micrómetro

mg/kg – Miligrama por quilograma

mg/l – Miligrama por litro

IgA – Imunoglobulina A

CRASSA – Centro de Recuperação de Animais Selvagens de Santo André

CERAS – Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens

LC – Pouco preocupante

NT – Quase ameaçado

VU – Vulnerável

CR - Criticamente em perigo

DD - Informação insuficiente

ITS-OBT-Tg-1 - Genótipo A

ITS-OBT-Tg-2 - Genótipo C

TYM - Meio Diamond modificado

CPLM - Meio cisteína-peptona-maltose

DNA - Ácido desoxirribonucleico

RNA - Ácido ribonucleico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”

BID – Duas vezes por dia

SID – Uma vez por dia

EUA – Estados Unidos da América

RU – Reino Unido

JB - Estirpe de Jones Barn

SG - Estirpe Stabler-gallinae

Parte I – Atividades desenvolvidas durante o estágio

O estágio curricular, realizado no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, teve lugar no Centro de Recuperação de Animais Selvagens de Santo André (CRASSA) durante o período setembro de 2021 a janeiro de 2022.

O CRASSA, um projeto da Quercus - Associação Nacional de Conservação da Natureza (ANCN), localiza-se no Moinho Novo da Galiza, em Vila Nova de Santo André, Santiago do Cacém, Setúbal. Está inserido na Reserva Natural das Lagoas de Santo André e da Sancha e tem como principal objetivo a recuperação de animais selvagens feridos e, sempre que possível, a sua devolução à natureza. Dispõe de instalações e equipamentos adaptados às diferentes espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes.

Durante o estágio, foi possível dar assistência à equipa de medicina veterinária e à equipa de biologia em diversos casos clínicos e procedimentos, desde receção de novos animais, exame de estado geral, tratamentos medicamentosos e não medicamentosos, ligaduras, pensos e fisioterapia, cirurgia de tecidos moles, análises laboratoriais, tais como hematologia, coprologia e cultura de amostras, enriquecimento ambiental, alimentação e manejo diário, limpeza e manutenção das instalações, gestão do biotério de pequenos roedores e de tenébrios e educação ambiental.

No período de estágio curricular ingressaram 92 animais, de 33 espécies, maioritariamente aves, mas também mamíferos e répteis.

Com base no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (2005), a maioria dos animais que ingressou no CRASSA neste período pertence a espécies que se encontram na categoria de ameaça Pouco Preocupante (LC) como, por exemplo, duas corujas-do-mato (*Strix aluco*), três mochos-galegos (*Athene noctua*) e uma raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*).

Nas categorias com maior risco de extinção, encontramos quatro espécies classificadas como Quase Ameaçadas (NT), com registos de três grifos (*Gyps fulvus*), dois coelhos-bravos (*Oryctolagus cuniculus*), um bufo-real (*Bubo bubo*) e um peneireiro-cinzento (*Elanus caeruleus*). A principal causa de entrada deste grupo foi juvenil desorientado (três animais), mas destaca-se também causas como doença (dois animais) e debilidade (um animal). Destes sete animais, dois foram devolvidos à Natureza.

Além disso, o CRASSA acolheu cinco espécies classificadas como Vulneráveis (VU): um milhafre-real (*Milvus milvus*), dois falcões-peregrinos (*Falco peregrinus*), um noitibó-europeu (*Caprimulgus europaeus*), um flamingo (*Phoenicopterus roseus*) e um cágado-mediterrânico (*Mauremys leprosa*). A principal causa de entrada deste grupo foi trauma de

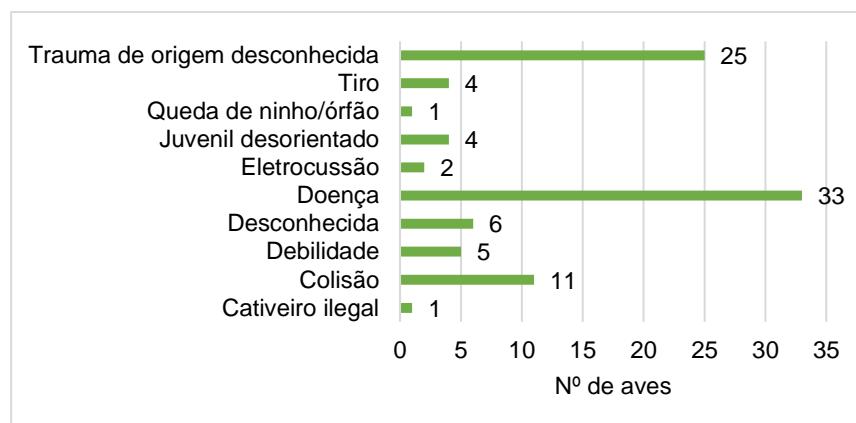
origem desconhecida (três indivíduos), mas destaca-se também causas ilegais como tiro (um indivíduo).

Também ingressaram no CRASSA dois indivíduos da espécie Criticamente em Perigo (CR), abutre-negro (*Aegypius monachus*), um entregue já cadáver, vítima de colisão, e outro que morreu nas primeiras 48h, vítima de trauma de origem desconhecida.

Ingressou um animal de uma espécie considerada como Informação Insuficiente (DD), bufo-pequeno (*Asio otus*), transferido para o LxCRAS - Centro de Recuperação de Animais Silvestres de Lisboa, para cirurgia após colisão.

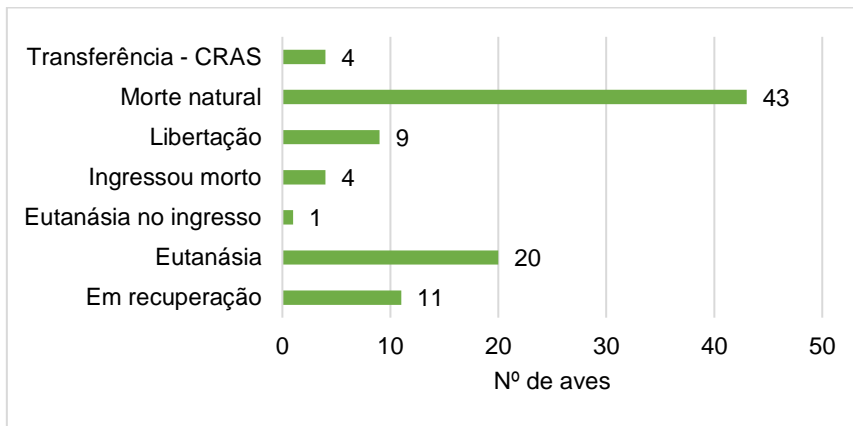
A causa de entrada mais frequente foi doença (36%), seguida de trauma de origem desconhecida (27%), colisão (12%), desconhecida (7%), debilidade (5%), tiro (4%), juvenil desorientado (4%), eletrocussão (3%), queda de ninho/órfão (1%) e cativo ilegal (1%) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Causas de entrada dos animais que ingressaram entre 12/09/2021 e 31/12/2021



Dos casos acompanhados nove animais foram libertados, onze permaneceram em recuperação, quatro foram transferidos para outros centros de recuperação de animais selvagens, quatro ingressaram mortos, vinte e um foram submetidos a eutanásia e quarenta e três morreram por causas naturais. Regra geral, o prognóstico dos animais ingressados durante o inverno é reservado (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Resolução dos animais que ingressaram entre 12/09/2021 e 31/12/2021



Parte II – Revisão bibliográfica

1 Tricomoníase orofaríngea

Os protozoários do género *Trichomonas* são responsáveis pela tricomoníase orofaríngea, uma das doenças mais relevantes entre as aves selvagens. Foi descrita em várias ordens, tais como Columbiformes, Falconiformes, Accipitriformes, Strigiformes, Passeriformes, Psittaciformes, Galliformes, Anseriformes, Gruiformes e Charadriiformes. Atualmente, é um fator importante no declínio das populações de aves selvagens e pode ter implicações na conservação de espécies em risco, principalmente aquelas que enfrentam múltiplas ameaças (Boal et al. 1998; Amin et al. 2014; Rogers et al. 2016b; Gómez et al. 2018).

O protozoário *Trichomonas gallinae* é um parasita com distribuição cosmopolita, cujos efeitos variam de infecção subclínica a doença grave, com formação de pequenas úlceras e nódulos no trato gastrointestinal superior e outras localizações. Estas lesões podem coalescer, formando grandes granulomas e levando à morte do animal por fome ou asfixia (Forrester and Foster 2008; Gómez et al. 2018).

2 *Trichomonas gallinae*

Inúmeras espécies de tricomonádídeos foram descritas a partir do intestino grosso e ceco das aves. Em geral, estas espécies são consideradas comensais e não-patogénicas, no entanto, existem exceções. Duas espécies com potencial patogénico, *Trichomonas gallinae* e *Tetratrichomonas gallinarum*, ganham destaque por ser as mais comumente encontradas na classe das aves (Stabler 1947; BonDurant and Honigberg 1994; Amin et al. 2014).

2.1 Nomenclatura

Anos antes do agente etiológico ser descrito, foram reportadas e descritas lesões semelhantes às de tricomoníase em aves de rapina utilizadas em Falcoaria. Os autores denominavam a doença de “frounce” ou “canker” (Turberville 1575; Bert 1619).

O agente etiológico da tricomoníase foi descrito pela primeira vez por Rivolta, em 1878, que, através da colheita de amostras do trato gastrointestinal superior e fígado de um pombo-das-rochas (*Columba livia*) com lesões características da doença, detetou organismos celulares arredondados que se moviam rapidamente na preparação. Atribuiu o nome de *Cercomonas gallinae* aos organismos presentes no trato gastrointestinal superior e *Cercomonas hepaticum* aos organismos presentes no fígado. Posteriormente, tratando-se do mesmo organismo, *C. hepaticum* tornou-se um sinónimo de *T. gallinae* (Stabler 1938; Stabler 1954).

Após revisão, foi determinado que o parasita não fazia parte da ordem Cercomonadida mas sim da ordem Trichomonadida, tendo adquirido o nome *Trichomonas gallinae* (Stabler 1938; Stabler 1947; Stabler 1954).

Tricomoníase, “canker”, “roup” (em Columbiformes, Psittaciformes, e outras aves), “frounce” (em aves de rapina) e tricomonose são sinónimos que identificam a doença (Stabler 1954; Forrester and Foster 2008; Amin et al. 2014; Collántes-Fernández et al. 2018). Forrester e Foster (2008) reconhecem que o termo tricomoníase tem sido comumente utilizado na literatura histórica para se referir tanto à doença causada por *T. gallinae* como à infecção sem doença aparente.

2.2 Taxonomia

Trichomonas gallinae pertence à família Trichomonadidae, ordem Trichomonadida, classe Trichomonadea, filo Parabasalia (Cepicka et al. 2010) (Figura 1):

Império Biota
Domínio Eukaryota
Reino Protozoa
Filo Parabasalia
Classe Trichomonadea
Ordem Trichomonadida
Família Trichomonadidae
Subfamília Trichomonadinae
Género *Trichomonas*
Espécie *Trichomonas gallinae*

Figura 1 - Taxonomia de *Trichomas gallinae*. Adaptado de Gómez (2018).

Os flagelados da família Trichomonadidae são protozoários (seres unicelulares) amitocondriados microaerofílicos (Amin et al. 2014). Dado que não possuem mitocôndrias, os mesmos recorrem a um mecanismo alternativo para síntese de ATP, através de hidrogenossomas, organelas citosólicas que não requerem influxo de oxigénio (Gómez et al. 2018).

Trichomonas deriva da palavra grega “thrix-“ que significa cabelo, alusivo aos seus flagelos, e “-monas” que traduz uma unidade, referência ao facto de serem organismos unicelulares (uma célula) (Gómez et al. 2018).

2.3 Morfologia

Os trofozoítos de *T. gallinae* apresentam forma variada, de ovoide a piriforme, e um tamanho médio de 7-11 µm. Estes flagelados são caracterizados por quatro flagelos

anteriores, um flagelo recorrente, um núcleo ovoide, uma membrana ondulante, um axóstilo e a pelta (Tasca and De Carli 2003; Mehlhorn et al. 2009).

No polo apical, surgem cinco flagelos do canal periflagelar. Quatro dos referidos, os flagelos anteriores, são livres e apresentam tamanhos diferentes, de 11 a 13 μm . O quinto, o flagelo recorrente, está intimamente ligado à membrana ondulante, não se tornando livre na extremidade posterior da célula e estendendo-se apenas por dois terços até três quartos da superfície celular (Tasca and De Carli 2003; Mehlhorn et al. 2009).

O núcleo é ovoide, com um tamanho de 2,5-3 μm . Está situado por baixo dos corpos basais dos flagelos, no polo apical (Mehlhorn et al. 2009).

Uma membrana ondulante bem desenvolvida estende-se por quase todo o comprimento da célula. A margem externa da membrana consiste no filamento acessório e no flagelo recorrente anexado (Tasca and De Carli 2003).

O axóstilo é uma estrutura de suporte que se projeta da extremidade posterior da célula. É composto por uma única fila de microtúbulos que se estendem ao longo do eixo central do trofozoíto, começando no núcleo até à extremidade posterior e projetando-se, aproximadamente, um terço do comprimento da célula (Tasca and De Carli 2003; Mehlhorn et al. 2009).

A parede do canal periflagelar é reforçada pela pelta, uma estrutura membranosa em forma de crescente cujo contorno é observado na extremidade anterior da célula (Tasca and De Carli 2003).

Relativamente a formas de resistência, ainda não foi descrito em *T. gallinae* o desenvolvimento de uma parede quística sob condições adversas (Gómez et al. 2018). No entanto, foram reportados estádios semelhantes à mesma denominados de pseudoquistos (Tasca and De Carli 2003; Mehlhorn et al. 2009).

A ocorrência de pseudoquistos foi reportada em *Trichomonas* spp. intestinais de roedores (Gweléssiany 1929), anfíbios e répteis (Mattern et al. 1973) e aves (Friedhoff et al. 1991). Os pseudoquistos resultam da transformação morfológica de *Trichomonas* spp. em formas compactas, imóveis, sem uma verdadeira parede de quisto. Os trofozoítos, polares e flagelados, tornam-se arredondados e desprovidos de flagelos externos. Os flagelos podem ser vistos dentro do citoplasma dos pseudoquistos (Friedhoff et al. 1991; Pereira-Neves et al. 2003). Presumivelmente, resultam de uma resposta a *stress* ambiental, onde a célula tenta minimizar a sua área de superfície e proteger os seus flagelos. Esta resposta pode ser desencadeada por dessecação, aumento da tensão de oxigénio ou temperaturas mais baixas (Granger et al. 2000). A formação de pseudoquistos proporciona resistência ambiental sob

condições desfavoráveis, conseqüentemente prolongando o tempo de sobrevivência do parasita fora do hospedeiro e tornando a transmissão mais eficaz (Amin et al. 2014).

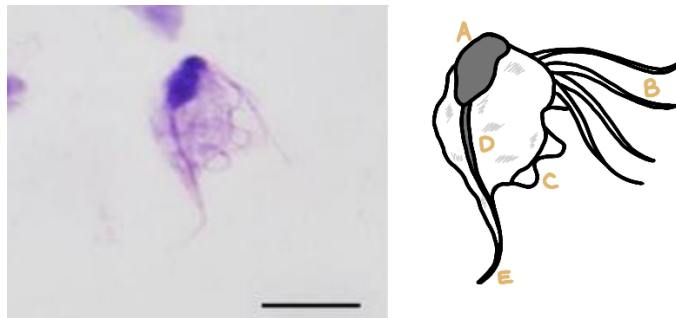


Figura 2 - *Trichomonas gallinae*: À esquerda, adaptado de Martínez-Díaz (2014), barra de escala 10 μm . À direita, original: A – núcleo; B – flagelos anteriores; C – membrana ondulante; D e E – axóstilo

2.4 Ciclo de vida e Transmissão

O protozoário *T. gallinae* apresenta um ciclo de vida direto, sem envolvimento de hospedeiros intermediários ou paraténicos (Forrester and Foster 2008), e reproduz-se através de fissão binária (Stabler 1941).

A principal forma de transmissão é por contacto direto com a saliva de uma ave infetada (Gómez et al. 2018), como, por exemplo, entre adultos e crias durante a alimentação, ou entre adultos em comportamentos de corte. No entanto, a partilha de alimentos e de fontes de água contaminados e a predação ou necrofagia foram também identificados como possíveis meios de infeção (Stabler 1947; Stabler 1954; Kocan 1969a; Kietzmann 1990; Pearson 2001; Purple and Gerhold 2015) (Figura 3).

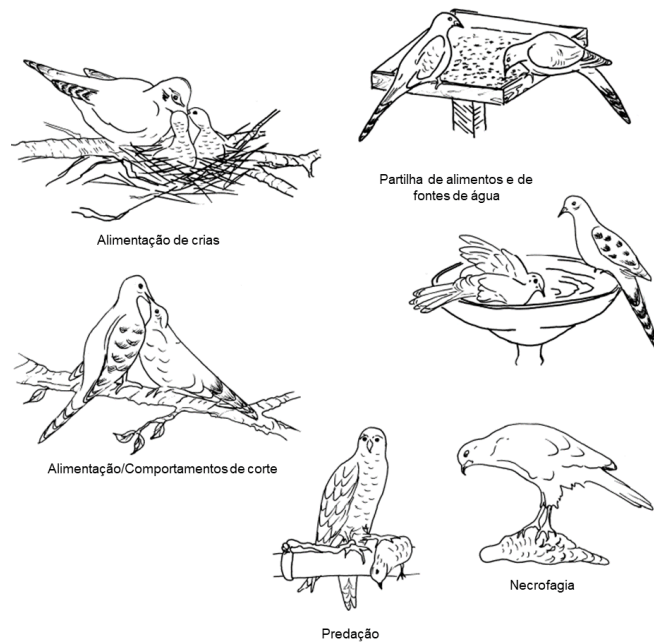


Figura 3 - Transmissão de tricomoníase entre aves selvagens. Adaptado de Pearson (2001).

Perante condições húmidas, *T. gallinae* sobrevive em sementes por, pelo menos, 24 horas (McBurney et al. 2017). A persistência máxima registada em fontes de água é de 16 horas (Purple and Gerhold 2015). Em relação a carcaças, podem permanecer infecciosas até 48 horas (Erwin et al. 2000; Schulz et al. 2005), atuando como reservatório para aves ornitófagas e necrófagas (Gómez et al. 2018).

De salientar que um único trofozoíto de *T. gallinae* é suficiente para infetar, desenvolver a doença e provocar a morte em menos de 15 dias pós-infeção (média de 11,8 dias) (Stabler and Kihara 1954).

Aquando de infeção por *T. gallinae*, nem todos os animais apresentam sinais clínicos e lesões indicativas da presença do parasita e/ou morrem. Desta forma, sugere-se a existência de várias linhagens que variam na sua virulência, desde aquelas que provocam pouca ou nenhuma alteração visível - Lahore e Stabler-gallinae (SG) - até aquelas que produzem elevado grau de mortalidade - Jones' Barn (JB), Eiberg e Mirza (Stabler 1948a; Honigberg et al. 1964; Nadler and Honigberg 1988; Narcisi et al. 1991; OIE-World Organisation for Animal Health 2020). Foram identificados casos de coexistência de linhagens geneticamente diferentes num só indivíduo (Grabensteiner et al. 2010).

A variação na virulência advém da diversidade antigénica em cada linhagem. Linhagens avirulentas com maior diversidade antigénica levam à estimulação da resposta imunitária e, por consequência, à produção de anticorpos. Por outro lado, linhagens virulentas com menor

diversidade antigénica são incapazes de estimular a produção de anticorpos (Stepkowski and Honigberg 1972).

A localização preferencial de *T. gallinae* é o trato gastrointestinal superior, desde a cavidade orofaríngea e papo até ao esófago, podendo ocorrer invasão dos seios nasais, região orbital, cérebro e pescoço. No entanto, são reportados frequentemente casos de infeção de órgãos internos, como fígado, pulmões, coração, pâncreas e sacos aéreos, via corrente sanguínea ou linfática (Stabler and Engley 1946; Jaquette 1950; Stabler 1954; Mesa et al. 1961; Narcisi et al. 1991).

As lesões causadas pela doença tricomoniase podem apresentar-se em diferentes localizações anatómicas, dependendo da ordem e/ou espécie de aves ou da linhagem do parasita (Forrester and Foster 2008; Park 2011; Martínez-Herrero et al. 2020). Por exemplo, a linhagem JB invade o fígado de pombos-das-rochas (*Columba livia*) e os pulmões de rolas-carpideiras (*Zenaida macroura*) (Kocan 1969b).

2.5 Patologia e Patogenia

Aquando da infeção por *T. gallinae*, os trofozoítos ligam-se ao epitélio superficial da mucosa do trato gastrointestinal superior e usam o seu movimento amebóide e enzimas hidrolíticas para separar as junções das células epiteliais, permitindo a invasão e o movimento progressivo pela mucosa. Quando colonizam o trato gastrointestinal superior, induzem frequentemente uma reação granulomatosa com necrose dos tecidos envolvidos. A mucosa comprometida pode ser invadida por bactérias, levando a septicémia (Kietzmann 1993; Cole 1999; Forrester and Foster 2008; Neimanis et al. 2010; Martínez-Herrero et al. 2020).

Mesa et al. (1961) e Narcisi et al. (1991) reportaram as alterações histopatológicas na espécie pombo-das-rochas infetados com *T. gallinae* linhagem JB e linhagem Eiberg, respetivamente. As alterações foram semelhantes entre os estudos e podem ser extrapoladas para as restantes espécies. Seguidamente e baseados nestes autores, são descritas as alterações mais evidentes.

No segundo dia pós-infeção, os tricomonadídeos dispuseram-se lado a lado, perpendiculares à superfície do epitélio da faringe, formando uma camada semelhante a epitélio colunar. Sem reação inflamatória excetuando uma moderada reação mononuclear perto das aberturas glandulares.

No terceiro dia pós-infeção, formaram-se úlceras superficiais na faringe com infiltração de leucócitos na submucosa em torno das glândulas. O fígado apresentava múltiplos focos de necrose com reação inflamatória, infiltração de células mononucleares e heterófilos.

No quarto dia pós-infecção, as ulcerações da mucosa faríngea apresentavam reação inflamatória maciça. O fígado apresentava abscessos de grandes dimensões com áreas necróticas rodeadas de heterófilos, células mononucleares e tricomonadídeos.

No quinto e sétimo dia pós-infecção, as úlceras faríngeas aprofundaram e os abscessos do fígado aumentaram de tamanho.

No sétimo dia pós-infecção, os tricomonadídeos na faringe encontravam-se perto dos vasos sanguíneos e no fígado à periferia dos abscessos.

A linhagem JB atingiu o fígado em 3 dias pós-infecção e provocou a morte em 7-10 dias pós-infecção, enquanto a linhagem Eiberg o fez em 4 dias e 14-17 dias pós-infecção, respectivamente.

Dos estudos referidos, todos os animais morreram, seja por eutanásia ou por morte natural. Foram utilizados animais naïve, animais que nunca contataram com o parasita, seja com linhagens avirulentas ou moderadamente virulentas, e que nunca adquiriram imunidade.

2.6 Resposta imunitária

Como referido anteriormente, as linhagens de *T. gallinae* variam na sua capacidade de produzir lesões e/ou morte em animais infetados. Linhagens avirulentas e linhagens de reduzida ou moderada virulência originam infeções sem alterações visíveis no hospedeiro, enquanto linhagens de elevada virulência originam infeções cujas alterações podem levar à morte do ser vivo (Stabler 1948a; Stabler 1954; Honigberg et al. 1964; Nadler and Honigberg 1988; Narcisi et al. 1991; OIE-World Organisation for Animal Health 2020).

Aves infetadas com linhagens avirulentas ou moderadamente virulentas adquirem proteção contra efeitos patogénicos de uma infeção subsequente de uma linhagem virulenta. Esta imunidade envolve componentes celulares como, por exemplo, leucócitos, e componentes humorais, como anticorpos. No entanto, a duração da resistência é ainda desconhecida e a imunidade diminui gradualmente depois da infeção desaparecer (Stabler 1948b; Stabler 1954; Kocan and Knisley 1970; Stepkowski and Honigberg 1972; Forrester and Foster 2008; Herdt and Pasmans 2009).

Estudos experimentais com roedores demonstraram a imunidade protetora que ocorre em infeções por *T. gallinae*. Warren et al. (1961) realizaram a infeção de roedores com injeções subcutâneas de antígenos de *T. gallinae*, demonstrando a proteção completa em 50% dos animais testados. Por outro lado, Honigberg (1978) demonstrou a proteção de roedores via injeção intraperitoneal de uma linhagem de virulência moderada de *T. gallinae*.

Relativamente a populações selvagens, Kocan e Knisley (1970) infetaram pombos-das-rochas (*Columba livia*) e rolas-carpideiras (*Zenaidura macroura*), livres de *T. gallinae*, com a linhagem JB a fim de determinarem a taxa de aves resistentes à doença em cada uma das populações. Embora todas as aves tenham ficado infetadas, 88% dos pombos-das-rochas e 82% das rolas-carpideiras demonstraram-se resistentes à tricomoniase. Para além da investigação referida, Kocan e Amend (1972) realizaram um estudo de infeção em populações de rola-carpideira de uma área epizootica e de uma área não epizootica por pelo menos 3 anos. Em relação ao total, 85% e 69% das rolas-carpideiras (*Zenaidura macroura*) da área epizootica e da área não epizootica, respetivamente, eram imunes à doença.

A resistência demonstrada por estes animais poderá ter resultado de exposição prévia ao parasita com aquisição de anticorpos protetores ou de imunidade passiva. O “leite de papo”, um fluido composto por células epiteliais descamadas, rico em proteínas, gorduras e imunoglobulinas, é regurgitado pelos progenitores, durante cerca de 2 semanas, para alimentação e proteção das crias (Crespo et al. 2018). Goudswaard et al. (1979) demonstraram a presença de imunoglobulina A (IgA) no leite de papo, sugerindo que esta imunoglobulina seria transferida para a corrente sanguínea das crias através de pinocitose. A IgA poderá desempenhar um papel na transferência de imunidade para *T. gallinae*.

Pensa-se que as aves que sobrevivem à infeção por *T. gallinae* atuam como portadoras latentes assintomáticas durante anos, podendo contribuir para a dispersão do parasita (Amin et al. 2011; Amin et al. 2014).

Em conclusão, a resposta biológica perante a infeção por *Trichomonas* spp. difere entre espécies e entre indivíduos (Anderson et al. 2009; Martínez-Herrero et al. 2014; Gyimesi 2015; Gómez et al. 2018; Martínez-Herrero et al. 2020).

2.7 Hospedeiros e ocorrências

A tricomoniase orofaríngea apresenta uma distribuição cosmopolita. Tem a capacidade de infetar inúmeras espécies de aves e, atualmente, adquire um papel importante nas espécies em perigo de extinção. As ordens onde o parasita foi descrito são: Columbiformes, Falconiformes, Accipitriformes, Strigiformes, Passeriformes, Psittaciformes, Galliformes, Anseriformes, Gruiformes e Charadriiformes (Forrester and Foster 2008; Mehlhorn et al. 2009; Amin et al. 2014; Gómez et al. 2018).

A prevalência e gravidade da doença nas diversas ordens de aves depende da qualidade do habitat, linhagem de *Trichomonas* sp., estado imunitário e debilidade por doenças concomitantes do hospedeiro, adaptação parasita-hospedeiro, prevalência de *Trichomonas* sp. em populações de Columbiformes e percentagem de dieta que consiste em

Columbiformes, como é o caso das aves de rapina (Anderson et al. 2009; Martínez-Herrero et al. 2014; Gyimesi 2015; Gómez et al. 2018; Martínez-Herrero et al. 2020).

2.7.1 Columbiformes

De acordo com Stabler (1954), o pombo-das-rochas (*Columba livia*) é o principal hospedeiro de *T. gallinae*. No entanto, desde a sua descoberta neste hospedeiro, são inúmeros os casos reportados em Columbiformes por todo o mundo.

Entre Columbiformes, parecem existir grandes diferenças na prevalência do parasita e na suscetibilidade das aves a linhagens virulentas (Stabler and Braun 1975; Conti et al. 1985; Harmon et al. 1987). Variação da época do ano, idade e espécie do ser vivo justificam as diferenças registadas na prevalência (Sansano-Maestre et al. 2009). Alguns animais desenvolvem imunidade para as linhagens virulentas de *T. gallinae* devido a infeção prévia com uma linhagem avirulenta, atuando, posteriormente, como portadores do parasita (Forrester and Foster 2008). Numa população de columbídeos, frequentemente a maioria está infetada, no entanto, poucos ou nenhum indivíduo desenvolvem doença (Hegemann et al. 2007).

A doença poderá ter desempenhado um papel importante na extinção do pombo-passageiro (*Ectopistes migratorius*) após a introdução do parasita no continente americano através de columbídeos transportados pelos colonizadores europeus (Stabler 1951; Hickey 1969).

Na Austrália, foi registada uma prevalência de 46% em rola-dos-palmares (*Streptopelia senegalensis*) (Mckeon et al. 1997).

Nos EUA, a rola-carpideira (*Zenaidura macroura*) tem sido estudada extensivamente (Forrester and Foster 2008). Registou-se uma prevalência de 20% no Arizona (1946-1966) (Straus 1966), uma prevalência de 17% e de 1% no Sul e no Norte da Flórida, respetivamente (1977-1978) (Conti and Forrester 1981) e uma prevalência de 5,6% no Kansas (1998-2003) (Schulz et al. 2005).

Na Califórnia, 1945-2014, foram registados 59 eventos de mortalidade de pomba-de-coleira-branca (*Patagioenas fasciata*) devido a tricomoníase. Nos anos de surto, verificou-se um declínio da reprodução e da contagem de aves. (Rogers et al. 2016a).

Relativamente à Maurítânia, Bunbury et al (2007) reportaram uma prevalência média de 44,3% em columbídeos, 59% na rola-zebrada (*Geopelia striata*), 19% na rola-pintada (*Spilopelia chinensis*) e 47% na rola-malgaxe (*Streptopelia picturata*).

No Reino Unido, Lennon et al. (2013) registraram uma prevalência de 86% em rola-brava (*Streptopelia turtur*) e em rola-turca (*Streptopelia decaocto*), de 47% em pombo-torcaz (*Columba palumbus*) e de 40% em seixa (*Columba oenas*). Aquando da colheita de amostras, apenas uma ave, pombo-torcaz, apresentava lesões macroscópicas e, posteriormente, sucumbiu devido à infeção.

Na Alemanha, foi registada uma prevalência de 66,7% em rola-turca, 76,9% em pombo-das rochas e 39,5% em pombo-torcaz (Quillfeldt et al. 2018).

No nordeste da Península Ibérica, Santos et al. (2019) isolaram *Trichomonas* spp. em rola-brava (56,3%), pombo-torcaz (83,3%) e pombo-das-rochas (68,4%).

Em Espanha, foi reportado *T. gallinae* em aves saudáveis, pombo-torcaz, amostradas em ninho ou capturadas para anilhagem (Muñoz 1995). Sansano-Maestre et al. (2009) registraram em pombo-das-rochas selvagem e doméstico uma prevalência de 41% e de 52,7%, respetivamente.

2.7.2 Falconiformes

As aves de rapina são expostas diretamente ao agente etiológico da tricomoníase quando se alimentam de presas infetadas, como por exemplo, de Columbiformes, hospedeiros reservatórios do protozoário, ou quando recorrem a fontes de água contaminadas. Há também evidências de transmissão vertical entre os pais e os seus descendentes, seja através da alimentação das crias com presas infetadas ou por contacto direto bico-com-bico (Stabler 1969; Stone and Janes 1969; Cooper and Petty 1988; Redig et al. 1993; Morishita et al. 1997; Miller and Fowler 2015; Purple and Gerhold 2015; Gómez et al. 2018). A tricomoníase estava frequentemente ligada à Falcoaria e à prática de alimentação com Columbiformes, em particular pombos-das-rochas, vivos ou recém-abatidos (Samour et al. 1995; Bailey 1997).

Em 1991, na África do Sul, foi identificado um caso positivo de tricomoníase num falcão-peregrino (*Falco peregrinus*) de cativo, que se alimentara de Columbiformes selvagens (Pepler and Oettle 1992).

No Barém, 1987-1993, 31,2% dos animais apresentavam sinais clínicos de tricomoníase e foram admitidos para tratamento. No estudo foram incluídos sacre (*Falco cherrug*), alfaneque (*Falco biarmicus*), falcão híbrido (*Falco rusticolus* X *Falco cherrug*), peneireiro-vulgar (*Falco tinnunculus*) e francelho (*Falco naumanni*) (Samour et al. 1995).

Na Arábia Saudita, em 1999, foram reportados dois casos em sacre (Samour 2000). Em 1998-2003, verificou-se uma prevalência de infeção de 5,5% em Falconiformes, incluindo

as espécies sacre (88%), falcão-peregrino (8%), alfanque (2%), gerifalte (*Falco rusticolus*) (1%) e híbridos gerifalte (1%) (Samour and Naldo 2003). Em 2018-2019, foi reportada uma prevalência de 26,58% em Falconiformes, 16,49% em sacre, 41,66% em falcão-peregrino e 43,24% em gerifalte (Alrefaei 2020).

Em Espanha, 2005-2008, Sansano-Maestre et al. (2009) reportaram uma prevalência de 10,3% em peneireiro-vulgar e de 12,5% em falcão-peregrino. Mais tarde, 2011-2013, Martínez-Herrero et al. (2014) reportaram uma prevalência de 14,2% e de 4,2% nos hospedeiros referidos anteriormente, respetivamente, e uma prevalência de 4,4% em francelho de cativoiro, com animais infetados com a forma subclínica.

2.7.3 Accipitriformes

Em dois estudos retrospectivos realizados nos Estados Unidos da América e em Espanha, a tricomoníase aviária foi a causa infecciosa mais frequente em aves de rapina em centros de recuperação (Wendell et al. 2002; Molina-López et al. 2011). No entanto, estudos sobre a mesma em aves de rapina selvagens são ainda escassos e os esforços de vigilância restringem-se principalmente a espécies ameaçadas (Gómez et al. 2018), como por exemplo, águia-perdigueira ou águia-de-Bonelli (*Aquila fasciata*) e açor (*Accipiter gentilis*).

Em 1971, Koyama et al. (1971) reportaram *T. gallinae* em secretário (*Sagittarius serpentarius*).

Na América do Norte, foram reportados casos em gavião-pedreiros (*Buteo nitidus*) (Stensrude 1965), águia-real (*Aquila chrysaetos*) (Beecham and Kochert 1975) e pigargo-americano (*Haliaeetus leucocephalus*) (Stone and Nye 1981).

Na África do Sul, foram diagnosticados casos positivos em açor-africano (*Accipiter tachiro*), gavião-ruivo (*Accipiter rufiventris*), águia-d'asa-redonda (*Buteo buteo*) e milhafre-preto-africano (*Milvus migrans parasitus*) (Pepler and Oettle 1992).

Quanto ao açor, na Grã-Bretanha a população em estudo demonstrou-se suscetível ao protozoário, apresentando uma elevada taxa de mortalidade (Cooper and Petty 1988). Na Polónia e na Alemanha foi reportada uma taxa de infeção de 100% e de 65,1%, respetivamente, contudo foi registada uma reduzida taxa de mortalidade (Wieliczko et al. 2003; Krone et al. 2005).

Em relação ao falcão-do-tanoeiro (*Accipiter cooperii*), no Arizona 85% das crias que habitavam o meio urbano testaram positivo para *T. gallinae* (Boal et al. 1998). Por outro lado, Rosenfield et al. (2002) registaram uma prevalência de 2,7% em animais de 5 a 22 meses, sem mortalidade.

No que se refere à águia-perdigueira ou águia-de-Bonelli, na Península Ibérica, tem-se observado uma elevada prevalência de *T. gallinae* em crias (Muñoz 1995; Amin et al. 2014). Höfle (2001) reportou uma prevalência de 50% no sul de Portugal, Real (2000) uma prevalência de 36% na Catalunha (Espanha), Santos (2019) uma prevalência de 6,3% nos parques naturais Douro Internacional e Arribes del Duero e Martínez-Herrero (2021) uma prevalência de 45,5% em Espanha, em que 39,4% dos indivíduos apresentavam lesões características de tricomoniase.

Em Espanha, Martínez-Herrero et al. (2014) analisaram amostras de 2011 a 2013 provenientes de centros de recuperação e centros de anilhagem. A prevalência geral de infecção foi de 20,3%, 11,4% em aves predadoras e 43,3% em aves presa. O genótipo, tipo de hospedeiro (predador/presa) e dieta (ornitófago/ornitófago não estrito) foram apontados como fatores de risco. Aves de rapina ornitófagas, principalmente aquelas que incluem Columbiformes na sua dieta, estão em maior risco de exposição e infecção.

Os Columbiformes representam uma grande proporção da dieta do açor, do falcão-dotanoeiro e da águia-perdigueira ou águia-de-Bonelli, devido à diminuição da presa tradicional, como por exemplo o coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*), justificando a elevada prevalência de *T. gallinae* nestas espécies. No entanto, verifica-se uma reduzida taxa de mortalidade, explicada pela evolução bem adaptada da relação hospedeiro-parasita (Boal et al. 1998; Toyne 1998; Real et al. 2000; Höfle et al. 2001; Wieliczko et al. 2003; Krone et al. 2005)

2.7.4 Strigiformes

A tricomoniase afeta também as aves de rapina noturnas. Contudo, os casos reportados em Strigiformes são infrequentes quando comparados com os casos reportados em aves de rapina diurnas. Tal poderá ser justificado pelo facto de os columbídeos não serem um alimento com destaque na dieta das aves de rapina noturnas, resultando em menor exposição ao parasita (Redig et al. 1993; Niedringhaus et al. 2019). No entanto poderá haver exceções, como se verificou num estudo realizado por Quillfeldt et al. (2018), onde registaram uma prevalência de 58% em Strigiformes, superior à prevalência registada para Accipitriformes (36%) e para Falconiformes (28%).

Na ordem Strigiformes, as corujas-das-torres (*Tyto alba*) são frequentemente afetadas pela doença (Redig et al. 1993; Morishita et al. 1997). As prevalências nesta espécie foram baixas nos EUA (2%) (Schulz 1986), na Inglaterra (<1%) (Cooper and Greenwood 1981) e em Espanha (5,6%; 14,3%) (Sansano-Maestre et al. 2009; Martínez-Herrero et al. 2014), no entanto, foram consideravelmente altas no Hawaii (24%) (Work and Hale 1996) e em Itália (50%) (Delogu et al. 1997).

Para além da espécie referida anteriormente, foram reportados casos em jacurutu (*Bubo virginianus*) (Jessup 1980), bufo-real (*Bubo bubo*) (Cooper and Greenwood 1981; Martínez-Herrero et al. 2014), coruja-barrada (*Strix varia*) (Redig et al. 1993; Niedringhaus et al. 2019), bufo-pequeno (*Asio otus*) (Martínez-Herrero et al. 2014), coruja-orelhuda (*Asio clamator*) (Ecco et al. 2012), mocho-d'orelhas (*Otus scops*) (Martínez-Herrero et al. 2014), coruja-pintada (*Strix occidentalis*) (Rogers et al. 2016b) e coruja-do-mato (*Strix aluco*) (Martínez-Herrero et al. 2014).

2.7.5 Passeriformes

Nos últimos anos, a tricomoníase tem ganho alguma atenção e importância nas populações de aves selvagens da ordem Passeriformes (Gómez et al. 2018).

Em 2002, foi reportado um surto nas espécies pintarroxo-mexicano (*Carpodacus mexicanus*) e pardal-do-telhado (*Passer domesticus*) nos EUA (NWHC 2002). Entre 2001 e 2005, um centro de recuperação na Califórnia identificou casos positivos de tricomonádídeos em pintarroxo-mexicano, corvídeos, tal como, corvo-americano (*Corvus brachyrhynchos*), corvo (*Corvus corax*) e gaio-dos-matos-ocidental (*Aphelocoma californica*), e tordo-imitador (*Mimus polyglottos*) (Anderson et al. 2009). Em 2010, Anderson et al. (2010) descreveram os sinais clínicos e histopatologia associados à infeção por *T. gallinae* em pintarroxo-mexicano selvagem, afirmando que a tricomoníase atingiu o nível de doença emergente nesta espécie. Forzán et al. (2010) assinalaram tricomoníase no Canadá em pintarroxo-púrpura (*Carpodacus purpureus*) e pintassilgo-americano (*Carduelis tristis*).

Em relação à Europa, os primeiros casos surgiram no Reino Unido em 2005. Foi reportado pela primeira vez *Trichomonas* spp. associada a ingluvite necrótica em aves selvagens da família Fringillidae, tentilhão (*Fringilla coelebs*) e verdilhão (*Carduelis chloris*) (Pennycott et al. 2005; Lawson et al. 2006). No anos seguintes, 2006-2007, registou-se um declínio populacional de verdilhão e tentilhão, 35% e 21%, respetivamente (Robinson et al. 2010). Em 2012, foi reportado o declínio acentuado e contínuo da população reprodutora de verdilhão nas ilhas Britânicas, com redução concomitante do tamanho do bando, como resultado da doença infecciosa emergente tricomoníase (Lawson et al. 2012). Os surtos de tricomoníase estenderam-se a outras países da Europa, tal como, Noruega, Suécia e Finlândia (Neimanis et al. 2010), seguindo-se de surtos na Alemanha (Peters et al. 2009; Chavatte et al. 2019a), França (Gourlay et al. 2011), Áustria (Ganas et al. 2014), Eslovénia (Zadravec et al. 2012) e Suíça (Dirren et al. 2022). Dados epidemiológicos e dados de retorno de animais anilhados apoiam a migração de aves como um mecanismo plausível para propagação da doença e sugerem o tentilhão como o vetor primário mais provável (Lawson, Robinson, et al. 2011; Zu Ermgassen et al. 2016).

2.7.6 Psittaciformes

Existem inúmeros casos reportados de infecções por *Trichomonas* spp. na ordem dos Psittaciformes. No entanto, são poucos os estudos em populações de aves selvagens (Park 2011), sendo a maioria identificada em animais de estimação (Gómez et al. 2018).

Murtaugh e Jacobs (1984) reportaram *Trichomonas* spp. numa caturra (*Nymphicus hollandicus*) com 1 ano de idade, cujos únicos sinais clínicos apresentados eram emaciação e espessamento marcado do papo.

Um papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) com 10 semanas foi hospitalizado devido a fraqueza e insuficiência respiratória, com posterior confirmação de *Trichomonas* sp. (Garner and Sturtevant 1992).

Lumeiji (1994) compilou alguns dos casos clínicos de tricomoníase em Psittaciformes, como, por exemplo, em papagaio-de-nuca-amarela (*Amazona auropalliata*) e papagaio-de-coroa-azul (*Amazona finschi*), sugerindo que a doença nesta ordem é subdiagnosticada.

Mckeon et al. (1997) reportaram uma prevalência de 11,4% em coleções privadas de periquito-comum (*Melopsittacus undulatus*), na Austrália.

Em 2011, foi realizada uma revisão de casos clínicos de tricomoníase aviária, na qual estavam incluídos 146 psittaciformes e onde foram reportados os primeiros casos em lóris-de-coroa-roxa (*Glossopsitta porphyrocephala*) e lóris-arco-íris (*Trichoglossus haematodus*) (Park 2011).

2.7.7 Galliformes

Foram reportados alguns casos em peru (*Meleagris gallopavo*), selvagens e de produção industrial, e galo (*Gallus gallus*) (Davidson et al. 1985; Willoughby et al. 1995; Grabensteiner et al. 2010; Mirzaei et al. 2016; Albeshr and Alrefaei 2019). No entanto, a afeção de galináceos selvagens é, aparentemente, rara (Gómez et al. 2018).

O nome *Trichomonas gallinae* deriva desta ordem, uma vez que a primeira descrição do parasita foi feita por Rivolta, em 1878, na mesma (Stabler 1938; Stabler 1954).

2.7.8 Anseriformes

Foram reportadas duas incidências de tricomoníase numa exploração de patos, envolvendo o trato respiratório superior e o trato digestivo inferior. No primeiro surto, os animais apresentavam inchaço bilateral dos seios infraorbitais, espirros e diarreia profusa, com alta mortalidade em patos jovens. As lesões histológicas consistiam em sinusite

mucofibrino-purulenta e rinite, traqueíte e enterite catarrais. Contudo, foi isolado e determinado como agente etiológico a espécie *Tetratrichomonas anatis* (Tsai et al. 1997).

Grunenwald et al. (2018) reportaram o primeiro caso de tricomoníase em pato marinho selvagem, êider (*Somateria mollissima*). Durante um surto de vírus Wellfleet Bay (WFBV) na região de Massachusetts, foram isolados *Trichomonas* sp. e *T. gallinae* em dois indivíduos. Potencialmente, a sua infecção resultou da ingestão de água contaminada.

2.7.9 Gruiformes

Bailey et al. (1996) documentaram tricomoníase no trato digestivo superior de duas espécies de abetardas, abetarda-moura (*Chlamydotis undulata*) e abetarda-de-poupa (*Eupodotis ruficrista*), nos Emirados Árabes Unidos.

Em 1998, foi realizada uma pesquisa de protozoários orofaríngeos em abetardas mantidas em cativeiro, nos Emirados Árabes Unidos. Foram detetadas *Trichomonas* sp. em 9 animais, duas abetardas-mouras e sete abetardas-gigantes (*Ardeotis kori*) (Silvanose et al. 1998).

2.7.10 Charadriiformes

Em 1938, Hees reportou um caso de tricomoníase na ordem Charadriiformes, espécie não identificada, nas Ilhas Shetland ao largo da costa da Escócia. Foram identificadas as lesões e o protozoário (Forrester and Foster 2008).

3 Novas espécies e variantes de tricomoníase orofaríngea

Tradicionalmente, *T. gallinae* é considerado o agente etiológico da tricomoníase. Contudo, nos últimos anos foram descritas novas espécies e variantes associadas à doença (Stabler 1947; BonDurant and Honigberg 1994; Girard et al. 2013; Amin et al. 2014; Martínez-Díaz et al. 2014; Gómez et al. 2018).

3.1 *Trichomonas stableri*

3.1.1 Morfologia

A espécie *T. stableri* apresenta as estruturas externas que caracterizam *T. gallinae*. No entanto, foram descritos dois morfotipos: a forma alongada, comprimento entre 11,02 e 15,06 µm e largura entre 5,29 e 7,93 µm, e a forma redonda, comprimento entre 7,58 e 9,12 µm e largura entre 5,09 e 7,32 µm (Girard et al. 2013).

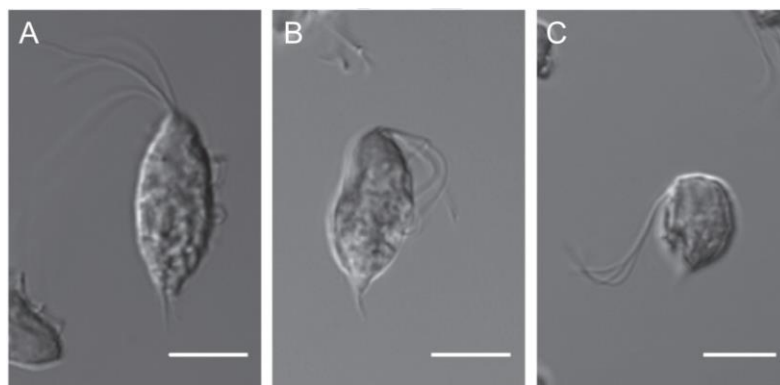


Figura 4 - Microfotografia de trofozoítos do género *Trichomonas*: *T. gallinae* (A), forma delgada *T. stableri* (B) e forma redonda *T. stableri* (C). Barras de escala 5 μ m. Adaptado de Girard et al. (2013)

3.1.2 Hospedeiros

Até à data, a espécie *T. stableri* apenas foi reportada em pombo-de-cauda-longa-do-norte (*Patagioenas fasciata monillii*) na Califórnia (EUA) (Girard et al. 2013; Girard et al. 2014) (Tabela 1).

Aves infetadas com *T. stableri* apresentavam lesões caseonecroticas obstrutivas graves na cavidade oral e esófago, indistinguíveis daquelas provocadas por *T. gallinae*. Desta forma, foi possível concluir que o carácter patogénico das espécies referidas é idêntico. Foram também detetadas co-infeções com *T. gallinae* (Girard et al. 2013).

Os surtos ocorreram no inverno e na primavera e a prevalência de infeção foi superior em adultos em comparação com juvenis, semelhante ao surto reportado em Espanha numa população invernante de pombo-torcaz (Villanúa et al. 2006). Os fenómenos anteriormente referidos têm fortes implicações na população de pombo-de-cauda-longa-do-norte, em declínio desde 1966 (Girard et al. 2014).

3.2 *Trichomonas gypaetini*

3.2.1 Morfologia

A espécie *T. gypaetini* apresenta as características morfológicas do género *Trichomonas*. No entanto, comparativamente com *T. gallinae*, apresenta valores menores para cada uma das características, exceto para a projeção do axóstilo, que é maior (*T. gypaetini* 8x6 μ m vs. *T. gallinae* 11x7 μ m) (Martínez-Díaz et al. 2014).

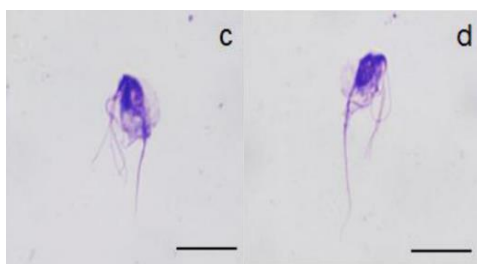


Figura 5 - *Trichomonas gypaetinae* detetado em abutre-do-Egipto (c) e em abutre-preto (d). Barra de escala 10 μ m. Adaptado de Martínez-Díaz (2014).

3.2.2 Hospedeiros

Na sequência de um estudo epidemiológico realizado em centros de recuperação de Espanha, foram detetados e descritos tricomonádídeos semelhantes a *T. gallinae* na cavidade orofaríngea de abutres-do-Egipto (*Neophron percnopterus*) e abutres-pretos (*Aegypius monachus*) que não exibiam sinais clínicos. A nova espécie foi denominada de *Trichomonas gypaetinae* devido à sua presença na subfamília Gypaetinae (Abutres do Velho Mundo) (Martínez-Díaz et al. 2014) (Tabela 1).

Para além do referido, foram reportados casos em quebra-ossos (*Gypaetus barbatus*) (Grabensteiner et al. 2010), em pigargo-americano (*Haliaeetus leucocephalus*) (Kelly-Clark et al. 2013), ambos inicialmente identificados *Trichomonas vaginalis-like*, em águia-real (*Aquila chrysaetos*) (Dudek et al. 2018), em águia-marinha-gigante (*Haliaeetus pelagicus*), em pigargo (*Haliaeetus albicilla*) (Tomikawa et al. 2021) e águia-perdigueira (Alejandro Mateo et al. 2022) (Tabela 1).

3.3 Novas variantes

Recentemente, foram caracterizadas novas variantes responsáveis por tricomoníase orofaríngea em aves selvagens com maior homologia genética com outros tricomonádídeos do que com *T. gallinae*. A investigação realizada no âmbito do complexo etiológico da tricomoníase aviária permite o conhecimento da epidemiologia da doença. A distinção entre novas espécies e subespécies é trabalhosa, sendo necessário considerar variáveis como morfologia e genética. Desta forma, estudos futuros irão permitir determinar a extensão e a distribuição de hospedeiros destas novas variantes ou organismos (Gómez et al. 2018) (Tabela 1).

Tabela 1 - Novas espécies e variantes de tricomonádídeos orofaríngeos detetados em aves. Adaptado de Gómez (2018).

Novas espécies/variantes	Hospedeiro	País	Referência
<i>T. vaginalis</i> -like	rolinha-cinzenta (<i>Columbina passerina</i>)	EUA	(Gerhold et al. 2008)
<i>Trichomonas</i> sp.	tordo-imitador	EUA	(Anderson et al. 2009)
<i>T. vaginalis</i> -like (mais tarde <i>T. gypaetini</i>)	quebra-ossos	República Checa	(Grabensteiner et al. 2010)
<i>T. tenax</i> -like	pombos de corrida	Áustria	
<i>T. vaginalis</i> -like	coruja-orelhuda	Brasil	(Ecco et al. 2012)
<i>Simplicomonas</i> sp.	trinca-ferro-verdadeiro (<i>Saltator similis</i>)	Brasil	
<i>T. vaginalis</i> -like (mais tarde <i>T. gypaetini</i>)	pigargo-americano	Canadá	(Kelly-Clark et al. 2013)
<i>T. tenax</i> -like	rola-turca, pombo-torcaz e seixa	RU	(Lennon et al. 2013)
<i>T. stableri</i>	pombo-de-cauda-longa-do-norte	EUA	(Girard et al. 2014)
<i>T. blagburni</i> -like	pombo-de-cauda-longa-do-norte	EUA	
<i>T. canistomae</i> -like	rola-brava e açor	Espanha	(Martínez-Herrero et al. 2014)
<i>T. gypaetini</i>	abutre-preto e abutre-do-Egipto	Espanha	(Martínez-Díaz et al. 2014)
<i>Trichomonas</i> sp.	rola-turca	RU	(Stockdale et al. 2014)
<i>T. gypaetini</i>	águia-marinha-gigante e pigargo	Japão	(Tomikawa et al. 2021)
	águia-perdigueira	Espanha	(Alejandro Mateo et al. 2022)

4 Fatores que desencadeiam a patogenicidade do parasita

Como referido anteriormente, *T. gallinae* pode ser patogénico sob determinadas circunstâncias e são precisos fatores de risco para desenvolvimento da doença. Se estes fatores não estiverem presentes a doença não se desenvolve, sendo possível a existência de “portadores sãos” (Amin et al. 2011; Amin et al. 2014; Gómez et al. 2018).

Do conhecimento da autora, atualmente, existem fatores de risco para desenvolvimento da doença associados ao hospedeiro (susceptibilidade do hospedeiro, resposta imunitária e situações de *stress*) e associados ao parasita (virulência associado ao genótipo) (Qiu et al. 2012; Marx et al. 2017; Dudek et al. 2018; Gómez et al. 2018). Em relação à susceptibilidade do hospedeiro, por exemplo, quando as aves de rapina se alimentam exclusivamente de aves, as lesões devido a tricomoníase são menos frequentes. Esta

situação pode ser explicada por uma resposta imunitária eficaz, e se o animal tem contacto frequente com o parasita torna-se refratário ao desenvolvimento da doença. Os autores reportam uma relação inversa entre a taxa de prevalência e a percentagem de animais que apresentam lesões macroscópicas (Bunbury et al. 2007; Sansano-Maestre et al. 2009; Martínez-Herrero et al. 2014).

Para além do referido, animais naïve e animais previamente expostos ao parasita sob circunstâncias que reduzem a resposta imunitária, tais como migração, *stress* alimentar, condições climáticas e época de reprodução, podem desenvolver a doença (Höfle et al. 2004; Villanúa et al. 2006; Robinson et al. 2010; Lawson, Cunningham, et al. 2011; Lennon et al. 2013; Stockdale et al. 2014; McBurney et al. 2017).

Relativamente ao parasita, os genótipos podem ser patogénicos ou não patogénicos, como descrito para outros protozoários (*Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp.). De entre os vários genótipos, destacam-se ITS-OBT-Tg-1 (genótipo A) e ITS-OBT-Tg-2 (genótipo C) com potencial para induzir doença, ambos detetados em animais com lesões. O genótipo de *T. gallinae* está associado com a espécie de ave, embora os genótipos mais frequentes tenham sido detetados numa variedade de espécies.

Uma associação entre o genótipo ITS-OBT-Tg-1 e a presença de lesões macroscópicas foi reportada pela primeira vez por Sansano-Maestre (2009) e, mais tarde, por outros autores incluindo outras espécies de aves (Chi et al. 2013). Em 2015, McBurney (2015) relatou que tentilhões e pombos-das-rochas com sinais clínicos de tricomoníase transportavam o mesmo genótipo (ITS-OBT-Tg-1), enquanto animais saudáveis transportavam outro genótipo (ITS-OBT-Tg-2). Stockdale (2014) isolou 4 linhagens de *T. gallinae* em rolas-bravas em que todos os animais com sinais clínicos transportavam o genótipo ITS-OBT-Tg-1. Apesar deste genótipo também ter sido detetado em animais sem sinais clínicos, é possível que os mesmos tenham sofrido com a doença no passado (Zu Ermgassen et al. 2016; Gómez et al. 2018).

O número de casos fatais ou casos com lesões macroscópicas onde apenas o genótipo ITS-OBT-Tg-2 foi detetado é muito menor. O único estudo envolvendo o genótipo ITS-OBT-Tg-2 com o desenvolvimento de lesões foi realizado em Columbiformes no Egipto, em qual o referido aparenta aparecer mais frequentemente, especialmente em pombais. Neste estudo, apenas um genótipo do parasita foi encontrado, e apenas uma pequena percentagem dos indivíduos desenvolveu lesões (El-Khatam et al. 2016; Gómez et al. 2018).

Infeções mistas (mais do que um genótipo) foram reportadas por diferentes autores e é possível que perante uma infeção mista apenas um genótipo seja detetado por cultura ou sequenciação por PCR (Gómez et al. 2018; Martínez-Herrero et al. 2020).

Ainda está por investigar a associação do genótipo com a categorização da doença, como casos de letalidade, órgãos internos afetados e severidade das lesões orofaríngeas (Gómez et al. 2018).

5 Diagnóstico

Para a realização do diagnóstico de tricomoníase é imprescindível conjugar a informação obtida durante o exame clínico, por conhecimento da anamnese e observação dos sinais clínicos e lesões, e durante os exames laboratoriais, por método direto, cultura, coloração, detecção de ácidos nucleicos (DNA e RNA) ou técnica baseada em anticorpos (Silva 2017).

5.1 Diagnóstico clínico

5.1.1 Sinais clínicos e Lesões

A maioria dos sinais clínicos apresentados pela ave infetada estão relacionados com as lesões orais que impedem ou prejudicam a alimentação. Desta forma, a ave pode exibir emaciação, anorexia, disfagia, letargia, perda de peso, penas eriçadas, hipersialia, regurgitação e diarreia. As penas junto à cavidade nasal e oral podem parecer coladas ao bico devido a regurgitação. Quando presente, a diarreia caracteriza-se por fezes pastosas amareladas. Para além do referido, as lesões orais podem também levar a sinais respiratórios como por exemplo ruídos respiratórios, dispneia, aumento dos seios nasais e região facial, conjuntivite, sinusite e corrimento nasal (Narcisi et al. 1991; Cole 1999; Forrester and Foster 2008; Dorrestein 2009; Anderson et al. 2010; Amin et al. 2014; Samour 2016; Gómez et al. 2018; Martínez-Herrero et al. 2020).

Geralmente, as lesões de tricomoníase são caracterizadas como placas firmes, bem circunscritas, amareladas e caseosas. No trato gastrointestinal superior, as lesões iniciais podem ser pequenas e niveladas com a superfície do epitélio, mas posteriormente desenvolvem pequenas projeções centrais em forma de esporão, podendo coalescer, formando grandes massas caseosas (Stabler 1954; Forrester and Foster 2008).

As lesões de tricomoníase podem ser agravadas pela presença de outras doenças infecciosas como, por exemplo, capilariose, ou pela presença de processos debilitantes que suprimam a resposta imunitária (Martínez-Herrero et al. 2020).

Dependendo da ordem do hospedeiro, existem diferentes padrões de distribuição de lesões macroscópicas (Martínez-Herrero et al. 2020). Em Columbiformes, os granulomas caseonecróticos são o tipo de lesão mais frequentemente descrita no trato digestivo superior, localizados maioritariamente na cavidade orofaríngea, mas também no papo, esófago e seios

paranasais. Apresentam-se como lesões sólidas amarelo-esbranquiçadas, distribuídas focal ou multifocalmente, causando destruição óssea e cartilaginosa no crânio e cavidade orofaríngea de algumas aves (Mesa et al. 1961; Höfle et al. 2004; Hegemann et al. 2007; Sansano-Maestre et al. 2009; Ecco et al. 2012; Amin et al. 2014; Girard et al. 2014; Stockdale et al. 2014; Martínez-Herrero et al. 2020). Em Accipitriformes, são mais comumente encontrados granulomas caseonecróticos orofaríngeos no trato digestivo superior, assim como invasão da cavidade ocular e encefálica (Real et al. 2000; Höfle et al. 2004; Krone et al. 2005; Gómez et al. 2018; Martínez-Herrero et al. 2020). Lesões em Falconiformes foram encontradas na orofaringe, com proliferação nodular caseosa, mas também no papo, esófago, cavidade nasal, seios infraorbitais e siringe (Samour et al. 1995; Samour 2000; Samour and Naldo 2003; Martínez-Herrero et al. 2020). Em Strigiformes, os granulomas caseonecróticos tendem a localizar-se no palato com envolvimento da fenda das coanas, crânio, seios paranasais e base da faringe (Sansano-Maestre et al. 2009; Ecco et al. 2012; Niedringhaus et al. 2019; Martínez-Herrero et al. 2020; Rogers et al. 2016b).

5.1.2 Diagnóstico Diferencial

As lesões descritas anteriormente são características de tricomoníase aviária, no entanto, não são lesões patognomónicas. Por exemplo, infecção por vírus (Poxvirus; Herpesvirus), fungos (*Candida* sp.; *Aspergillus* sp.), nematodes (*Capillaria* sp.) e bactérias (*Salmonella* sp.; *Pseudomonas* sp.), hipovitaminose A e sialolitíase podem resultar em lesões orais semelhantes (Cole 1999; Samour and Naldo 2003; Herdt and Pasmans 2009; Park 2011; Samour 2016).

5.2 Diagnóstico laboratorial

De acordo com Gómez et al. (2018), a confirmação e identificação da espécie deve ser realizada em laboratório mesmo em casos em que os sinais clínicos e achados patológicos sejam sugestivos de tricomoníase.

5.2.1 Método direto

A deteção de *T. gallinae* pode ser realizada por método direto, através de esfregaço da cavidade orofaríngea, esófago proximal e/ou papo, de muco e/ou lesões (BonDurant and Honigberg 1994; Cole 1999; Bunbury et al. 2005; Hamad and Hassan 2017a). As amostras podem ser realizadas *ante-mortem* ou *post-mortem*, até 48h após a morte (Erwin et al. 2000; Schulz et al. 2005; Díez Baños and Fernández 2018) As amostras colhidas, com zaragatoa estéril embebida em solução salina, são apostas sobre uma lâmina e observadas ao microscópio ótico numa ampliação de x100 e x400 (Samour and Naldo 2003).

A forma elipsoide alongada, a presença de uma membrana ondulante associada a quatro flagelos livres anteriores e o movimento característico dos trofozoítos, movimentos bruscos de rotação, facilitam a detecção do parasita (Gómez et al. 2018; Arfin et al. 2019). No entanto, os resultados irão depender da técnica e material usado, da capacidade do observador para detecção do parasita na preparação e da intensidade de infecção na ave (Bunbury et al. 2005).

5.2.2 Cultura

Quando comparadas com o método direto, as culturas mostraram maior sensibilidade na detecção do parasita, tornando-se extremamente úteis perante infecções de baixa intensidade (Fouts and Kraus 1980; Bunbury et al. 2005; Forrester and Foster 2008). Para além do referido, as mesmas podem ser utilizadas como meio de transporte do campo para o laboratório (Gómez et al. 2018).

O parasita *T. gallinae* multiplica-se numa variedade de meios líquidos e semi-sólidos, como meio Diamond, meio Diamond modificado (TYM), meio cisteína-peptona-maltose (CPLM) e meio *InPouch* TF (Stabler 1954; Cooper and Petty 1988; BonDurant and Honigberg 1994; Forrester and Foster 2008; Gerhold et al. 2008; Sansano-Maestre et al. 2009; Martínez-Herrero et al. 2014; Hamad and Hassan 2017a; Martínez-Herrero et al. 2020).

O meio *InPouch* TF, um produto originalmente desenvolvido para cultura de *Tritrichomonas foetus* de animais de produção, apresenta a mesma sensibilidade que o meio Diamond e é conveniente e eficaz para uso no campo (Bunbury et al. 2005; Forrester and Foster 2008; Qamar et al. 2017a).

5.2.3 Coloração

O risco de falsos negativos em esfregaços de aves com baixo número de trofozoítos é elevado, especialmente no início da infecção (Gómez et al. 2018). Desta forma, a maioria dos protocolos experimentais que recorrem a coloração para detecção de tricomonadídeos, realizam esfregaços a partir de culturas com meios de crescimento adequados e incubação a temperatura ideal (Amin et al. 2014).

Fixam-se os esfregaços nas lâminas para, posteriormente, serem aplicados diferentes métodos de coloração, como Giemsa, Papanicolau, Field, Gram, Diff-Quick, Grocott, entre outras colorações (Tasca and De Carli 2003; Neimanis et al. 2010; Borji et al. 2011; Amin et al. 2014; Khatoon et al. 2014; Hamad and Hassan 2017a).

Nos tecidos, realizam-se colorações histoquímicas, recorrendo-se a corantes como Hematoxilina-Eosina (HE) e/ou Ácido Periódico de Schiff (PAS). As colorações mencionadas

são limitadas para a identificação dos flagelados, principalmente em tecidos necróticos e/ou com baixas cargas parasitárias (Höfle et al. 2004; Mostegl et al. 2010; Neimanis et al. 2010; Amin et al. 2011; Brunthaler et al. 2022).

5.2.4 Detecção de ácidos nucleicos (DNA e RNA)

A presença de DNA do parasita pode ser detetada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) em fluídos orais, tecidos ou a partir de fezes. Foram descritos vários *primers* para confirmação e identificação da espécie do género *Trichomonas*, direcionados sobretudo para os loci genómicos rRNA de subunidade menor (SSU rRNA), Fe-hidrogenase, 18S rRNA, ITS1/5.8S rRNA/ITS2 e *rpb1* (Felleisen 1997; Delgado-Viscogliosi et al. 2000; Höfle et al. 2004; Grabensteiner and Hess 2006; Gaspar da Silva et al. 2007; Gerhold et al. 2008; Cepicka et al. 2010; Grabensteiner et al. 2010; Lawson, Cunningham, et al. 2011; Malik et al. 2011; Chi et al. 2013; Ganas et al. 2014; Girard et al. 2014). Esta técnica permite o diagnóstico independentemente da sobrevivência do parasita (Bunbury et al. 2005).

A hibridização *in situ* (ISH) permite a deteção de ácidos nucleicos parasitários em amostras de tecidos. Através do refinamento desta técnica, será possível determinar a localização do protozoário no tecido, estimar a carga parasitária e correlacionar as alterações histológicas com a presença do mesmo, permitindo o estudo da virulência a nível celular. A ISH mostra-se eficaz na deteção de RNA protozoário mesmo em tecido necrótico, autolisado ou congelado (Liebhart et al. 2006; Forrester and Foster 2008; Mostegl et al. 2010; Amin et al. 2011; Amin et al. 2014; Brunthaler et al. 2022).

A tecnologia FTA (cartões FTA) permite a colheita, transporte, arquivo e isolamento de ácidos nucleicos à temperatura ambiente (Whatman 2022). Foi avaliada a eficácia de cartões FTA como potencial substrato de armazenamento de isolados de *T. gallinae* para análise molecular subsequente. Conclui-se que em animais com baixa carga parasitária poderá haver um decréscimo de sensibilidade do PCR. Serão precisos mais estudos para avaliar a completa eficácia dos mesmos como ferramenta de diagnóstico para *T. gallinae* (Holt et al. 2015).

5.2.5 Técnica baseada em anticorpos

Sob condições experimentais, utilizou-se um ELISA para deteção de anticorpos contra *T. gallinarum* no soro de aves de produção infetadas. Não foram detetados anticorpos nas amostras colhidas, sugerindo-se que os protozoários utilizados apresentavam baixa virulência ou o período de tempo da investigação foi insuficiente para a indução de níveis mensuráveis de anticorpos (Amin et al. 2011).

Desta forma, está por se determinar se tais técnicas poderão ser úteis como método de diagnóstico de tricomoníase e, por outro lado, se permitirão a detecção de aves portadoras (Amin et al. 2011; Amin et al. 2014).

6 Tratamento

6.1 Tratamento específico e dirigido à tricomoníase

Em medicina veterinária, vários nitroimidazóis incluindo metronidazol, dimetridazol, ronidazol, carnidazol, ornidazol e tinidazol, são considerados eficazes contra *T. gallinae* (Stabler and Mellentin 1953; Vogel et al. 1983; Franssen and Lumeij 1992; Redig et al. 1993; Foreyt 2001; Mehlhorn 2008). No entanto, têm sido reportadas linhagens resistentes do gênero *Trichomonas* a estes fármacos (Lumeij and Zwijnenberg 1990; Franssen and Lumeij 1992; Kulda et al. 1993; Munoz et al. 1998; Gerhold et al. 2008; Zimre-Grabensteiner et al. 2011; Rouffaer et al. 2014; Tabari et al. 2017). Lumeij e Zwijnenberg (1990) reportaram o primeiro caso de resistência de *T. gallinae* a nitroimidazóis e sugeriram que o uso indiscriminado destes fármacos em doses sub-terapêuticas proporcionaram circunstâncias ideais para o desenvolvimento do parasita. Quando em doses sub-terapêuticas, a substância ativa torna-se ineficaz na cura da afeção promovendo o desenvolvimento de resistências em linhagens de *T. gallinae* (Munoz et al. 1998; Cole 1999; Höfle et al. 2004).

Desta forma, torna-se fundamental encontrar agentes alternativos aos nitroimidazóis, que possam ser usados preventivamente ou como forma de terapêutica. Cerca de quatro compostos sintéticos (chalconas) produziram atividade antitricomonal significativa contra *T. gallinae* e demonstraram baixa toxicidade para o hospedeiro, o composto mais ativo demonstrou-se quase tão potente quanto o metronidazol (Oyedapo et al. 2004). Recentemente, extratos de alho (*Allium* spp.), artemísia (*Artemisia sieberi*), arruda-síria (*Peganum harmala*), erva-das-disenterias (*Pulicaria dysenterica*), marroio-de-água (*Lycopus europaeus*), manjerição (*Ocimum basilicum*), eucalipto-comum (*Eucalyptus globulus*) e capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) demonstraram a sua potencial eficácia contra *T. gallinae* (Seddiek and Khater 2014; Tabari et al. 2017; Youssefi et al. 2017; Nikpay and Soltani 2018; Baccega et al. 2019; Baccega et al. 2021) (Tabela 2).

Tabela 2 – Substâncias utilizadas perante tricomoníase aviária.

Composto		Posologia	Tempo de tratamento	Via de administração	Referência
Metronidazol		15-30 mg/kg BID	5-7 dias	PO	(Miller and Fowler 2015)
		25-50 mg/kg SID	7 dias	PO	(Seddiek and Khater 2014; Tabari et al. 2017; Youssefi et al. 2017; Baccega et al. 2021)
Dimetridazol		900 mg/L (5 dias) seguido de 700 mg/L (10 dias)	15 dias	Água de bebida	(Hawkins et al. 2018: 5)
Ronidazol		6-10 mg/kg SID	6-10 dias	PO	
Carnidazol		12,5-25 mg/kg	Uma administração	PO	
		30 mg/kg	Uma administração	PO	
		30 mg/kg SID	3 dias	PO	
Tinidazol		50 mg/kg	Uma administração	PO	
<i>Allium</i> spp.		200 mg/kg SID	7 dias	PO	(Seddiek and Khater 2014)
<i>Artemisia sieberi</i>		25-50 mg/kg SID	7 dias	PO	(Youssefi et al. 2017)
<i>Peganum harmala</i>		25 mg/kg SID	3 dias	PO	(Tabari et al. 2017)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Óleo essencial	0,55 mg/kg SID	7 dias	PO	(Baccega et al. 2021)
	Nanoemulsão	0,44 mg/kg SID	7 dias	PO	

Em alguns casos, poderá ser necessária a excisão cirúrgica dos granulomas (Samour 2016; Gómez et al. 2018; Martínez-Herrero et al. 2020).

De referir que, de acordo com Martínez-Herrero et al. (2020), aves com lesões leves ou moderadas apresentam uma boa taxa de sobrevivência quando prontamente tratadas, por outro lado, a presença de lesões graves resultam na morte ou eutanásia na maioria dos casos.

6.2 Tratamento de suporte

Perante emaciação e anorexia, o balanço hidroeletrólítico e o estado catabólico devem ser obrigatoriamente corrigidos com fontes de energia suplementares e fluidoterapia (Redig et al. 1993; Gómez et al. 2018).

Pode ser considerada a utilização de antibióticos de largo espectro de forma a prevenir infeções bacterianas secundárias (Gómez et al. 2018). Contudo, os antibióticos podem despoletar a ativação de infeções fúngicas latentes e, possivelmente, tricomoníase latente. Assim sendo, a sua utilização empírica deve ser cautelosa (Stabler and Hamilton 1954; Herdt and Pasmans 2009; Amin et al. 2014). Para reduzir a carga microbiana devem ser considerados *flushs* oral e nasal com desinfetantes tópicos, como a clorehexidina 0,5% (Gómez et al. 2018).

7 Prevenção e monitorização

Geralmente, o tratamento medicamentoso de aves selvagens para prevenção da tricomoníase não é considerado uma opção viável. Swinnerton et al. (2005) realizaram a administração preventiva de nitroimidazóis na água de bebida numa população de pombas rosada (*Nesoenas mayeri*), onde registaram uma baixa eficácia no controlo da doença. Nem todas as aves receberam o tratamento completo, devido a variações no comparecimento às fontes de água e aceitabilidade do medicamento pelos animais, resultando em rápida reinfeção pós-tratamento.

Para além do referido, a administração de medicamentos em alimentadores ou fontes de água poderá ter efeitos colaterais negativos, tais como alterações nervosas em espécies não-alvo, reportadas em Anseriformes, cão e periquito-comum (Reece et al. 1985; Lancaster and Hooper 1991; Höfle et al. 2004).

Os focos das estratégias de gestão da doença devem ser a monitorização e a prevenção, e não a cura (Bunbury et al. 2007).

A alimentação de aves, um passatempo para o público, oferece novas oportunidades para a mistura de espécies e a sua concentração num determinado local, aumentando a probabilidade de transmissão de *T. gallinae*. Para reduzir a transmissão, os alimentadores e fontes de água devem ser evitados, principalmente durante períodos quentes e húmidos ou durante períodos de chuva e quando as aves estão a nidificar. Se a alimentação artificial não puder ser evitada, deve ser realizada a inspeção e mudança diária do alimento, de forma a garantir que o mesmo esteja seco e limpo, tal como deve ser realizada a sua dispersão em áreas alternativas em vez de em alimentadores fixos. Devem ser implementados protocolos de desinfeção dos locais de alimentação e de bebida (Cole 1999; Pearson 2001; Höfle et al.

2004; Swinnerton et al. 2005; Lawson, Cunningham, et al. 2011; Amin et al. 2014; McBurney et al. 2017).

Como *T. gallinae* requer um ambiente húmido para persistir, a secagem de edifícios e instalações habitacionais após lavagem e desinfeção poderá ajudar no controlo de infeção (Collántes-Fernández et al. 2018).

Quando ocorrem surtos de tricomoniase, as aves na área circundante, especialmente os Columbiformes, devem ser examinadas para possível determinação de linhagens virulentas de *T. gallinae* (Forrester and Foster 2008).

Parte III – Prevalência de protozoários do género *Trichomonas* em aves selvagens em centros de recuperação de Portugal

8 Descrição do estudo e objetivos

Como anteriormente referido a tricomoniase é um fator importante no declínio das populações de aves selvagens e pode ter implicações na conservação de espécies em risco, principalmente aquelas que enfrentam múltiplas ameaças. Para além disso, a bibliografia disponível sobre tricomoniase em aves selvagens em Portugal é escassa. Desta forma, o objetivo principal do estudo é avaliar a prevalência de protozoários do género *Trichomonas* em aves nos centros de recuperação de animais selvagens em Portugal, de modo a atualizar e enriquecer os conhecimentos sobre a doença a nível nacional, permitindo inferir sobre a condição epidemiológica atual.

A colheita de amostras não se restringiu apenas à duração do estágio curricular, iniciando-se a 5 de outubro de 2021 e terminando a 17 de julho de 2022. Como resultado, foi possível aumentar a diversidade e quantidade de amostras.

A seleção dos métodos laboratoriais a realizar estava dependente das condições e materiais em cada centro de recuperação. Assim, foi possível realizar o método direto e a coloração de Giemsa para deteção do parasita. O processamento e análise das amostras foram realizados nos centros de recuperação caracterizados no ponto 8.2.

8.1 Ordens de aves incluídas no estudo

As ordens de aves incluídas no estudo foram Accipitriformes, Apodiformes, Ciconiiformes, Columbiformes, Falconiformes, Gruiformes, Passeriformes, Pelecaniformes e Strigiformes, dependente dos ingressos de cada centro de recuperação.

está inserido na Reserva Natural das Lagoas de Santo André e da Sancha. Trata-se de um projeto da Quercus ANCN.

Em 2020 e 2021, registou o ingresso de 300 e 373 animais, respetivamente, em que a classe das Aves representou a maioria das entradas (91%). Em 2020, a causa de entrada mais frequente foi trauma de origem desconhecida (21%), seguida de intoxicação (17%) e queda de ninho (15,7%), enquanto em 2021 foi queda de ninho/órfão (26%), seguida de trauma de origem desconhecida (20%) e doença (14%). A taxa de recuperação total foi de 38% em 2020 e 42% em 2021.

8.2.2 Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens (CERAS)

O Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens (CERAS) localiza-se na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco (ESA-IPCB) e trata-se de um projeto do núcleo regional de Castelo Branco da Quercus ANCN.

Nos anos de 2020 e 2021, o Centro registou a entrada de 365 e 390 animais, respetivamente. A maioria dos animais ingressados foram aves, 86% e 85%, cuja causa de entrada mais frequente foi queda do ninho, 23% e 34%, respetivamente.

Neste período, a taxa de recuperação total foi de 33% em 2020 e 38% em 2021.

9 Materiais e métodos

9.1 Colheita e caracterização da amostra

Na recuperação de animais selvagens aquando da realização de procedimentos é importante reduzir o tempo de contacto com os animais. Tratam-se de espécies que não estão habituadas à presença do ser humano e a sua manipulação excessiva poderá despoletar níveis de *stress* que se tornam incompatíveis com a sua recuperação e devolução à natureza.

Desta forma, durante a manipulação da ave e colheita da amostra, a contenção deve ser executada de forma segura e o mais silenciosa possível. A técnica de contenção pode estar sujeita a variações consoante a espécie, mas, geralmente, envolve a utilização de toalhas a envolver o corpo e a cobrir a cabeça para redução dos estímulos visuais. O procedimento de colheita deve ser realizado de forma metódica, rápida e organizada, tendo o material preparado antes da manipulação do animal.

Os materiais utilizados para a colheita de amostras foram zaragatoas estéreis, soro fisiológico estéril, lâminas, lamelas, corante Giemsa e caneta de acetato para identificação das amostras e os mesmos foram cedidos pelo CRASSA, CERAS e ESA-IPCB.

À medida que as amostras eram colhidas no centro de recuperação, foram inquiridas e registadas informações relativas a cada ave, tais como área geográfica de resgate, ordem, espécie, idade, sexo, causa de entrada, sinais clínicos e lesões. Relativamente à amostra, foram registadas as informações relativas à época do ano, período de colheita da amostra, material biológico e local de colheita da amostra.

As aves foram organizadas pela área geográfica de resgate, a fim de se poderem estabelecer comparações entre as diferentes regiões de Portugal continental. Neste sentido, utilizou-se a Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS) nível II, estabelecida no Decreto-Lei nº 46/89, constituído por sete regiões: as Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira e, no continente, as regiões do Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo e Algarve.

Para além do referido, as aves em estudo foram agrupadas pela sua faixa etária em crias, juvenis, adultas ou indeterminadas, nos casos em que não era evidente no registo a idade das mesmas. A avaliação da idade efetuou-se empiricamente, analisando-se as características biométricas e plumagem de cada animal (Demongin et al. 2016; Svensson et al. 2022).

Para avaliação do possível efeito do sexo, os indivíduos foram agrupados em três categorias: fêmea, macho e indeterminado. A sexagem através de métodos moleculares não é realizada por rotina, desta forma, recorreu-se a avaliação de características morfológicas externas e/ou, em alguns casos, a necrópsia.

Relativamente à variável causa de entrada, recorreu-se a cinco categorias: traumática, queda de ninho/juvenil desorientado, intoxicação, debilidade e cativo ilegal. A primeira categoria inclui casos de colisão com infraestruturas, atropelamento, trauma de origem desconhecida, interação animal doméstico/selvagem, tiro e eletrocussão. Na categoria “queda de ninho/juvenil desorientado” inclui-se aves que caíram do ninho, que ficaram órfãs e juvenis desorientados. A terceira categoria abrange aves que ingressaram com sinais clínicos compatíveis com casos de intoxicação. A categoria “debilidade” inclui aves que ingressaram com baixa condição corporal, apatia e/ou dificuldade em permanecerem de pé, sem nenhuma outra causa aparente.

Procedeu-se à elaboração de uma lista de sinais clínicos compatíveis com tricomoníase de acordo com a revisão bibliográfica realizada, que integra emaciação, depressão/letargia, diarreia, anorexia, penas eriçadas, dispneia, relutância a voar, regurgitação e corrimentos nasais/oculares. Desta forma, infere-se sobre a presença ou ausência de sinais clínicos no indivíduo (Narcisi et al. 1991; Cole 1999; Forrester and Foster

2008; Dorrestein 2009; Anderson et al. 2010; Amin et al. 2014; Samour 2016; Martínez-Herrero et al. 2020).

Tabela 3 - Sinais compatíveis com tricomoníase de acordo com a revisão bibliográfica

Sinais clínicos compatíveis com tricomoníase
Emaciação
Depressão/Letargia
Diarreia
Anorexia
Penas eriçadas
Dispneia
Relutância a voar
Regurgitação
Corrimentos nasais/oculares

No que diz respeito à variável lesões macroscópicas, são consideradas duas categorias: presença de lesões macroscópicas ou ausência de lesões macroscópicas características de tricomoníase. As lesões consideradas para o estudo foram placas firmes, bem circunscritas, amareladas e caseosas (Stabler 1954; Forrester and Foster 2008; Gómez et al. 2018).

De referir que as lesões macroscópicas são o sinal clínico mais característico da doença, no entanto, para efeito de tratamento dos dados, estas foram separadas da variável sinais clínicos compatíveis com tricomoníase.

As amostras foram agrupadas em quatro categorias, tendo em conta a época do ano em que foram colhidas: primavera (20 de março a 20 de junho), verão (21 de junho a 22 de setembro), outono (23 de setembro a 20 de dezembro) e inverno (21 de dezembro a 20 de março) (Calendário - Portugal 2022).

O período de colheita da amostra foi realizado *ante-mortem* ou até 48h *post-mortem* (Erwin et al. 2000; Schulz et al. 2005; Díez Baños and Fernández 2018). Para a realização da colheita *ante-mortem*, foram escolhidos momentos em que a ave iria ser manipulada para outros procedimentos médico-veterinários, como por exemplo, no momento de entrada no centro de recuperação, durante a realização de exames físicos de reavaliação, aproveitando a manipulação para mudança de instalações, durante procedimentos de colheita de outras amostras para exames complementares de diagnóstico ou para outros estudos ou antes da eutanásia.

Quanto ao material biológico, foram colhidas amostras a partir de lesões e/ou muco das aves em estudo (BonDurant and Honigberg 1994; Cole 1999; Bunbury et al. 2005; Díez Baños and Fernández 2018).

O locais de colheita da amostra foram a cavidade orofaríngea, esófago proximal e/ou papo (BonDurant and Honigberg 1994; Cole 1999; Bunbury et al. 2005). A escolha do local estava dependente do caso em questão, animais mais débeis e mais stressados exigiam uma colheita rápida e pouco invasiva, e do período da colheita, *ante-mortem* e *post-mortem*.

Todas as aves em estudo foram submetidas a diagnóstico por método direto, independentemente de apresentarem sinais clínicos e/ou lesões característicos de tricomoníase. Contudo, devido à falta de disponibilidade, o método de coloração de Giemsa foi empregue apenas em algumas das amostras.

9.2 Metodologia laboratorial

O processamento e análise das amostras para pesquisa de parasitas do género *Trichomonas* foi realizado nos centros de recuperação envolvidos no estudo, através do método direto e coloração de Giemsa.

9.2.1 Método direto

As amostras para o método direto foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo (Samour and Naldo 2003; Hamad and Hassan 2017a; Gómez et al. 2018; Arfin et al. 2019):

1. Rodou-se, com alguma pressão, uma zaragatoa estéril humedecida em soro estéril na cavidade orofaríngea, esófago proximal e/ou papo.
2. Rodou-se a zaragatoa com a amostra numa lâmina de microscópio.
3. Cobriu-se a lâmina com uma lamela.
4. Examinou-se a lâmina com as objetivas 10x e 40x, para deteção dos movimentos de progressão do parasita.

A leitura e interpretação dos resultados efetuou-se imediatamente após a realização da preparação. A amostra foi considerada positiva caso se tenha detetado o microrganismo e negativa caso se tenha verificado a ausência do microrganismo.

9.2.2 Coloração de Giemsa

As amostras foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo (Borji et al. 2011; Amin et al. 2014; Khatoon et al. 2014; Hamad and Hassan 2017a; Fadhil and Ali 2019a):

1. Rodou-se, com alguma pressão, uma zaragatoa estéril humedecida em soro estéril na cavidade orofaríngea, esófago proximal e/ou papo.
2. Rodou-se a zaragatoa com a amostra numa lâmina de microscópio.

3. Deixou-se secar a lâmina à temperatura ambiente durante 15-20 min.
4. Cobriu-se a lâmina com metanol durante 5-10 min.
5. Deixou-se secar a lâmina à temperatura ambiente durante 15-20 min.
6. Cobriu-se a lâmina com a solução Giemsa durante 25-30 min.
7. Passou-se a lâmina por água corrente.
8. Deixou-se secar a lâmina à temperatura ambiente durante 15-20 min.
9. Examinou-se a lâmina com as objetivas 10x, 40x e 100x.

A leitura e interpretação dos resultados efetuou-se após coloração e secagem da preparação. A amostra foi considerada positiva caso se tenha verificado a presença do microrganismo e negativa caso se tenha verificado a sua ausência.

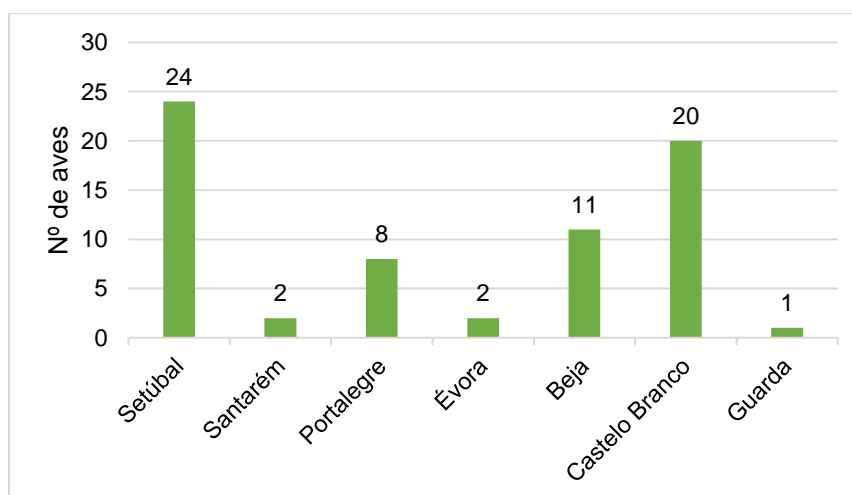
10 Resultados

10.1 Distribuição dos animais e das amostras colhidas

O número de amostras recolhidas esteve dependente dos ingressos registados em cada centro de recuperação. Desta forma, 51% (35/68) das amostras foram colhidas no CRASSA e as restantes 49% (33/68) foram colhidas no CERAS (Anexo 2).

As aves que ingressaram nos centros de recuperação do estudo foram resgatadas apenas em território continental com uma prevalência de 69% (47/68) no Alentejo, distritos de Setúbal, Santarém, Portalegre, Évora e Beja e 31% (21/68) no Centro, distritos de Castelo Branco e Guarda (Gráfico 3). Desta forma, conclui-se que a maioria foi encontrada na região Alentejo de Portugal.

Gráfico 3 - Distritos de resgate das aves envolvidas no estudo.



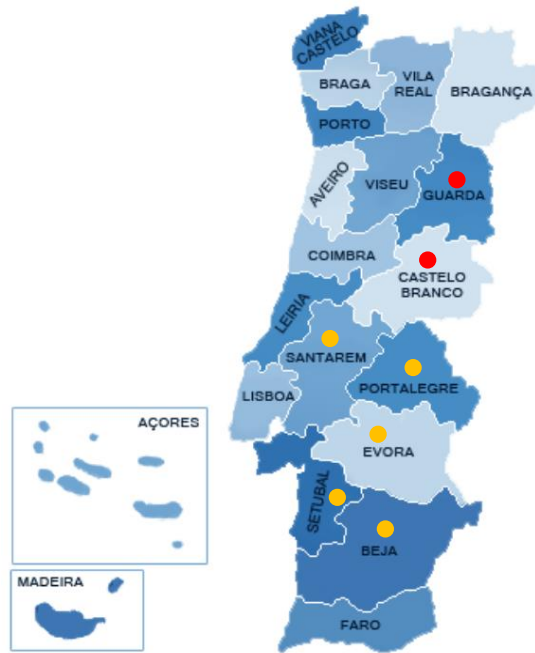
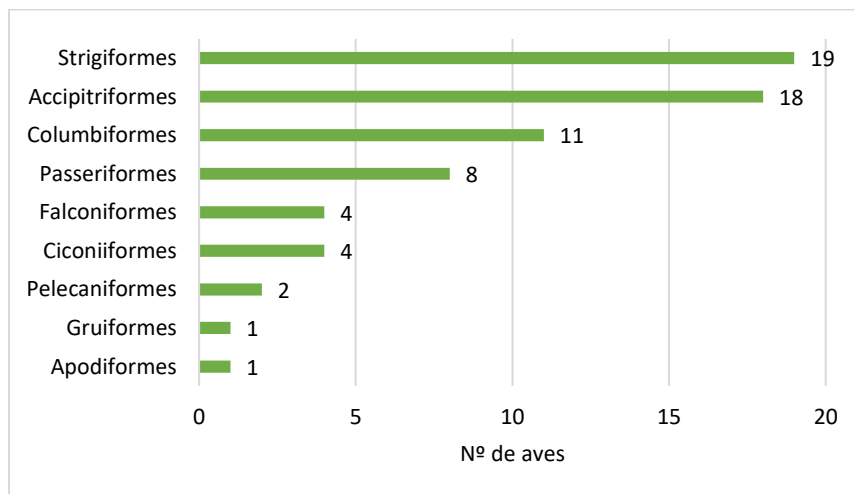


Figura 7 - Distritos de Portugal e Ilhas. Cor amarela correspondente à área geográfica do Alentejo e cor vermelha correspondente à área geográfica do Centro de onde foram resgatados os indivíduos em estudo. Adaptado de SEFSTAT – Portal de Estatística.

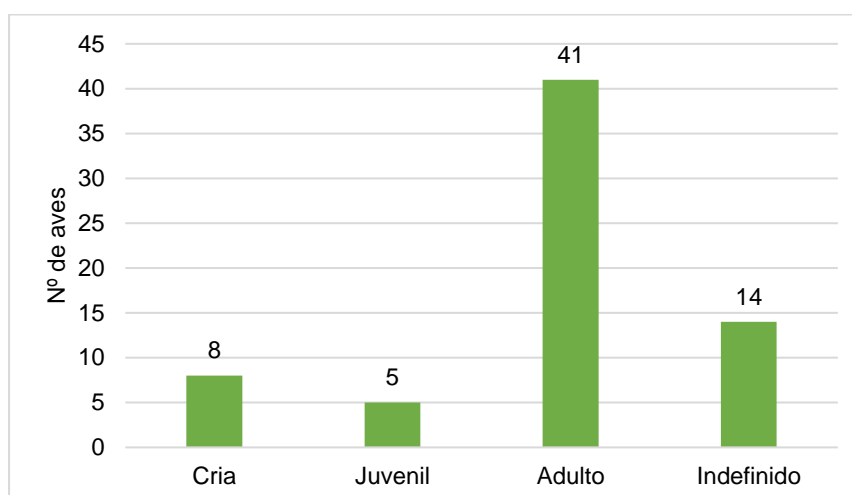
O estudo inclui 25 espécies de aves selvagens agrupadas em 9 ordens. As aves da ordem Strigiformes (28%) representam a maioria das aves analisadas, seguindo-se as ordens Accipitriformes (27%), Columbiformes (16%), Passeriformes (12%), Falconiformes (6%), Ciconiiformes (6%), Pelecaniformes (3%), Gruiformes (1%) e Apodiformes (1%) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Ordens das aves envolvidas no estudo.



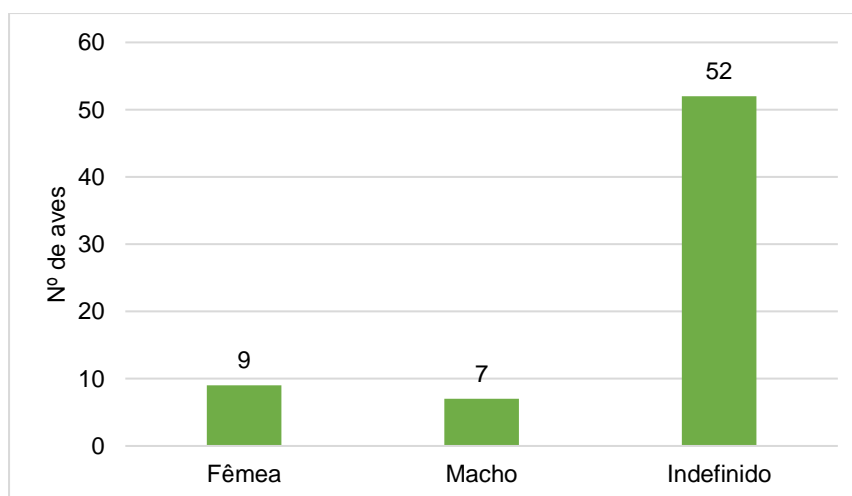
Em relação à idade, 12% (8/68) das aves eram crias, 7% (5/68) eram juvenis, 60% (41/68) eram adultas e em 21% (14/68) não foi possível determinar a idade (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Idades das aves envolvidas no estudo.



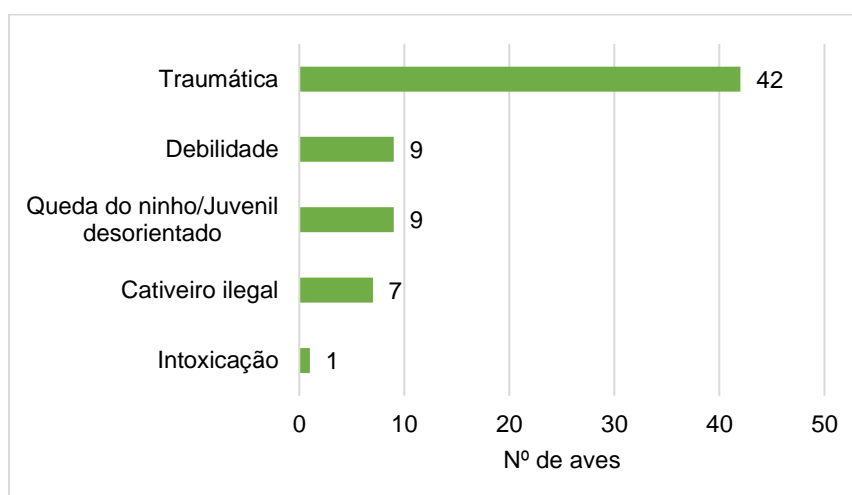
No que respeita à variável sexo, apenas em 23% das aves em estudo era conhecido o sexo, sendo que 13% (9/68) eram fêmeas e 10% (7/68) eram machos. Em 77% (52/68) não foi possível determinar o sexo por ausência de dimorfismo sexual em certas espécies (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Sexo das aves envolvidas no estudo.



Relativamente à causa de entrada, 62% (42/68) ingressaram por causas traumáticas, 13% (9/68) por debilidade, 13% (9/68) por queda do ninho/juvenil desorientado, 10% (7/68) por cativo ilegal e 2% (1/68) por intoxicação (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Causa de entrada das aves envolvidas no estudo.

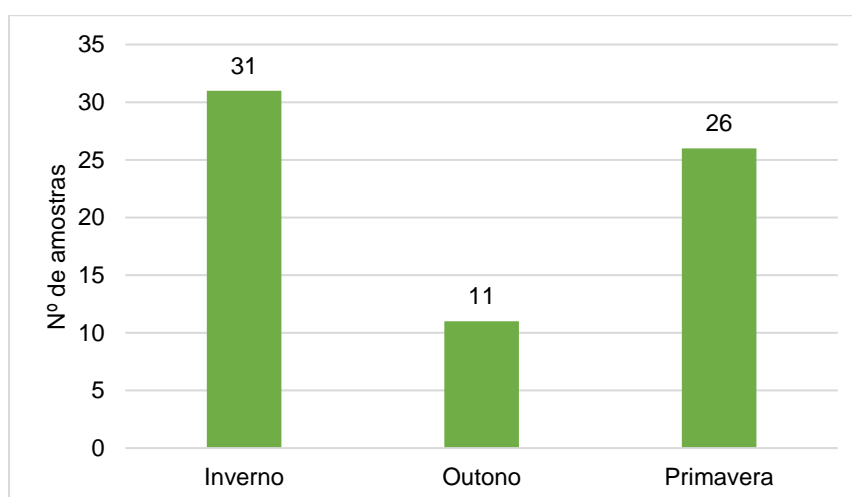


Das aves em estudo, 59% (40/68) apresentava pelo menos um dos sinais clínicos compatíveis com tricomoníase listados em 9.1, enquanto 41% (28/68) não apresentava sinais clínicos (Anexo 3).

A respeito das lesões macroscópicas, 9% (6/68) das aves apresentavam lesões características de tricomoníase e as restantes 91% (62/68) não apresentavam lesões (Anexo 4).

Das amostras em estudo, 46% (31/68) foram colhidas no inverno, 16% (11/68) no outono e 38% (26/68) na primavera (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Época do ano da colheita de amostras das aves envolvidas no estudo.

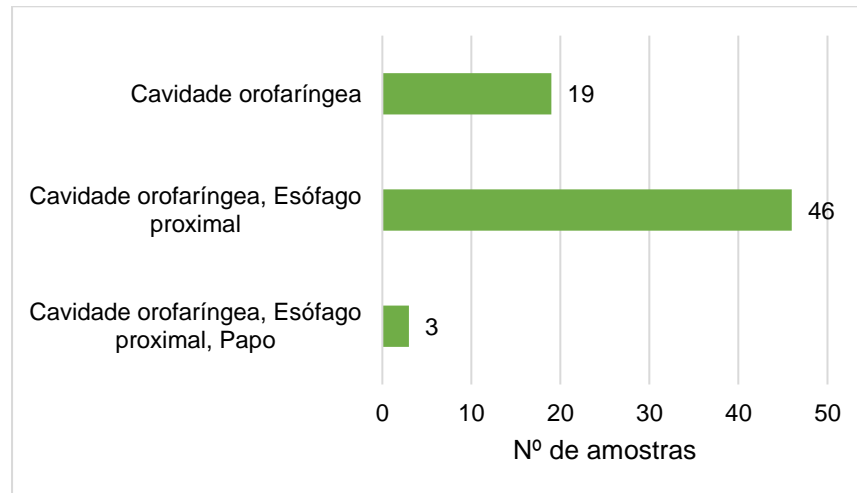


Em relação ao período de colheita da amostra, 81% (55/68) foram colhidas *ante-mortem* e 19% (13/68) foram colhidas *post-mortem* (Anexo 5).

Quanto ao material biológico, 93% (63/68) das amostras foram colhidas a partir de muco e 7% (5/68) foram colhidas a partir de lesões (Anexo 6).

No que se refere ao local de colheita da amostra, 28% (19/68) das amostras foram colhidas na cavidade orofaríngea, 68% (46/68) foram colhidas na cavidade orofaríngea e esófago proximal e 4% (3/68) foram colhidas na cavidade orofaríngea, esófago proximal e papo (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Local de colheita da amostra das aves envolvidas no estudo.



O método direto foi aplicado a todas as amostras (68/68), enquanto a coloração de Giemsa apenas foi aplicada a 22% das amostras (15/68).

10.2 Prevalência do género *Trichomonas*

Considerando o centro de recuperação onde foram recolhidas as amostras, no CRASSA nenhuma das amostras (0/35) foi positiva e no CERAS 12% (4/33) foram positivas.

Do total das 68 aves analisadas foi detetado o protozoário *Trichomonas* sp. em 4 animais, o que se traduz numa prevalência geral de 6% (4/68).

Na variável área geográfica de resgate a prevalência foi de 19% (4/21) no Centro e nula (0/47) no Alentejo. Dos animais positivos, 75% (3/4) dos indivíduos foram resgatados em área urbana (concelho de Castelo Branco) e 25% (1/4) resgatados em área rural (concelho de Idanha-a-Nova).

Na ordem Columbiformes verificou-se uma prevalência de 36% (4/11). Em nenhuma das restantes ordens estudadas se verificou a presença do parasita.

Das 25 espécies de aves incluídas no estudo, foi detetado o organismo *Trichomonas* sp. em uma espécie (4%), rola-turca (*Streptopelia decaocto*). Foram analisadas 11 rolas-turcas (*Streptopelia decaocto*), das quais quatro apresentavam o parasita (36%).

Relativamente à idade dos indivíduos, verificou-se uma prevalência de 10% (4/41) em adultos. Nas restantes faixas etárias não foi possível detetar o parasita.

Na variável sexo verificou-se uma prevalência nula (0/9) em fêmeas, 14% (1/7) em machos e 6% (3/52) em indefinidos.

Perante a associação das variáveis idade e ordem das aves incluídas no estudo, verificou-se uma prevalência de 40% (4/10) em Columbiformes adultos

Em relação aos sinais clínicos compatíveis com tricomoníase, 75% (3/4) dos indivíduos positivos apresentavam sinais clínicos.

Quanto às lesões macroscópicas características de tricomoníase, 75% (3/4) dos indivíduos positivos apresentavam lesões (Figuras 8 e 9).



Figura 8 – Placas firmes e amareladas com pequenas projeções centrais em forma de esporão na cavidade oral da rola-turca 4697/22 que ingressou no CERAS vista cranial. Original.



Figura 9 – Placas firmes e amareladas com pequenas projeções centrais em forma de esporão na cavidade oral da rola-turca 4759/22 que ingressou no CERAS vista lateral direita. Original.

Relativamente à causa de entrada, 50% (2/4) dos casos positivos ingressaram por causa traumática e os restantes 50% (2/4) por debilidade.

Mediante a época do ano de colheita das amostras, 75% (3/4) dos casos positivos foram colhidos na primavera e 25% (1/4) foram colhidos no Inverno.

Quanto ao meio de diagnóstico realizado, 100% (4/4) dos casos positivos foram identificados por método direto (Figura 10). No entanto, apenas 75% (3/4) dos casos positivos foram identificados por coloração (Figura 11).



Figura 10 - Trofozoítos de *Trichomonas* sp. (pontas de setas pretas) na preparação de método direto, a partir de esfregaço da cavidade orofaríngea e esôfago proximal da rola-turca 4598/22. Objetiva 40x. Barra de escala 250 µm. Original.

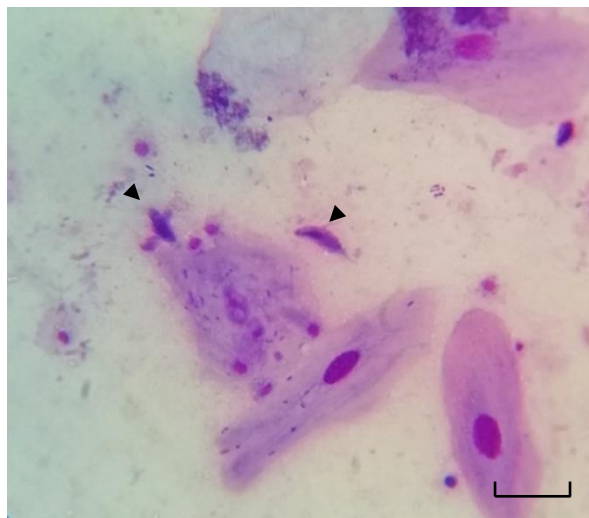


Figura 11 – Trofozoítos de *Trichomonas* sp. (pontas de setas pretas) na preparação de coloração, a partir de esfregaço da cavidade orofaríngea e esôfago proximal da rola-turca 4598/22. Objetiva 100x. Barra de escala 100 µm. Original.

Tabela 4 - Casos positivos para a detecção do protozoário do género *Trichomonas* em aves selvagens em centros de recuperação de Portugal.

Número de entrada	Espécie	Centro de recuperação	Sinais clínicos	Lesões macroscópicas	Método direto	Coloração de Giemsa
4574/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	CERAS	Presença	Ausência	Positivo	Positivo
4598/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	CERAS	Ausência	Presença	Positivo	Positivo
4697/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	CERAS	Presença	Presença	Positivo	Negativo
4759/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	CERAS	Presença	Presença	Positivo	Positivo

Relativamente aos casos positivos, a rola-turca 4574/22 CERAS, que apresentava sinais clínicos compatíveis com tricomoníase, emaciação, depressão/letargia e penas eriçadas, mas não apresentava quaisquer lesões macroscópicas, foi possível detetar *Trichomonas* sp. no método direto e na coloração de Giemsa.

A rola-turca 4598/22 CERAS, na qual foi possível identificar o parasita no método direto e na coloração de Giemsa e em que se identificaram lesões macroscópicas características de tricomoníase a nível do papo ventral durante a necrópsia, placa amarelada rugosa com cerca de 3 cm de diâmetro aderente às camadas do papo (Figura 13) e à pele (Figura 12), não apresentava outros sinais clínicos compatíveis com tricomoníase.



Figura 12 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase a nível do papo da rola-turca 4598/22 que ingressou no CERAS. Original.

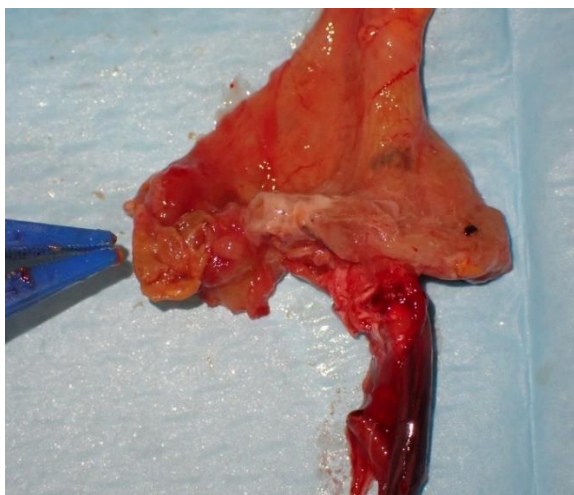


Figura 13 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase a nível do papo da rola-turca 4598/22 que ingressou no CERAS. Original.

A rola-turca 4697/22 CERAS apresentava emaciação e lesões macroscópicas compatíveis com tricomoníase, múltiplas placas firmes, amareladas e rugosas na cavidade oral (Figura 14) e esófago proximal (Figura 15). Após realização do método direto foi detetado o protozoário na preparação. Contudo, quando se realizou a coloração de Giemsa não foi possível detetar o organismo.



Figura 14 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase na cavidade oral da rola-turca 4697/22 que ingressou no CERAS. Original.



Figura 15 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase na cavidade oral e esófago proximal da rola-turca 4697/22 que ingressou no CERAS. Original.

A rola-turca 4759/22 CERAS apresentava emaciação, dispneia e lesões compatíveis com tricomoníase (Figura 16) e testou positivo nas técnicas método direto e coloração de Giemsa.



Figura 16 - Lesões macroscópicas características de tricomoníase na cavidade oral da rola-turca 4759/22 que ingressou no CERAS. Original.

Tabela 5 - Causa de entrada e resolução dos casos positivos ingressados no CERAS.

Número de entrada	Espécie	Sinais clínicos	Lesões macroscópicas	Causa de entrada	Resolução
4574/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Presença	Ausência	Traumática	Eutanásia
4598/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Ausência	Presença	Traumática	Eutanásia
4697/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Presença	Presença	Debilidade	Morte Natural
4759/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Presença	Presença	Debilidade	Morte natural

Os indivíduos positivos rola-turca 4574/22 CERAS e rola-turca 4598/22 CERAS apresentavam fraturas expostas antigas, sendo submetidos a eutanásia após realizado o exame de estado geral. O indivíduo positivo rola-turca 4697/22 CERAS morreu no dia do ingresso, sendo as amostras colhidas *post-mortem*. Em relação ao indivíduo positivo rola-

turca 4759/22 CERAS, foi iniciada a terapêutica contra tricomoníase com metronidazol, no entanto, este morreu dois dias após o ingresso (Tabela 5).

10.3 Achados Incidentais

Não foi detetado o protozoário *Trichomonas* sp. nos indivíduos coruja-do-mato 4570/22 CERAS e águia-d'asa-redonda 4583/22 CERAS, no entanto, após realização do esfregaço da cavidade oral, foi possível detetar a presença de *Capillaria* sp. (Figura 17; Figura 18), nematode que origina lesões parecidas a tricomoníase, sendo um dos diagnósticos diferenciais perante estes casos. Em nenhum dos indivíduos foram detetadas lesões características de tricomoníase.



Figura 17 – Ovo de *Capillaria* sp. na preparação de método direto, a partir de esfregaço da cavidade oral da coruja-do-mato 4570/22 CERAS. Objetiva 40x. Barra de escala 250 μ m. Original.



Figura 18 - Ovos de *Capillaria* sp. na preparação de método direto, a partir de esfregaço da cavidade oral da águia-d'asa-redonda 4583/22 CERAS. Objetiva 40x. Barra de escala 250 μ m. Original.

No indivíduo falcão peregrino 3885/21 CRASSA, também negativo para *Trichomonas* sp., foi possível detetar, através de esfregaço da cavidade oral, ovos de *Serratospiculum seurati* (Figura 19), parasita dos sacos aéreos das aves, e, posteriormente, na necrópsia foram encontradas as formas adultas do parasita referido (Figura 20). A identificação da espécie foi realizada no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV da

Universidade de Lisboa com recurso a lactofenol para a preparação microscópica (Anexos 7 e 8).



Figura 19 - Ovo de *Serratospiculum seurati* na preparação de método direto, a partir de esfregaço da cavidade oral do falcão peregrino 3885/21 CRASSA. Objetiva 40x. Barra de escala 250 μ m. Original.



Figura 20 – Formas adultas de *Serratospiculum seurati* no saco aéreo abdominal do falcão peregrino 3885/21. Original.

Por último, o bufo-real 4629/22 CERAS apresentava sinais clínicos e lesões característicos de tricomoniase, placas firmes, bem circunscritas, amareladas e caseosas, porém, obteve-se um resultado negativo no método direto e na coloração de Giemsa. Não foi possível detetar o agente responsável pelas lesões (Figura 22).



Figura 21 - Lesões características de tricomoníase na cavidade oral da bufo-real 4629/22 que ingressou no CERAS. Original.

11 Discussão

A caracterização genética do parasita fornece informações sobre a ecologia e epidemiologia da tricomoníase aviária e aperfeiçoa a compreensão das associações parasita-hospedeiro e virulência de diferentes linhagens (Sansano-Maestre et al. 2009; Rogers et al. 2016a; Merling de Chapa et al. 2021).

Como referido anteriormente, este estudo teve como principal objetivo avaliar a prevalência de protozoários do género *Trichomonas* em aves selvagens nos centros de recuperação de animais selvagens em Portugal. Foram analisadas 68 aves que deram entrada no CRASSA e no CERAS, sendo possível detetar o parasita em 4 indivíduos da região Centro, distrito de Castelo Branco, concelhos de Castelo Branco e Idanha-a-Nova.

Relativamente ao Sul e Norte de Portugal, respetivamente, Höfle (2001) e Santos (2019) reportaram uma prevalência de *Trichomonas* sp. de 50% e 6,3% em águia-perdigueira. Por outro lado, Silva (2017) reportou uma incidência de 13% de sintomatologia semelhante a tricomoníase em aves selvagens na região de Lisboa e Vale do Tejo, no entanto, não obteve casos positivos perante o método direto e meio de cultura Diamond. Do conhecimento da autora, não estão reportados casos positivos de tricomoníase em aves selvagens no Centro de Portugal. Assim, o estudo em questão permite uma abertura para o conhecimento científico da doença nesta área geográfica.

A maioria dos indivíduos positivos foi resgatada em área urbana (75%). Contrariamente ao registado neste estudo, Arfin et al. (2019) reportaram uma prevalência de 64% na ordem dos Columbiformes em área rural e uma prevalência de 57% em área urbana, o que significa que os indivíduos de áreas rurais são mais suscetíveis à infeção por *T. gallinae*.

Desta forma, não é possível avaliar e concluir sobre esta variável. Sugere-se um estudo com um maior número de amostras e um período de colheita mais alargado.

No presente estudo a ordem dos Columbiformes, apesar de representar apenas 16% da amostra, apresentou a totalidade dos casos positivos, o que vai ao encontro do mencionado na revisão bibliográfica. O protozoário *Trichomonas* sp. é frequentemente encontrado na cavidade oral de Columbiformes, os quais são considerados o principal reservatório do parasita (Stabler 1954; Forrester and Foster 2008; Amin et al. 2014; Gómez et al. 2018).

Em aves de rapina (Falconiformes, Accipitriformes, Strigiformes), a principal fonte de infecção é a ingestão de animais infetados, sobretudo Columbiformes (Pearson 2001; Purple and Gerhold 2015). Nestas a diversidade da dieta, os níveis menores de ingestão de água, as populações menos abundantes e com hábitos mais territoriais e menos gregários leva, potencialmente, à diminuição do risco de infecção, o que corrobora os resultados apresentados.

Relativamente a aves de rapina noturnas (Strigiformes), animais cuja caça é realizada maioritariamente ao anoitecer, altura em que os Columbiformes são menos avistados, será de esperar que a prevalência de infecção nesta ordem seja reduzida devido a menor exposição ao parasita (Redig et al. 1993; Pearson 2001; Niedringhaus et al. 2019), o que parece suportar os resultados obtidos e que está representado na Figura 22.

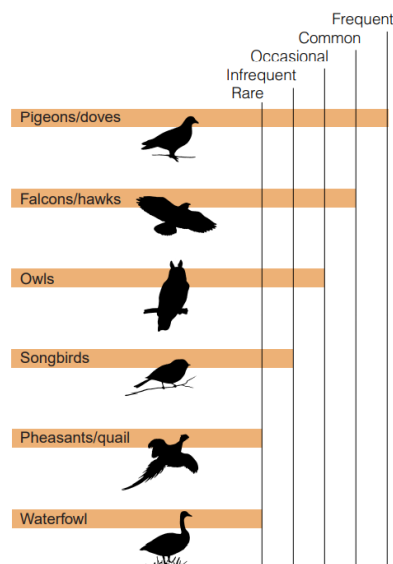


Figura 22 - Frequência relativa de tricomoníase em aves selvagens. Adaptado de Pearson (2001).

Todos os casos positivos foram registados em indivíduos adultos da ordem Columbiformes, estando em concordância com estudos anteriores. Jafar (2014) e Fadhil e Ali

(2019a) reportaram uma incidência superior em adultos comparativamente com crias/juvenis de Columbiformes. No entanto, no presente estudo apenas foi testada uma cria da ordem Columbiformes, pelo que não é possível avaliar e concluir sobre a incidência nas faixas etárias desta ordem.

A maioria das aves analisadas apresentava pelo menos um dos sinais clínicos listados em “9.1. Caracterização das amostras” e selecionados com base na atual literatura disponível (Anexo 1). Não obstante, não foi possível detetar o parasita em todas as amostras analisadas, nem através do método direto, nem através da coloração de Giemsa. Os sinais clínicos de tricomoníase são inespecíficos e ocorrem numa grande variedade de doenças, não sendo possível tirar conclusões sobre a infeção por *Trichomonas* sp. apenas com base nos mesmos (Pearson 2001; Gómez et al. 2018). Para além do referido, a sensibilidade dos meios de diagnóstico utilizados é baixa, principalmente quando o número de organismos no hospedeiro é reduzido (Bunbury et al. 2005; Amin et al. 2014).

De notar, que 50% dos casos positivos deram entrada por causa traumática enquanto a outra metade (50%), deu entrada por debilidade. Eventos de *stress*, como supramencionado, podem levar ao desenvolvimento da doença (Höfle et al. 2004; Villanúa et al. 2006; Robinson et al. 2010; Lawson, Cunningham, et al. 2011; Lennon et al. 2013; Stockdale et al. 2014; McBurney et al. 2017), o que poderá ser este o caso dos indivíduos que ingressaram por causa traumática. Por outro lado, os indivíduos podem ter desenvolvido a doença antes e estarem predispostos a eventos traumáticos. Os indivíduos que ingressaram por debilidade, poderá ser consequência da infeção por *Trichomonas* sp., parasita capaz de condicionar a capacidade de ingestão de alimentos e dificultar a respiração, tornando-os débeis.

A tricomoníase tende a ser mais prevalente durante a época de reprodução, período de temperatura mais elevada e de menor precipitação (Bunbury et al. 2007) e de *stress*, onde há um aumento do contacto ave-com-ave em locais de nidificação (Gerhold et al. 2008; Sansano-Maestre et al. 2009; Lawson et al. 2012; Amin et al. 2014; Collántes-Fernández et al. 2018; Fadhil and Ali 2019a). Este aspeto poderá explicar o facto de os primeiros casos terem aparecido em março, início da primavera e da época de reprodução. Contudo, é importante mencionar que a colheita de amostras não foi realizada ao longo de todo o ano, havendo épocas sazonais sem amostras, o que pode condicionar os resultados.

O meio de diagnóstico método direto foi empregue a todas as amostras, 68 amostras, independentemente de os animais apresentarem sinais clínicos e/ou lesões características de tricomoníase, sendo possível detetar o parasita em 4 das amostras. Por outro lado, devido à falta de disponibilidade, o meio de diagnóstico pela coloração de Giemsa foi empregue em

apenas 16 amostras, sendo que o parasita foi detetado em 3 das amostras. Ressalvar que a não detecção do parasita nos vários indivíduos não significa que o mesmo não estivesse presente. O número de organismos presentes no esfregaço pode ter sido inferior ao limite de detecção das técnicas de diagnóstico utilizadas, resultando em falsos negativos (Bunbury et al. 2005; Gómez et al. 2018). Para além disso, o método direto e a coloração de Giemsa são técnicas pouco sensíveis. Existem outras técnicas, anteriormente referidas, como o PCR, mais sensíveis (Bunbury et al. 2005), mas que, também, apresentam limitações, nomeadamente a escassez de espécies de *Trichomonas* com genoma total ou parcialmente sequenciado e disponível nas bases de dados genéticas. Outra das limitações é o preço desta reação e posterior sequenciação dos fragmentos sequenciados. Dado que o presente estudo foi realizado com recursos limitados não foi possível o acesso a esta técnica de diagnóstico.

A rola-turca 4574/22 CERAS apresentava sinais clínicos compatíveis com tricomoníase e testou positivo para *Trichomonas* sp. no método direto e coloração de Giemsa, no entanto não apresentava quaisquer lesões macroscópicas. Como referido anteriormente, numa população de columbídeos, frequentemente a maioria está infetada, contudo poucos ou nenhum indivíduo desenvolvem doença com manifestos sinais clínicos (Hegemann et al. 2007).

A rola-turca 4598/22 CERAS apresentava lesões macroscópicas características de tricomoníase e testou positivo para *Trichomonas* sp. no método direto e coloração de Giemsa, contudo não apresentava outros sinais clínicos compatíveis com tricomoníase. Os membros da ordem Columbiformes são considerados importantes reservatórios do protozoário (Stabler 1954; Sansano-Maestre et al. 2009; Stockdale et al. 2014; Alrefaei 2020), podendo ser portadores latentes assintomáticos durante anos e contribuir para a dispersão do parasita (Amin et al. 2011; Amin et al. 2014).

A rola-turca 4697/22 CERAS apresentava sinais clínicos e lesões macroscópicas compatíveis com tricomoníase. O protozoário foi detetado através do método direto, no entanto não foi detetado através da coloração de Giemsa. Tal pode ser explicado pelo período em que foi colhida a amostra. Esta foi colhida *post-mortem*, sendo que o método direto foi realizado até 48h após a morte, enquanto a coloração de Giemsa foi realizada 48h após a morte. Anteriormente referenciado, as carcaças podem permanecer infecciosas até 48h e as amostras para detecção de *Trichomonas* sp. devem ser colhidas até 48h após a morte (Erwin et al. 2000; Schulz et al. 2005), justificando o referido resultado negativo.

No que se refere aos sinais clínicos apresentados pelos casos positivos, 3 dos mesmos apresentavam baixa condição corporal. Santos (2019) reportou que pombos-das-rochas infetados com *Trichomonas* sp. apresentavam uma condição corporal mais baixa que o

normal para a espécie. A ativação do sistema imunitário para combate da infeção descompensa outras necessidades fisiológicas, como a reprodução, a alimentação e o crescimento (Van der Most et al. 2011; Demas et al. 2012), resultando na diminuição da condição corporal. Torna-se fundamental realizar a testagem de todos os Columbiformes que apresentem baixa condição corporal.

12 Conclusão e perspectivas futuras

A importância da análise da tricomoníase advém do facto da prevalência e da incidência desta doença estarem a aumentar entre aves selvagens. De acordo com a literatura atual e do conhecimento da autora, é considerada uma doença infecciosa emergente em vários países da Europa e América do Norte, afetando uma variedade de animais domésticos e de animais selvagens e demonstrando um amplo espectro de patogenicidade, desde assintomático a altamente virulento. Representa uma ameaça para a biodiversidade e para a viabilidade das populações selvagens como, por exemplo, da águia-perdigueira ou águia-de-Bonelli (*Aquila fasciata*) e do açor (*Accipiter gentilis*). Desta forma, torna-se imperioso a realização de mais estudos de forma a clarificar e aprofundar o conhecimento sobre a epidemiologia de *Trichomonas* spp. em aves selvagens, bem como dos fatores de risco associados.

Com este trabalho pretendeu-se detetar *Trichomonas* sp. e avaliar o seu impacto nas populações de aves selvagens que ingressam nos centros de recuperação de Portugal. A vigilância contínua da doença e o conhecimento e monitorização das populações em risco são essenciais para a determinação do impacto e prevenção e controlo desta doença infecciosa emergente nas populações de aves selvagens. Embora os resultados apresentados sejam preliminares, revestem-se de especial importância, uma vez que permitem uma atualização da epidemiologia da infeção por *Trichomonas* sp. em aves selvagens em Portugal.

Os resultados sugerem que a tricomoníase afeta as aves selvagens provenientes do centro de Portugal, sendo que foram detetados organismos *Trichomonas* sp. em rolas-turcas que ingressaram no centro de recuperação de Castelo Branco. Para além do referido, concluiu-se que a ordem Columbiformes é afetada pela doença e que, provavelmente e de acordo com a literatura existente, é o principal reservatório do parasita nesta zona do País. Os animais positivos apresentavam alguns dos sinais clínicos comumente associados à infeção, desde emaciação a dificuldade respiratória. Os Columbiformes infetados com *Trichomonas* sp. exibiam uma baixa condição corporal. Ademais, alguns casos positivos apresentavam lesões macroscópicas características de tricomoníase, placas firmes, bem circunscritas, amareladas e caseosas. De reforçar que os sinais clínicos são inespecíficos e as lesões macroscópicas

não são patognomónicas da doença, sendo necessário recorrer a técnicas laboratoriais para diagnóstico.

Os centros de recuperação têm um papel fulcral na vigilância e controlo sanitário de doenças infecciosas, sendo um dos principais contribuintes para o conceito de One Health que correlaciona a saúde humana, a saúde animal e a saúde dos ecossistemas. O presente estudo apresenta aplicações práticas para os centros de recuperação, os protocolos criados são de fácil aplicabilidade e economicamente viáveis. O CERAS ficou mais alerta para o problema e irá investir na doença criando medidas de prevenção, como a mudança diária do alimento de forma a garantir que o mesmo esteja seco e limpo e a desinfeção e secagem frequente das instalações e dos locais de alimentação e de bebida, e de monitorização, aplicando os protocolos realizados pela autora para deteção de animais positivos para a infeção de *Trichomonas* sp.

Os centros de recuperação devem ponderar a libertação de animais que sobrevivem à infeção por *Trichomonas* sp., na medida em que estes indivíduos podem atuar como portadores são assintomáticos durante anos, podendo contribuir para a dispersão do parasita. Contudo, são necessários mais estudos para extrair uma conclusão.

Futuramente e com o financiamento adequado, seria interessante aumentar o número de amostras, realizar a amostragem durante um ano de forma a perceber a variação ao longo das estações, incluir centros de recuperação da Península Ibérica num estudo de norte a sul, incluir todas as espécies de aves selvagens que ingressam num centro de recuperação e recorrer a meios de diagnóstico mais sensíveis, nomeadamente ao meio *InPouch*, para cultura e preservação da amostra até ao local de análise, e, posteriormente, ao PCR. A continuação do presente estudo poderá justificar o investimento na tricomoníase e, por consequência, aumentar a taxa de recuperação final dos centros de recuperação.

Bibliografia

Albeshr MF, Alrefaei AF. 2019. Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in Riyadh, Saudi Arabia. *avdi*. 64(2):130–134. doi:10.1637/0005-2086-64.2.130.

Alejandro Mateo S, Azami-Conesa I, Martín-Maldonado B, Pastor-Tiburón N, Martín-Hernández R, González-González F, Gómez-Muñoz MT. 2022. Adaptation of the classical end-point ITS-PCR for the diagnosis of avian trichomonosis to a real-time PCR reveals Bonelli's eagle as a new host for *Trichomonas gypaetini*. *Parasitol Res*. 121(12):3663–3670. doi:10.1007/s00436-022-07693-3.

Alrefaei AF. 2020. Molecular detection and genetic characterization of *Trichomonas gallinae* in falcons in Saudi Arabia. PLoS One. 15(10):e0241411. doi:10.1371/journal.pone.0241411.

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

Amin A, Liebhart D, Weissenböck H, Hess M. 2011. Experimental infection of turkeys and chickens with a clonal strain of *Tetratrichomonas gallinarum* induces a latent infection in the absence of clinical signs and lesions. J Comp Pathol. 144(1):55–62. doi:10.1016/j.jcpa.2010.06.002.

Anderson N, Johnson C, Fender S, Heckly S, Metzler M, Nave P, Yim J. 2010. Clinical Signs and Histopathologic Findings Associated with a Newly Recognized Protozoal Disease (*Trichomonas gallinae*) in Free-Ranging House Finches (*Carpodacus mexicanus*). Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians. 41:249–54. doi:10.1638/2009-0188R.1.

Anderson NL, Grahn RA, Van Hoosear K, BonDurant RH. 2009. Studies of trichomonad protozoa in free ranging songbirds: Prevalence of *Trichomonas gallinae* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and corvids and a novel trichomonad in mockingbirds (*Mimus polyglottos*). Veterinary Parasitology. 161(3–4):178–186. doi:10.1016/j.vetpar.2009.01.023.

Arfin S, Sayeed MdA, Sultana S, Dash AK, Hossen MdL. 2019. Prevalence of *Trichomonas gallinae* infection in Pigeon of Jessore District, Bangladesh. J Adv Vet Anim Res. 6(4):549–552. doi:10.5455/javar.2019.f381.

Baccega B, Alves MSD, Neves RN, Velho MC, Godoi SN de, Ourique AF, Villela MM, Vianna EES, Farias NA da R, Oliveira CB. 2019. Free essential oils and nanostructured on *Trichomonas gallinae* trophozoites. Disciplinarum Scientia | Naturais e Tecnológicas. 20(3):337–354.

Baccega B, Wahast Islabão Y, Brauner de Mello A, Obelar Martins F, Caetano dos Santos C, Ferreira Ourique A, da Silva Gündel S, Raquel Pegoraro de Macedo M, Elena Silveira Vianna É, Amélia da Rosa Farias N, et al. 2021. In vitro and in vivo activity of the essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae*. Avicenna J Phytomed. 11(1):32–34.

Bailey TA, Nicholls PK, Samour JH, Naldo J, Wernery U, Howlett JC. 1996. *Postmortem* Findings in Bustards in the United Arab Emirates. Avian Diseases. 40(2):296–305. doi:10.2307/1592224.

Bailey TC. 1997. An Assessment of the Prevalence of *Trichomonas* sp. In the Domestic Pigeon (*Columba livia*) Population, in the Emirates of Abu Dhabi and Dubai. Theses. https://scholarworks.uaeu.ac.ae/all_theses/545.

Beecham JJ, Kochert MN. 1975. Breeding biology of the golden eagle in southwestern Idaho. *Wilson Bulletin*. 87:506–513.

Bert E. 1619. An approved treatise of hawkes and hawking. [accessed 2022 Jun 2]. <https://quod.lib.umich.edu/e/eebo/A09393.0001.001?view=toc>.

Boal CW, Mannan RW, Hudelson KS. 1998. Trichomoniasis in Cooper's hawks from Arizona. *J Wildl Dis*. 34(3):590–593. doi:10.7589/0090-3558-34.3.590.

BonDurant RH, Honigberg BM. 1994. Trichomonads of Veterinary Importance. In: *Parasitic Protozoa*. Vol. 9. Academic Press. p. 217. https://books.google.pt/books?id=XErgBAAAQBAJ&pg=PA145&lpg=PA145&dq=parasitic+protozoa+bondurant&source=bl&ots=urFzNWGZot&sig=ACfU3U0qt28m0f1kP2LOtw3wVX_aBFu4Uw&hl=pt-PT&sa=X&ved=2ahUKEwiB4oKe-5D4AhXPm6QKHfCsBUUsQ6AF6BAgfEAM#v=onepage&q=parasitic%20protozoa%20bondurant&f=false.

Borji H, Razmi GH, Movassaghi AH, Moghaddas E, Azad M. 2011. Prevalence and pathological lesion of *Trichomonas gallinae* in pigeons of Iran. *J Parasit Dis*. 35(2):186–189. doi:10.1007/s12639-011-0047-2.

Brunthaler R, Teufelbauer N, Seaman B, Nedorost N, Bittermann K, Matt J, Weissenbacher-Lang C, Weissenböck H. 2022. Trichomonosis in Austrian Songbirds—Geographic Distribution, Pathological Lesions and Genetic Characterization over Nine Years. *Animals (Basel)*. 12(10):1306. doi:10.3390/ani12101306.

Bunbury N, Bell D, Jones C, Greenwood A, Hunter P. 2005. Comparison of the *InPouch* TF Culture System and Wet-Mount Microscopy for Diagnosis of *Trichomonas gallinae* Infections in the Pink Pigeon *Columba mayeri*. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(2):1005–1006. doi:10.1128/JCM.43.2.1005-1006.2005.

Bunbury N, Jones CG, Greenwood AG, Bell DJ. 2007. *Trichomonas gallinae* in Mauritian columbids: implications for an endangered endemic. *J Wildl Dis*. 43(3):399–407. doi:10.7589/0090-3558-43.3.399.

Calendário - Portugal. 2022. Calendarr. [accessed 2022 Dec 4]. <https://www.calendarr.com/portugal/>.

Cepicka I, Hampl V, Kulda J. 2010. Critical Taxonomic Revision of Parabasalids with Description of one New Genus and three New Species. *Protist*. 161(3):400–433. doi:10.1016/j.protis.2009.11.005.

Chavatte J-M, Giraud P, Esperet D, Place G, Cavalier F, Landau I. 2019a. An outbreak of trichomonosis in European greenfinches *Chloris chloris* and European goldfinches *Carduelis carduelis* wintering in Northern France. *Parasite*. 26. doi:10.1051/parasite/2019022.

Chavatte J-M, Giraud P, Esperet D, Place G, Cavalier F, Landau I. 2019b. An outbreak of trichomonosis in European greenfinches *Chloris chloris* and European goldfinches *Carduelis carduelis* wintering in Northern France. *Parasite*. 26. doi:10.1051/parasite/2019022.

Chi JF, Lawson B, Durrant C, Beckmann K, John S, Alrefaei AF, Kirkbride K, Bell DJ, Cunningham AA, Tyler KM. 2013. The finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae* is predominant in British non-passerines. *Parasitology*. 140(10):1234–1245. doi:10.1017/S0031182013000930.

Cole RA. 1999. Trichomoniasis. U.S. Geological Survey Report No.: 1999– 0001. [accessed 2022 Mar 24]. <https://pubs.er.usgs.gov/publication/2001004>.

Collántes-Fernández E, Fort MC, Ortega-Mora LM, Schares G. 2018. *Trichomonas*. In: Florin-Christensen M, Schnittger L, editors. *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Cham: Springer International Publishing. p. 313–388. [accessed 2022 Jun 2]. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_14.

Conti JA, Forrester DJ. 1981. Interrelationships of parasites of white-winged doves and mourning doves in Florida. *J Wildl Dis*. 17(4):529–536. doi:10.7589/0090-3558-17.4.529.

Conti JA, Frohlich RK, Forrester DJ. 1985. Experimental transfer of *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878) from white-winged doves to mourning doves. *J Wildl Dis*. 21(3):229–232. doi:10.7589/0090-3558-21.3.229.

Cooper JE, Greenwood AG. 1981. Recent advances in the study of raptor diseases. Keighley, West Yorkshire, Londres: Chiron Publications. p. 178. [accessed 2022 May 13]. https://search.library.ucdavis.edu/discovery/fulldisplay?vid=01UCD_INST:UCD&mode=advanced&tab=Everything&docid=alma990014967150403126&query=sub,exact,%20Coronavirus%20Infections%20--%20veterinary%20--%20Congresses,AND&context=L&lang=en.

Cooper JE, Petty SJ. 1988. Trichomoniasis in free-living goshawks (*Accipiter gentilis gentilis*) from Great Britain. *J Wildl Dis*. 24(1):80–87. doi:10.7589/0090-3558-24.1.80.

Crespo R, França MS, Fenton H, Shivaprasad HL. 2018. Chapter 31 - Galliformes and Columbiformes. In: Terio KA, McAloose D, Leger JSt, editors. *Pathology of Wildlife and Zoo*

Animals. Academic Press. p. 747–773. [accessed 2022 May 23].
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128053065000316>.

Davidson WR, Nettles VF, Couvillion CE, Howerth EW. 1985. Diseases diagnosed in wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) of the southeastern United States. *J Wildl Dis.* 21(4):386–390. doi:10.7589/0090-3558-21.4.386.

Delgado-Viscogliosi P, Viscogliosi E, Gerbod D, Kulda J, Sogin ML, Edgcomb VP. 2000. Molecular phylogeny of parabasalids based on small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Trichomonadinae subfamily. *J Eukaryot Microbiol.* 47(1):70–75. doi:10.1111/j.1550-7408.2000.tb00013.x.

Delogu M, De Marco MA, Guberti V, Govoni S. 1997. Epidemiologia della tricomoniasi in popolazioni di falconiformi, accipitriformi e strigiformi. *La Selezione Veterinaria.* 8/9:819–825.

Demas G, Greives T, Chester E, French S. 2012. The energetics of immunity: Mechanisms mediating trade-offs in ecoimmunology. *Ecoimmunology.*:259–296.

Demongin L, Lelièvre H, Candelin G. 2016. Identification Guide to Birds in the Hand.

Díez Baños P, Fernández P. 2018. Ciências da Saúde Enfermidades Parasitárias II unidade didáctica 2 Tricomonose bovina e aviar, Histomonose e Xiardiase.

Dirren S, Borel S, Wolfrum N, Korner-Nievergelt F. 2022. *Trichomonas gallinae* infections in the naïve host *Montifringilla nivalis subsp. nivalis*. *J Ornithol.* 163(1):333–337. doi:10.1007/s10336-021-01938-1.

Dorrestein GM. 2009. 8 - Passerines. In: Tully TN, Dorrestein GM, Jones AK, Cooper JE, editors. *Handbook of Avian Medicine (Second Edition)*. Edinburgh: W.B. Saunders. p. 169–208. [accessed 2022 May 30].
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702028748000080>.

Dudek BM, Kochert MN, Barnes JG, Bloom PH, Papp JM, Gerhold RW, Purple KE, Jacobson KV, Preston CR, Vennum CR, et al. 2018. Prevalence and risk factors of *Trichomonas gallinae* and Trichomonosis in Golden eagle (*Aquila chrysaetos*) nestlings in Western North America. *J Wildl Dis.* 54(4):755–764. doi:10.7589/2017-11-271.

Ecco R, Preis IS, Vilela DAR, Luppi MM, Malta MCC, Beckstead RB, Stimmelmayer R, Stimmelmayer R, Gerhold RW. 2012. Molecular confirmation of *Trichomonas gallinae* and other parabasalids from Brazil using the 5.8S and ITS-1 rRNA regions. *Vet Parasitol.* 190(1–2):36–42. doi:10.1016/j.vetpar.2012.05.029.

EI-Khatam AO, AbouLaila MR, Ibrahim M, AbdEl-Gaber MM. 2016. *Trichomonas gallinae*: Prevalence and molecular characterization from pigeons in Minoufiya governorate, Egypt. *Experimental Parasitology*. 170:161–167. doi:10.1016/j.exppara.2016.09.016.

Erwin KG, Kloss C, Lyles J, Felderhoff J, Fedynich AM, Henke SE, Roberson JA. 2000. Survival of *Trichomonas gallinae* in white-winged dove carcasses. *J Wildl Dis*. 36(3):551–554. doi:10.7589/0090-3558-36.3.551.

Fadhil L, Ali A. 2019a. Survey of *Trichomonas gallinae* isolates in pigeons by microscopy and PCR. 23:321–329.

Fadhil L, Ali A. 2019b. Survey of *Trichomonas gallinae* isolates in pigeons by microscopy and PCR. 23:321–329.

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

Foreyt B. 2001. *Veterinary parasitology: reference manual*. Ames, Iowa: Iowa State University Press.

Forrester DJ, Foster GW. 2008. Trichomonosis. In: *Parasitic Diseases of Wild Birds*. John Wiley & Sons, Ltd. p. 120–153. [accessed 2022 Feb 3]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780813804620.ch6>.

Forzán MJ, Vanderstichel R, Melekhovets YF, McBurney S. 2010. Trichomoniasis in finches from the Canadian Maritime provinces — An emerging disease. *Can Vet J*. 51(4):391–396.

Fouts AC, Kraus SJ. 1980. *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *J Infect Dis*. 141(2):137–143. doi:10.1093/infdis/141.2.137.

Franssen FF, Lumeij JT. 1992. *In vitro* nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *J Vet Pharmacol Ther*. 15(4):409–415. doi:10.1111/j.1365-2885.1992.tb01032.x.

Friedhoff KT, Kuhnigk C, Müller I. 1991. Experimental infections in chickens with *Chilomastix gallinarum*, *Tetratrichomonas gallinarum*, and *Tritrichomonas eberthi*. *Parasitol Res*. 77(4):329–334. doi:10.1007/BF00930910.

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

Garner M, Sturtevant FC. 1992. Trichomoniasis in a Blue-Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*).

Gaspar da Silva D, Barton E, Bunbury N, Lunness P, Bell DJ, Tyler KM. 2007. Molecular identity and heterogeneity of Trichomonad parasites in a closed avian population. *Infect Genet Evol*. 7(4):433–440. doi:10.1016/j.meegid.2007.01.002.

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

Giemsa Stain- Principle, Procedure, Results, Interpretation - Staining. 2021 Jul 2. *Microbe Notes*. [accessed 2021 Nov 9]. <https://microbenotes.com/giemsa-stain-principle-procedure-results-interpretation/>.

Girard YA, Rogers KH, Gerhold R, Land KM, Lenaghan SC, Woods LW, Haberkern N, Hopper M, Cann JD, Johnson CK. 2013. *Trichomonas stableri* n. sp., an agent of trichomonosis in Pacific Coast band-tailed pigeons (*Patagioenas fasciata monilis*). *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 3(1):32–40. doi:10.1016/j.ijppaw.2013.12.002.

Girard YA, Rogers KH, Woods LW, Chouicha N, Miller WA, Johnson CK. 2014. Dual-pathogen etiology of avian trichomonosis in a declining band-tailed pigeon population. *Infect Genet Evol*. 24:146–156. doi:10.1016/j.meegid.2014.03.002.

Gómez M, Martínez Herrero M del C, Sansano-Maestre J, Garijo Toledo M. 2018. Oropharyngeal trichomonads in wild birds. In: *Wild Birds: Behavior, Classification and Diseases*. p. 1–41.

Gómez-Muñoz MT. Oropharyngeal trichomonads in wild birds. :31.

Goudswaard J, van der Donk JA, van der Gaag I, Noordzij A. 1979. Peculiar IgA transfer in the pigeon from mother to squab. *Developmental & Comparative Immunology*. 3:307–319. doi:10.1016/S0145-305X(79)80027-0.

Gourlay P, Decors A, Jouet D, Treilles D, Lemberger K, Faure E, Moinet M, Chi J, Tyler K, Cunningham A, et al. 2011. Finch trichomonosis spreads to France. *Eur Sect Wildlife Dis Assoc Bull*. 2:9–10.

Grabensteiner E, Bilic I, Kolbe T, Hess M. 2010. Molecular analysis of clonal trichomonad isolates indicate the existence of heterogenic species present in different birds and within the same host. *Vet Parasitol.* 172(1–2):53–64. doi:10.1016/j.vetpar.2010.04.015.

Grabensteiner E, Hess M. 2006. PCR for the identification and differentiation of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis* spp. *Vet Parasitol.* 142(3–4):223–230. doi:10.1016/j.vetpar.2006.07.011.

Granger BL, Warwood SJ, Benchimol M, De Souza W. 2000. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res.* 86(9):699–709. doi:10.1007/pl00008555.

Grunenwald C, Sidor I, Mickley R, Dwyer C, Gerhold R. 2018. *Tetratrichomonas* and *Trichomonas* spp.-Associated Disease in Free-Ranging Common Eiders (*Somateria mollissima*) from Wellfleet Bay, MA and Description of ITS1 Region Genotypes. *Avian Dis.* 62(1):117–123. doi:10.1637/11742-080817-Reg.1.

Gweléssiany. 1929. Sur lénkystement chez le *Trichomonas* du rat. *Archives de zoologie expérimentale et générale.*(69):64–68.

Gyimesi ZS. 2015. Chapter 20 - Columbiformes. In: Miller RE, Fowler ME, editors. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine, Volume 8.* St. Louis: W.B. Saunders. p. 164–171. [accessed 2022 May 23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455773978000207>.

Hamad S, Hassan H. 2017a. Isolation, Diagnosis and Cultivation of *Trichomonas gallinae* from Domestic Pigeon in Kirkuk City, Iraq. *International Journal of Current Research and Academic Review.* 5:10–18. doi:10.20546/ijcrar.2017.502.002.

Hamad S, Hassan H. 2017b. Isolation, Diagnosis and Cultivation of *Trichomonas gallinae* from Domestic Pigeon in Kirkuk City, Iraq. *International Journal of Current Research and Academic Review.* 5:10–18. doi:10.20546/ijcrar.2017.502.002.

Harmon WM, Clark WA, Hawbecker AC, Stafford M. 1987. *Trichomonas gallinae* in columbiform birds from the Galapagos Islands. *J Wildl Dis.* 23(3):492–494. doi:10.7589/0090-3558-23.3.492.

Hawkins MG, Guzman DS-M, Beaufrère H, Lennox AM, Carpenter JW. 2018. Chapter 5 - Birds. In: Carpenter JW, Marion CJ, editors. *Exotic Animal Formulary (Fifth Edition).* W.B. Saunders. p. 167–375. [accessed 2022 Oct 11]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323444507000059>.

Hegemann A, Hegemann E, Krone O. 2007. Trichomonosis in a free-living Stock Dove (*Columba oenas*). European Journal of Wildlife Research. 53:235–237. doi:10.1007/s10344-007-0090-6.

Herdt PD, Pasmans F. 2009. 15 - Pigeons. In: Tully TN, Dorrestein GM, Jones AK, Cooper JE, editors. Handbook of Avian Medicine (Second Edition). Edinburgh: W.B. Saunders. p. 350–376. [accessed 2022 May 23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702028748000158>.

Hickey JJ, editor. 1969. Peregrine falcon populations: Their biology and decline. 1st edition. Madison: University of Wisconsin Press.

Höfle U, Gortázar C, Moya JA, Knispel B, Kaleta E. 2004. Outbreak of Trichomoniasis in a woodpigeon wintering roost. European Journal of Wildlife Research. 50:73–77. doi:10.1007/s10344-004-0043-2.

Höfle U, Melo P, JM B, Palma L. 2001. Trichomoniasis in Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) nestlings in South-West Portugal. Raptor biomedicine III Zoological Education Network; Lumeij TJ, Remple JD, Redig PT, Lierz M y Cooper JE (eds):14–18.

Holt JC, Purple KE, Gerhold R. 2015. Use of FTA technology for detection of *Trichomonas gallinae*. Vet Parasitol. 212(3–4):396–399. doi:10.1016/j.vetpar.2015.07.017.

Honigberg BM. 1978. Trichomonads of veterinary importance. Parasitic Protozoa (USA). [accessed 2022 May 23]. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Trichomonads+of+veterinary+importance&author=Honigberg%2C+B.M.&publication_year=1978.

Honigberg BM, Becker RDiM, Livingston MC, Mclure MT. 1964. The Behavior and Pathogenicity of Two Strains of *Trichomonas gallinae* in Cell Cultures*. The Journal of Protozoology. 11(4):447–465. doi:10.1111/j.1550-7408.1964.tb01779.x.

InPouch® TF-Bovine - Prepared Media Broth for Tritrichomonas foetus. [accessed 2021 Nov 9]. <https://biomeddiagnostics.com/prepared-culture-media/inpouch-tf-bovine>.

Jafar Nasser Sadaq, Kawan May Hameed, Jafar Eman Hussain. 2014. Some epidemiological study of *Trichomonas gallinae* in domestic pigeon in Baghdad province. The Iraqi Journal of Veterinary Medicine. 38(2). [accessed 2022 Dec 11]. <https://www.iasj.net/iasj/article/97490>.

Jaquette DS. 1950. Hepatic Trichomoniasis in Esophagotomized Pigeons. Poultry Science. 29(1):157–158. doi:10.3382/ps.0290157.

- Jessup DA. 1980. Trichomoniasis in great horned owls. *Mod Vet Pract.* 61(7):601–604.
- Kelly-Clark WK, McBurney S, Forzán MJ, Desmarchelier M, Greenwood SJ. 2013. Detection and characterization of a *Trichomonas* isolate from a rehabilitated bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *J Zoo Wildl Med.* 44(4):1123–1126. doi:10.1638/2013-0085R.1.
- Khatoon R, Jahan N, Khan HM, Rabbani T, Ahmad S. 2014. Evaluation of Different Staining Techniques in the Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection in Females of Reproductive Age Group. *J Clin Diagn Res.* 8(12):DC05–DC08. doi:10.7860/JCDR/2014/9765.5261.
- Kietzmann G. 1990. Transmission of *Trichomonas gallinae* to ring doves (*Streptopelia risoria*). *South Dakota Academy of Science.* 69:95–98.
- Kietzmann GE. 1993. Relationships of *Trichomonas gallinae* to the Palatal-Esophageal Junction of Ring Doves (*Streptopelia risoria*) as Revealed by Scanning Electron Microscopy. *The Journal of Parasitology.* 79(3):408–415. doi:10.2307/3283578.
- Kleina P, Bettim-Bandinelli J, Bonatto SL, Benchimol M, Bogo MR. 2004. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *Int J Parasitol.* 34(8):963–970. doi:10.1016/j.ijpara.2004.04.004.
- Kocan RM. 1969a. Various grains and liquid as potential vehicles of transmission for *Trichomonas gallinae*. *Wildl Dis.* 5(3):148–149. doi:10.7589/0090-3558-5.3.148.
- Kocan RM. 1969b. Different Organ Preferences by the Same Strain of *Trichomonas gallinae* in Different Host Species. *The Journal of Parasitology.* 55(5):1003–1003. doi:10.2307/3277166.
- Kocan RM, Amend SR. 1972. Immunologic status of Mourning Doves following an epizootic of Trichomoniasis. *jwidi.* 8(2):176–180. doi:10.7589/0090-3558-8.2.176.
- Kocan RM, Knisley JO. 1970. Challenge infection as a means of determining the rate of disease resistant *Trichomonas gallinae*-free birds in a population. *J Wildl Dis.* 6(1):13–15. doi:10.7589/0090-3558-6.1.13.
- Koyama T, Kumada M, Ochi R, Nakagawa S, Tashiro K. 1971. *Trichomonas gallinae* found in secretary birds (*Serpentarius secretarius*). *Japanase Journal of Parasitology.*:495–497.
- Krone O, Altenkamp R, Kenntner N. 2005. Prevalence of *Trichomonas gallinae* in northern goshawks from the Berlin area of northeastern Germany. *Journal of wildlife diseases.* 41:304–9. doi:10.7589/0090-3558-41.2.304.

Kulda J, Tachezy J, Cerkasovová A. 1993. *In vitro* induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. J Eukaryot Microbiol. 40(3):262–269. doi:10.1111/j.1550-7408.1993.tb04915.x.

Lancaster MJ, Hooper LN. 1991. Neuronal necrosis in budgerigars treated with dimetridazole. Australian Veterinary Journal. doi:10.1111/J.1751-0813.1991.TB03245.X. [accessed 2022 Jun 1]. <https://www.scinapse.io>.

Lawson B, Cunningham A, Chantrey J, Hughes L, Kirkwood J, Pennycott T, Simpson V. 2006. Epidemic finch mortality. Vet Rec. 159(11):367. doi:10.1136/vr.159.11.367-a.

Lawson B, Cunningham AA, Chantrey J, Hughes LA, John SK, Bunbury N, Bell DJ, Tyler KM. 2011. A clonal strain of *Trichomonas gallinae* is the aetiologic agent of an emerging avian epidemic disease. Infect Genet Evol. 11(7):1638–1645. doi:10.1016/j.meegid.2011.06.007.

Lawson B, Robinson RA, Colvile KM, Peck KM, Chantrey J, Pennycott TW, Simpson VR, Toms MP, Cunningham AA. 2012. The emergence and spread of finch trichomonosis in the British Isles. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 367(1604):2852–2863. doi:10.1098/rstb.2012.0130.

Lawson B, Robinson RA, Neimanis A, Handeland K, Isomursu M, Agren EO, Hamnes IS, Tyler KM, Chantrey J, Hughes LA, et al. 2011. Evidence of spread of the emerging infectious disease, finch trichomonosis, by migrating birds. Ecohealth. 8(2):143–153. doi:10.1007/s10393-011-0696-8.

Lennon RJ, Dunn JC, Stockdale JE, Goodman SJ, Morris AJ, Hamer KC. 2013. Trichomonad parasite infection in four species of Columbidae in the UK. Parasitology. 140(11):1368–1376. doi:10.1017/S0031182013000887.

Liebhart D, Weissenböck H, Hess M. 2006. In-situ hybridization for the detection and identification of *Histomonas meleagridis* in tissues. J Comp Pathol. 135(4):237–242. doi:10.1016/j.jcpa.2006.08.002.

Lumeij JT. 1994. Gastroenterology. In: Avian Medicine: Principles and Application. Vol. gastr. Wingers Publishing, Inc. p. 482–522.

Lumeij JT, Zwijnenberg RJ. 1990. Failure of nitro-imidazole drugs to control trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). Avian Pathol. 19(1):165–166. doi:10.1080/03079459008418665.

Malik S-B, Brochu CD, Bilic I, Yuan J, Hess M, Jr JML, Carlton JM. 2011. Phylogeny of Parasitic Parabasalia and Free-Living Relatives Inferred from Conventional Markers vs. Rpb1, a Single-Copy Gene. PLOS ONE. 6(6):e20774. doi:10.1371/journal.pone.0020774.

Martínez-Díaz R, Rodríguez I, Ponce-Gordo F, Martínez-Herrero, González, Molina-Lopez R, Gómez M. 2014. *Trichomonas gypaetini* n. sp., a new trichomonad from the upper gastrointestinal tract of scavenging birds of prey. Parasitology Research. 114. doi:10.1007/s00436-014-4165-5.

Martínez-Herrero MC, Sansano-Maestre J, Azami-Conesa I, González-González F, Suárez Regalado L, Garijo-Toledo MM, Gómez-Muñoz MT. 2021. Sequence subtyping of *Trichomonas gallinae* from Bonelli's eagle (*Aquila fasciata*) during four years (2014-2017) reveals that MLS type is associated with lesions. Avian Pathol. 50(4):339–349. doi:10.1080/03079457.2021.1940099.

Martínez-Herrero MC, Sansano-Maestre J, López Márquez I, Obón E, Ponce C, González J, Garijo-Toledo MM, Gómez-Muñoz MT. 2014. Genetic characterization of oropharyngeal trichomonad isolates from wild birds indicates that genotype is associated with host species, diet and presence of pathognomonic lesions. Avian Pathol. 43(6):535–546. doi:10.1080/03079457.2014.967660.

Martínez-Herrero MC, Sansano-Maestre J, Ortega J, González F, López-Márquez I, Gómez-Muñoz MT, Garijo-Toledo MM. 2020. Oral trichomonosis: Description and severity of lesions in birds in Spain. Veterinary Parasitology. 283:109196. doi:10.1016/j.vetpar.2020.109196.

Marx M, Reiner G, Willems H, Rocha G, Hillerich K, Masello JF, Mayr SL, Moussa S, Dunn JC, Thomas RC, et al. 2017. High prevalence of *Trichomonas gallinae* in wild columbids across western and southern Europe. Parasites & Vectors. 10(1):242. doi:10.1186/s13071-017-2170-0.

Mattern CF, Honigberg BM, Daniel WA. 1973. Fine-structural changes associated with pseudocyst formation in *Trichomitus batrachorum*. J Protozool. 20(2):222–229. doi:10.1111/j.1550-7408.1973.tb00869.x.

McBurney S, Kelly-Clark W, Forzan M, Vanderstichel R, Teather K, Greenwood SJ. 2017. Persistence of *Trichomonas gallinae* in Birdseed. Avian Diseases. 61:311–315. doi:10.1637/11545-113016-RegR1.

McBurney S, Kelly-Clark WK, Forzán MJ, Lawson B, Tyler KM, Greenwood SJ. 2015. Molecular characterization of *Trichomonas gallinae* isolates recovered from the Canadian

Maritime provinces' wild avifauna reveals the presence of the genotype responsible for the European finch trichomonosis epidemic and additional strains. *Parasitology*. 142(8):1053–1062. doi:10.1017/S0031182015000281.

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

Mehlhorn H, editor. 2008. *Encyclopedia of Parasitology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [accessed 2022 Jun 2]. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-48996-2>.

Mehlhorn H, Al-Quraishy S, Aziza A, Hess M. 2009. Fine structure of the bird parasites *Trichomonas gallinae* and *Tetratrichomonas gallinarum* from cultures. *Parasitol Res*. 105(3):751–756. doi:10.1007/s00436-009-1451-8.

Merling de Chapa M, Auls S, Kenntner N, Krone O. 2021. To get sick or not to get sick—*Trichomonas* infections in two Accipiter species from Germany. *Parasitol Res*. 120(10):3555–3567. doi:10.1007/s00436-021-07299-1.

Mesa CP, Stabler RM, Berthrong M. 1961. Histopathological Changes in the Domestic Pigeon Infected with *Trichomonas gallinae* (Jones' Barn Strain). *Avian Diseases*. 5(1):48–60. doi:10.2307/1587659.

Miller RE, Fowler ME. 2015. *Fowler's zoo and wild animal medicine*. Volume 8 [i.e. Eighth edition]. St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders.

Mirzaei M, Ghashghaei O, Khedri J. 2016. First report of an outbreak trichomoniasis in turkey in Sistan, Iran. *J Parasit Dis*. 40(1):61–64. doi:10.1007/s12639-014-0445-3.

Molina-López RA, Casal J, Darwich L. 2011. Causes of Morbidity in Wild Raptor Populations Admitted at a Wildlife Rehabilitation Centre in Spain from 1995-2007: A Long Term Retrospective Study. *PLOS ONE*. 6(9):e24603. doi:10.1371/journal.pone.0024603.

Morishita TY, Aye PP, Brooks DL. 1997. A Survey of Diseases of Raptorial Birds. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 11(2):77–92.

Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Dinhopl N, Kulda J, Liebhart D, Hess M, Weissenböck H. 2010. Design and validation of an oligonucleotide probe for detection of protozoa from the order Trichomonadida using chromogenic in situ hybridization. *Vet Parasitol*. 171(1–2):1–6. doi:10.1016/j.vetpar.2010.03.022.

Muñoz E. 1995. Estudio de la prevalencia y susceptibilidad a la infección por *T. gallinae* en aves domésticas y silvestres. Valoración de la sensibilidad del protozoo a diferentes derivados nitroimidazólicos [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universitat Autònoma de Barcelona. [accessed 2022 May 17]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=248050>.

Munoz E, Castella J, Gutierrez JF. 1998. *In vivo* and *in vitro* sensitivity of *Trichomonas gallinae* to some nitroimidazole drugs. *Vet Parasitol.* 78(4):239–246. doi:10.1016/s0304-4017(98)00164-2.

Murtaugh R, Jacobs R. 1984. Trichomoniasis of the crop of a cockatiel. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 185:441–2.

Nadler SA, Honigberg BM. 1988. Genetic Differentiation and Biochemical Polymorphism among *Trichomonads*. *The Journal of Parasitology.* 74(5):797–804. doi:10.2307/3282257.

Narcisi EM, Sevoian M, Honigberg BM. 1991. Pathologic Changes in Pigeons Infected with a Virulent *Trichomonas gallinae* Strain (Eiberg). *Avian Diseases.* 35(1):55–61. doi:10.2307/1591295.

Neimanis AS, Handeland K, Isomursu M, Agren E, Mattsson R, Hamnes IS, Bergsjø B, Hirvelä-Koski V. 2010. First report of epizootic trichomoniasis in wild finches (family Fringillidae) in southern Fennoscandia. *Avian Dis.* 54(1):136–141. doi:10.1637/8952-060509-Case.1.

Niedringhaus K, Burchfield H, Elsmo E, Cleveland C, Fenton H, Shock B, Muise C, Brown J, Munk B, Ellis A, et al. 2019. Trichomonosis due to *Trichomonas gallinae* infection in barn owls (*Tyto alba*) and barred owls (*Strix varia*) from the eastern United States. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports.* 16:100281. doi:10.1016/j.vprsr.2019.100281.

Nikpay A, Soltani M. 2018. *In vitro* anti-parasitic activities of *Pulicaria dysenterica* and *Lycopus europaeus* methanolic extracts against *Trichomonas gallinae*. *Journal of HerbMed Pharmacology.* 7:112–118. doi:10.15171/jhp.2018.19.

NWHC. 2002. Epizootic files. National Wildlife Health Center, Madison, Wisconsin: United States Geological Survey.

OIE-World Organisation for Animal Health. 2020. *Trichomonas* spp. in birds and reptiles (Infection with). OIE - World Organisation for Animal Health. [accessed 2022 May 27]. <https://www.oie.int/en/document/trichomonas-spp-in-birds-and-reptiles-infection-with-2/>.

Oyedapo AO, V.O.Makanju, C.O.Adewunmi, Iwalewa E, Adenowo T. 2004. Antitrichomonal activity of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones on *Trichomonas gallinae*. doi:10.4314/AJTCAM.V11I1.31095.

Park FJ. 2011. Avian trichomoniasis: a study of lesions and relative prevalence in a variety of captive and free-living bird species as seen in an Australian avian practice. Aust Vet J. 89(3):82–88. doi:10.1111/j.1751-0813.2010.00681.x.

Pearson GL. 2001. Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds. Journal of Wildlife Diseases. 37(1):208–211. doi:10.7589/0090-3558-37.1.208.

Pennycott T, Lawson B, Cunningham A, Simpson V, Chantrey J. 2005. Necrotic ingluvititis in wild finches. The Veterinary record. 157:360. doi:10.1136/vr.157.12.360.

Pepler D, Oettle EE. 1992. *Trichomonas gallinae* in wild raptors on the Cape Peninsula. South African Journal of Wildlife Research - 24-month delayed open access. 22(3):87–88. doi:10.10520/EJC116898.

Pereira-Neves A, Ribeiro KC, Benchimol M. 2003. Pseudocysts in trichomonads--new insights. Protist. 154(3–4):313–329. doi:10.1078/143446103322454095.

Peters M, Kilwinski J, Reckling D, Henning K. 2009. Epidemic mortality in greenfinches at feeder stations caused by *Trichomonas gallinae* - A recent problem in Northern Germany. Kleintierpraxis. 54:433–438.

Purple K, Gerhold R. 2015. Persistence of Two Isolates of *Trichomonas gallinae* in Simulated Bird Baths With and Without Organic Material. Avian diseases. 59:472–474. doi:10.1637/11089-041115-Reg.1.

Qamar Muhammad, Raza A, Qamar M. 2017a. Comparison of *inpouch* tf kits and diamond's medium for *Trichomonas gallinae* identification in domestic pigeons. Journal of Animal and Plant Sciences. 27:1051–1057.

Qamar Muhammad, Raza A, Qamar M. 2017b. Comparison of *inpouch* tf kits and diamond's medium for *Trichomonas gallinae* identification in domestic pigeons. Journal of Animal and Plant Sciences. 27:1051–1057.

Qiu S, Yan C, Zhou D, Hou J, Wang Q, Lin Y, Fu H, Zhang J, Weng Y, Song H, et al. 2012. High prevalence of *Trichomonas gallinae* in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in subtropical southern China. African journal of microbiology research. 6. doi:10.5897/AJMR12.001.

Quillfeldt P, Schumm YR, Marek C, Mader V, Fischer D, Marx M. 2018. Prevalence and genotyping of *Trichomonas* infections in wild birds in central Germany. PLOS ONE. 13(8):e0200798. doi:10.1371/journal.pone.0200798.

Real J, Mañosa S, Muñoz E. 2000. Trichomoniasis in a Bonelli's eagle population in Spain. J Wildl Dis. 36(1):64–70. doi:10.7589/0090-3558-36.1.64.

Redig PT, Cooper JE, Remple D. 1993. Raptor Biomedicine. Minneapolis: University of Minnesota Press. [accessed 2022 May 12]. <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=310250>.

Reece RL, Barr DA, Forsyth WM, Scott PC. 1985. Investigations of Toxicity Episodes Involving Chemotherapeutic Agents in Victorian Poultry and Pigeons. Avian Diseases. 29(4):1239–1251. doi:10.2307/1590479.

Robinson RA, Lawson B, Toms MP, Peck KM, Kirkwood JK, Chantrey J, Clatworthy IR, Evans AD, Hughes LA, Hutchinson OC, et al. 2010. Emerging Infectious Disease Leads to Rapid Population Declines of Common British Birds. PLoS One. 5(8):e12215. doi:10.1371/journal.pone.0012215.

Rogers K, Girard Y, Koenig W, Johnson C. 2016a. Ecologic drivers and population impacts of avian trichomonosis mortality events in band-tailed pigeons (*Patagioenas fasciata*), California, USA. Journal of Wildlife Diseases. 52. doi:10.7589/2015-02-029.

Rogers K, Girard Y, Woods L, Johnson C. 2016b. Avian trichomonosis in spotted owls (*Strix occidentalis*): Indication of opportunistic spillover from prey. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. 5. doi:10.1016/j.ijppaw.2016.10.002.

Rosenfield RN, Bielefeldt J, Rosenfield LJ, Taft SJ, Murphy RK, Stewart AC. 2002. Prevalence of *Trichomonas gallinae* in nestling cooper's hawks among three north american populations. wils1. 114(1):145–147. doi:10.1676/0043-5643(2002)114[0145:POTGIN]2.0.CO;2.

Rouffaer L, Claerebout E, Adriaensen C, De Boeck C, Martel A. 2014. Racing Pigeons: A Reservoir for Nitro-Imidazole-Resistant *Trichomonas gallinae*. The Journal of parasitology. 100. doi:10.1645/13-359.1.

Samour J. 2000. Supraorbital trichomoniasis infection in two saker falcons (*Falco cherrug*). The Veterinary record. 146:139–40. doi:10.1136/vr.146.5.139.

Samour J, editor. 2016. 14 - Infectious Diseases. In: Avian Medicine (Third Edition). Mosby. p. 434–521. [accessed 2021 Nov 22]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780723438328000146>.

Samour J, Bailey T, Cooper J. 1995. Trichomoniasis in birds of prey (Order Falconiformes) in Bahrain. *The Veterinary record*. 136:358–62. doi:10.1136/vr.136.14.358.

Samour JH, Naldo JL. 2003. Diagnosis and Therapeutic Management of Trichomoniasis in Falcons in Saudi Arabia. *avms*. 17(3):136–143. doi:10.1647/2001-047.

Sansano-Maestre J, Garijo Toledo M, Gómez M. 2009. Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey in eastern Spain. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 38:201–7. doi:10.1080/03079450902912135.

Santos N, Jambas J, Monteiro A, Amaral J, Martins N, Garcia J, Fernández AM, Tyler KM, Almeida T, Abrantes J, et al. 2019. Trichomonas Infection in a Community of Free-Ranging Domestic and Wild Columbiformes and Bonelli's Eagle (*Aquila fasciata*). *Frontiers in Veterinary Science*. 6:148. doi:10.3389/fvets.2019.00148.

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

Schulz TA. 1986. Conservation and rehabilitation of the common barn owl. *National Wildlife Rehabilitators Association*. 5:146–166.

Seddiek A, Khater H. 2014. The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. *Parasitology Research*. 113:1319–1329.

Silva T. 2017. Estudo da prevalência e do impacto da Tricomonose em aves silvestres. [Lisboa]: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias Faculdade de Medicina Veterinária. [accessed 2022 Feb 23]. <https://recil.ensinulusofona.pt/handle/10437/7863?mode=full>.

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

Stabler R, Kihara J. 1954. Infection and Death in the Pigeon Resulting from the Oral Implantation of Single Individuals of *Trichomonas gallinae*. doi:10.2307/3273726.

Stabler RM. 1938. *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878) the Correct Name for the Flagellate in the Mouth, Crop and Liver of the Pigeon. *The Journal of Parasitology*. 24(6):553–554. doi:10.2307/3272284.

Stabler RM. 1941. The morphology of *Trichomonas gallinae* (= columbae). Journal of Morphology. 69(3):501–515. doi:<https://doi.org/10.1002/jmor.1050690306>.

Stabler RM. 1947. *Trichomonas gallinae*, Pathogenic Trichomonad of Birds. The Journal of Parasitology. 33(3):207–213. doi:10.2307/3273551.

Stabler RM. 1948a. Variations in Virulence of Strains of *Trichomonas gallinae* in Pigeons. The Journal of Parasitology. 34(2):147–149. doi:10.2307/3273411.

Stabler RM. 1948b. Protection in Pigeons against Virulent *Trichomonas gallinae* Acquired by Infection with Milder Strains. The Journal of Parasitology. 34(2):150–153. doi:10.2307/3273412.

Stabler RM. 1951. Effect of *Trichomonas gallinae* from Diseased Mourning Doves on Clean Domestic Pigeons. The Journal of Parasitology. 37(5):473–478. doi:10.2307/3273255.

Stabler RM. 1953. Observations on the passage of virulent *Trichomonas gallinae* through 119 successive domestic pigeons. The Journal of Parasitology. 39(4):1–50.

Stabler RM. 1954. *Trichomonas gallinae*: A review. Experimental Parasitology. 3(4):368–402. doi:10.1016/0014-4894(54)90035-1.

Stabler RM. 1969. *Trichomonas gallinae* as a factor in the decline of the peregrine falcon. In: Peregrine Falcon Populations - Their biology and decline. Madison, Wisconsin: The university of Wisconsin Press. p. 435–437.

Stabler RM, Braun CE. 1975. Effect of virulent *Trichomonas gallinae* on the band-tailed pigeon. J Wildl Dis. 11(4):482–483. doi:10.7589/0090-3558-11.4.482.

Stabler RM, Engley FB. 1946. Studies on *Trichomonas gallinae* Infections in Pigeon Squabs. The Journal of Parasitology. 32(3):225–232. doi:10.2307/3272673.

Stabler RM, Hamilton MA. 1954. Aspergillosis, Trichomoniasis, and Drug Therapy in a Gyrfalcon. The Auk. 71(2):205–208. doi:10.2307/4081584.

Stabler RM, Mellentin RW. 1953. Effect of 2-amino-5-nitrothiazole (Enheptin) and Other Drugs on *Trichomonas gallinae* Infection in the Domestic Pigeon. The Journal of Parasitology. 39(6):637–642. doi:10.2307/3274084.

Stensrude C. 1965. Observations on a Pair of Gray Hawks in Southern Arizona. The Condor. 67(4):319–321. doi:10.2307/1365579.

Stepkowski S, Honigberg BM. 1972. Antigenic Analysis of Virulent and Avirulent Strains of *Trichomonas gallinae* by Gel Diffusion Methods*. The Journal of Protozoology. 19(2):306–315. doi:10.1111/j.1550-7408.1972.tb03465.x.

Stockdale J, Dunn J, Goodman S, Morris A, Sheehan D, Grice P, Hamer K. 2014. The protozoan parasite *Trichomonas gallinae* causes adult and nestling mortality in a declining population of European Turtle Doves, *Streptopelia turtur*. Parasitology. 142:1–9. doi:10.1017/S0031182014001474.

Stone WB, Janes DE. 1969. Trichomoniasis in captive sparrow hawks. Wildl Dis. 5(3):147. doi:10.7589/0090-3558-5.3.147.

Stone WB, Nye PE. 1981. Trichomoniasis in Bald Eagles. Wilson Bulletin. 93(1):109.

Straus MA. 1966. Incidence of *Trichomonas gallinae* in mourning dove, *Zenaidura macroura*, populations of Arizona. Faculty of the Wildlife Management. [accessed 2022 May 16].

https://repository.arizona.edu/bitstream/handle/10150/566277/AZU_TD_BOX259_E9791_1966_205.pdf;jsessionid=9330D417816254B3AB14247E3CA6C9A5?sequence=1.

Svensson L, Mullarney K, Zetterström D. 2022. Guia de aves: guia de campo das aves de Portugal e da Europa. 4ª. Assírio & Alvim. <http://id.bnportugal.gov.pt/bib/bibnacional/2100988>.

Swinnerton K, Greenwood A, CHAPMAN R, Jones C. 2005. The incidence of the parasitic disease Trichomoniasis and its treatment in reintroduced and wild Pink Pigeons *Columba mayeri*. Ibis. 147:772–782. doi:10.1111/j.1474-919X.2005.00466.x.

Tabari MA, Youssefi MR, Moghadamnia AA. 2017. Antitrichomonal activity of *Peganum harmala* alkaloid extract against trichomoniasis in pigeon (*Columba livia domestica*). British Poultry Science. 58(3):236–241. doi:10.1080/00071668.2017.1280725.

Tasca T, De Carli GA. 2003. Scanning electron microscopy study of *Trichomonas gallinae*. Vet Parasitol. 118(1–2):37–42. doi:10.1016/j.vetpar.2003.09.009.

Tomikawa S, Nakagun S, Watanabe Y, Saito K, Kobayashi Y. 2021. Molecular characterization of *Trichomonas gypaetini* isolated from the upper alimentary tract of Steller's sea eagles (*Haliaeetus pelagicus*) and white-tailed sea eagles (*Haliaeetus albicilla*) in Hokkaido, Japan. Parasitology Research. 120:1–10. doi:10.1007/s00436-021-07160-5.

Toyne EP. 1998. Breeding season diet of the Goshawk *Accipiter gentilis* in Wales. Ibis. 140(4):569–579. doi:10.1111/j.1474-919X.1998.tb04701.x.

Trichomonas gallinae - Alchetron, The Free Social Encyclopedia. 2017 Aug 18. Alchetron.com. [accessed 2021 Nov 9]. <https://alchetron.com/Trichomonas-gallinae>.

Tsai SS, Chang TC, Kuo M, Itakura C. 1997. Respiratory and intestinal trichomoniasis in mule ducks. *Avian Pathol.* 26(3):651–656. doi:10.1080/03079459708419241.

Turberville G. 1575. The booke of faulconrie or hauking. [accessed 2022 Jun 2]. <https://quod.lib.umich.edu/e/eebo/A14016.0001.001?view=toc>.

Van der Most PJ, de Jong B, Parmentier HK, Verhulst S. 2011. Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments. *Functional Ecology.* 25(1):74–80.

Villanúa D, Höfle U, Pérez-Rodríguez L, Gortázar C. 2006. *Trichomonas gallinae* in wintering Common Wood Pigeons *Columba palumbus* in Spain. *Ibis.* 148(4):641–648. doi:10.1111/j.1474-919X.2006.00561.x.

Vogel K, Luthgen W, Muller H. 1983. Die Taube, Taubenkrankheiten.

Warren LG, Kitzman WB, Hake E. 1961. Induced Resistance of Mice to Subcutaneous Infection with *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878). *The Journal of Parasitology.* 47(4):533–537. doi:10.2307/3275050.

Wendell MD, Sleeman JM, Kratz G. 2002. Retrospective study of morbidity and mortality of raptors admitted to Colorado State University Veterinary Teaching Hospital during 1995 to 1998. *J Wildl Dis.* 38(1):101–106. doi:10.7589/0090-3558-38.1.101.

Whatman. 2022. Cartões FTA®, Whatman™. VWR. [accessed 2022 May 31]. <https://pt.vwr.com/store/product/565085/cartoes-fta-whatmantm>.

Wieliczko A, Piasecki T, Dorrestein GM, Adamski A, Mazurkiewicz M. 2003. Evaluation of the health status of goshawk chicks (*Accipiter gentilis*) nesting in Wroclaw vicinity. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.* 47.

Willoughby DH, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL. 1995. Esophageal Trichomoniasis in Chickens. *Avian Diseases.* 39(4):919–924. doi:10.2307/1592434.

Work TM, Hale J. 1996. Causes of owl mortality in Hawaii, 1992 to 1994. *J Wildl Dis.* 32(2):266–273. doi:10.7589/0090-3558-32.2.266.

Youssefi MR, Abouhosseini Tabari M, Moghadamnia AA. 2017. *In vitro* and *in vivo* activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. *Iran J Vet Res.* 18(1):25–29.

Zadravec M, Marhold C, Slavec B, Rojs OZ, Ráčnik J. 2012. Trichomonosis in finches in Slovenia. *Veterinary Record*. doi:10.1136/vr.e5973.

Zimre-Grabensteiner E, Arshad N, Amin A, Hess M. 2011. Genetically different clonal isolates of *Trichomonas gallinae*, obtained from the same bird, can vary in their drug susceptibility, an *in vitro* evidence. *Parasitol Int.* 60(2):213–215. doi:10.1016/j.parint.2011.02.003.

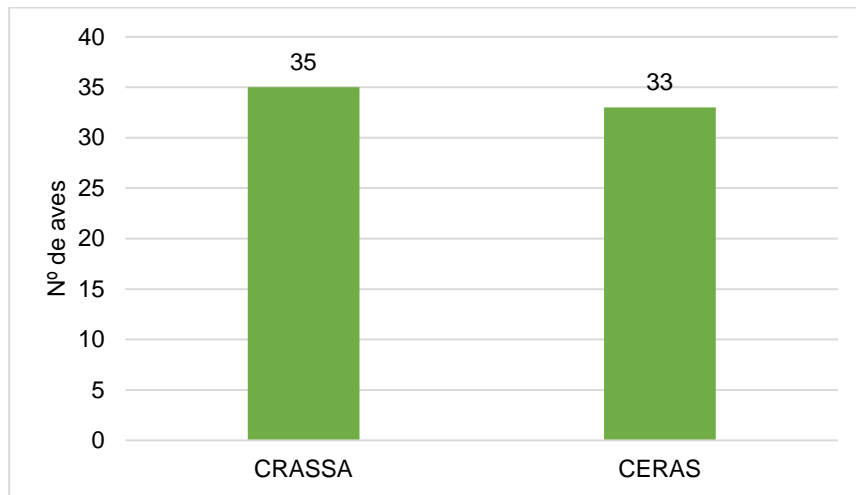
Zu Ermgassen EKJ, Durrant C, John S, Gardiner R, Alrefaei AF, Cunningham AA, Lawson B. 2016. Detection of the European epidemic strain of *Trichomonas gallinae* in finches, but not other non-columbiformes, in the absence of macroscopic disease. *Parasitology*. 143(10):1294–1300. doi:10.1017/S0031182016000780.

Anexos

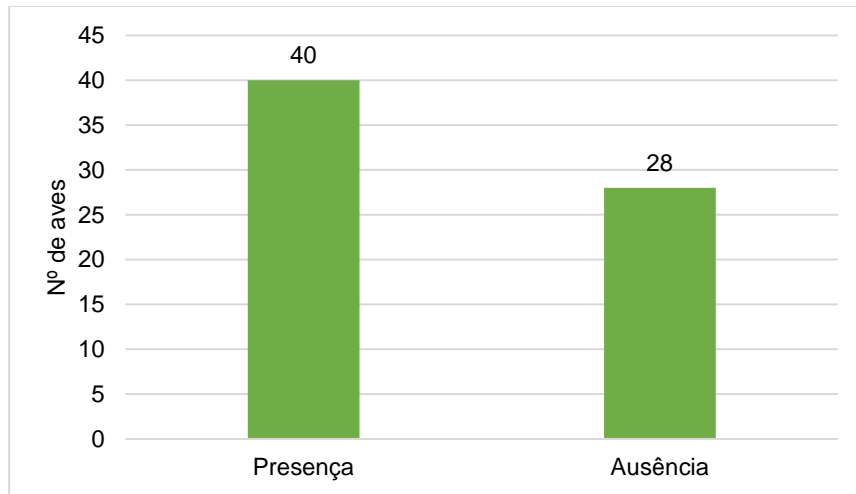
Anexo 1 - Indivíduos em estudo com pelo menos um dos sinais clínicos compatíveis com tricomoníase

Número de entrada	Espécie	Sinais clínicos compatíveis com tricomoníase
4562/22	<i>Pica pica</i>	Diarreia
4556/22	<i>Milvus milvus</i>	Emaciação, Depressão/Letargia, Penas eriçadas
4561/22	<i>Bubo bubo</i>	Depressão/Letargia, Dispneia, Corrimentos nasais/oculares
4568/22	<i>Buteo buteo</i>	Depressão/Letargia
4574/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Emaciação, Depressão/Letargia, Penas eriçadas
4583/22	<i>Buteo buteo</i>	Emaciação, Penas eriçadas
4586/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Emaciação
4587/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Emaciação
4588/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Emaciação
4589/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Emaciação
4596/22	<i>Apus apus</i>	Emaciação, Depressão/Letargia, Penas eriçadas
4619/22	<i>Buteo buteo</i>	Emaciação, Depressão/Letargia
4602/22	<i>Aquila pennata</i>	Emaciação
4603/22	<i>Strix aluco</i>	Emaciação, Depressão/Letargia
4629/22	<i>Bubo bubo</i>	Emaciação
4697/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Emaciação
4759/22	<i>Streptopelia decaocto</i>	Emaciação, Dispneia
3842/21	<i>Falco tinnunculus</i>	Relutância a voar, Depressão/Letargia
3863/21	<i>Streptopelia decaocto</i>	Penas eriçadas, Relutância a voar, Depressão/Letargia
3869/21	<i>Asio otus</i>	Anorexia, Depressão/Letargia
3877/21	<i>Milvus milvus</i>	Emaciação, Anorexia, Relutância a voar, Depressão/Letargia
3878/21	<i>Accipiter nisus</i>	Emaciação, Depressão/Letargia, Regurgitação
3881/21	<i>Falco peregrinus</i>	Emaciação, Relutância a voar, Depressão/Letargia, Regurgitação
3885/21	<i>Falco peregrinus</i>	Emaciação, Relutância a voar, Depressão/Letargia, Penas eriçadas
3891/21	<i>Elanus caeruleus</i>	Emaciação, Depressão/Letargia, Dispneia
3892/21	<i>Buteo buteo</i>	Emaciação, Depressão/Letargia, Anorexia, Diarreia
3898/21	<i>Athene noctua</i>	Emaciação, Penas eriçadas, Diarreia
3899/21	<i>Buteo buteo</i>	Emaciação, Depressão/Letargia, Dificuldade respiratória
3902/21	<i>Bubulcus ibis</i>	Emaciação, Diarreia
3903/21	<i>Strix aluco</i>	Relutância a voar, Regurgitação, Diarreia
3901/21	<i>Sturnus unicolor</i>	Relutância a voar, Depressão/Letargia
3910/22	<i>Plegadis falcinellus</i>	Emaciação
3913/22	<i>Cyanopica cyanus</i>	Relutância a voar, Diarreia
3928/22	<i>Strix aluco</i>	Depressão/Letargia
3923/22	<i>Milvus milvus</i>	Emaciação, Dispneia
3930/22	<i>Buteo buteo</i>	Emaciação
3923/22	<i>Milvus milvus</i>	Emaciação, Dispneia
3929/22	<i>Tyto alba</i>	Emaciação
3966/22	<i>Buteo buteo</i>	Emaciação, Relutância a voar
3989/22	<i>Buteo buteo</i>	Emaciação

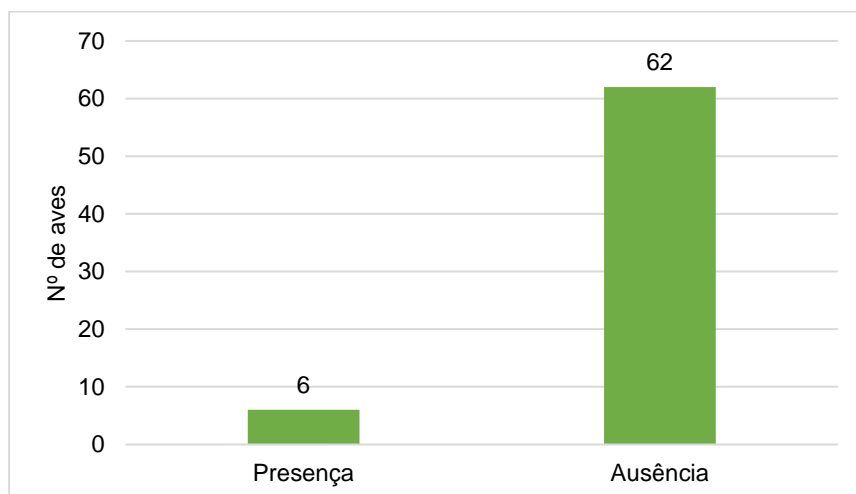
Anexo 2 - Amostras recolhidas nos centros de recuperação envolvidos no estudo.



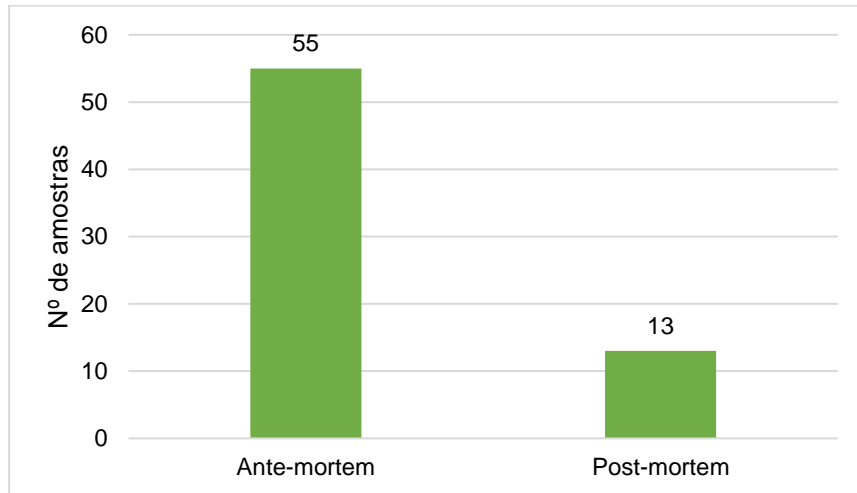
Anexo 3 - Presença ou ausência de sinais clínicos compatíveis com tricomoníase listados em 9.1 nas aves envolvidas no estudo.



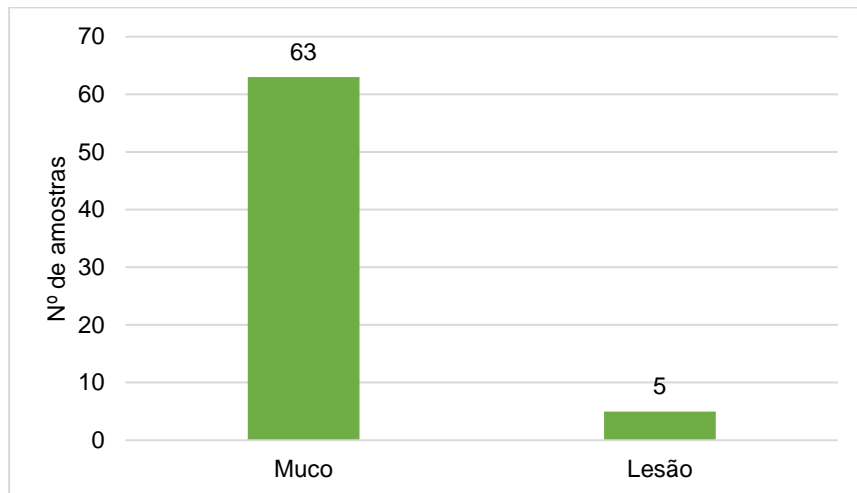
Anexo 4 - Presença ou ausência de lesões características de tricomoníase nas aves envolvidas no estudo.



Anexo 5 - Período de colheita das amostras das aves envolvidas no estudo.



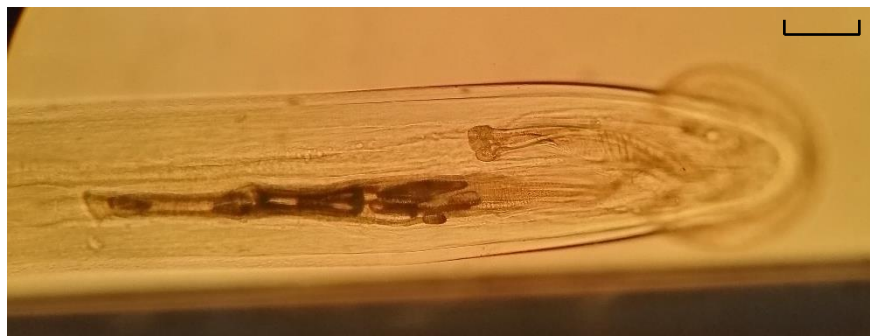
Anexo 6 - Material biológico das amostras das aves envolvidas no estudo.



Anexo 7 - Forma adulta de *Serratospiculum seurati* do falcão peregrino 3885/21 numa preparação microscópica com Lactofenol. Ext. posterior de um macho. Objetiva 40x. Barra de escala 25 µm. Original.



Anexo 8 - Forma adulta de *Serratospiculum seurati* do falcão peregrino 3885/21 numa preparação microscópica com Lactofenol. Ext. posterior de um macho. Objetiva 40x. Barra de escala 250 µm. Original.



Anexo 9 – Inquérito “Prevalência de protozoários do género *Trichomonas* em aves selvagens em Centros de Recuperação de Portugal”. Original.

CRAS: _____

Amostra nº _____

1. Nº de entrada: _____ 2. Data de ingresso: ____/____/____

3. Distrito: _____ Concelho: _____

4. Ordem: _____ Espécie: _____

5. Idade: Cria Juvenil Subadulto Adulto Indefinido

6. Sexo: M F Indefinido

7. Causa da entrada no CRAS:

8. Estado: Vivo Morto

9. Dados relevantes:

9.1. Sinais clínicos: Presença de sinais clínicos Ausência de sinais clínicos

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Emaciação | <input type="checkbox"/> Anorexia | <input type="checkbox"/> Relutância a voar |
| <input type="checkbox"/> Depressão/Letargia | <input type="checkbox"/> Penas eriçadas | <input type="checkbox"/> Regurgitação |
| <input type="checkbox"/> Diarreia | <input type="checkbox"/> Dispneia | <input type="checkbox"/> Corrimentos nasais/oculares |

9.2. Lesões: Presença de lesões Ausência de lesões

Lesões	Tamanho	Profundidade	Localização
Leve	0-50% da abertura traqueal	Material necrótico sai com facilidade, sem lesão subjacente	Fenda das coanas ou ponta da língua
Moderado	50-100% da abertura traqueal	Material necrótico profundo, fixo à mucosa, estendendo-se para os tecidos moles	Ângulo do bico, palato, fenda infundibular ou olho
Grave	>100% da abertura traqueal	Material necrótico muito profundo, fixo à mucosa, estendendo-se para os tecidos mais profundos (cartilagem e/ou osso)	Esófago, papo, base da língua ou crânio

Tabela 1 – Classificação de lesões de tricomoníase orofaríngea (fonte “*Oral trichomonosis: Description and severity of lesions in birds in Spain*”)

Preencher consoante a tabela:

9.2.1. Tamanho: Leve Moderado Grave

9.2.2. Profundidade: Leve Moderado Grave

9.2.3. Localização: Leve Moderado Grave

Maxila Mandíbula Olho Crânio Esófago

10. Amostra:

10.1. Data da recolha: ___/___/___

10.2. Período de colheita: Ante-mortem Post-mortem (<48h)

10.3. Material biológico: Lesão Muco

10.4. Local de colheita: Cavidade Orofaríngea Esófago Proximal Papo

11. Resultado da pesquisa

11.1. Método direto: Positivo Negativo

11.2. Coloração: Positivo Negativo

11.3. Cultura: Positivo Negativo

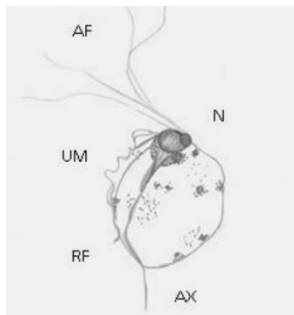
Assinatura: _____

Data ___/___/___

Anexo 10 - Protocolo "Prevalência de protozoários do género *Trichomonas* em aves selvagens em Centros de Recuperação de Portugal". Original.

Objetivo

Deteção de trofozoítos de *Trichomonas* sp.



Ordens incluídas na pesquisa ^{1 2 3}

- Columbiformes
- Accipitriformes
- Falconiformes
- Strigiformes
- Passeriformes
- Psittaciformes
- Charadriiformes

Materiais

- Método direto
 - Zaragatoa estéril
 - Soro fisiológico estéril
 - Lâmina
 - Lamela
- Coloração Giemsa
 - Zaragatoa estéril
 - Soro fisiológico estéril
 - Corante Giemsa
- Cultura
 - Zaragatoa estéril
 - Soro fisiológico estéril
 - InPouch TF
 - Incubadora

¹ (Chavatte et al. 2019b)

² (Martínez-Herrero et al. 2020)

³ (Gómez-Muñoz)

Período de colheita

- Ante-mortem
- Post-mortem (morte <48h) ⁴

Material biológico ⁵

- Lesão (nódulos/placas/granulomas)
- Muco

Local de colheita

- Cavidade orofaríngea
- Esófago proximal
- Papo

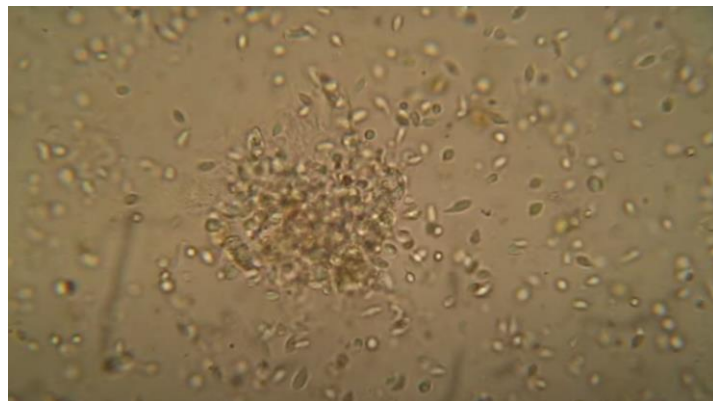
Metodologia laboratorial

Método direto (observação imediata) (vídeo “Trichomonas gallinae.wmv”) ^{6 7}

1. Rodar, com alguma pressão, a zaragatoa estéril humedecida em soro estéril na cavidade orofaríngea e esófago proximal.
2. Rodar a zaragatoa com a amostra numa lâmina de microscópio.
3. Cobrir a lâmina com uma lamela.
4. Examinar a lâmina nas objetivas 10x e 40x para deteção dos movimentos de progressão do parasita.

positivo: presença do microrganismo

negativo: ausência do microrganismo



⁴ (Díez Baños and Fernández 2018)

⁵ (Díez Baños and Fernández 2018)

⁶ (Trichomonas gallinae - Alchetron, The Free Social Encyclopedia 2017 Aug 18)

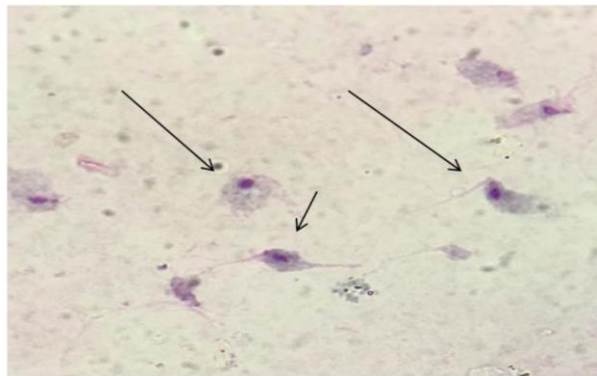
⁷ (Hamad and Hassan 2017b)

Coloração de Giemsa ^{8 9 10}

1. Rodar, com alguma pressão, a zaragatoa estéril humedecida em soro estéril na cavidade orofaríngea e esófago proximal.
2. Rodar a zaragatoa com a amostra numa lâmina de microscópio.
3. Secar a lâmina à temperatura ambiente durante 15-20min.
4. Mergulhar a lâmina em metanol 2-3x.
5. Deixar a lâmina secar à temperatura ambiente durante 30seg.
6. Corar lâmina com corante de Giemsa durante 20-30min (5-10 min em emergências).
7. Passar a lâmina por água destilada.
8. Secar a lâmina à temperatura ambiente durante 15-20min.
9. Examinar a lâmina nas objetivas 40x e 100x.

positivo: presença do microrganismo

negativo: ausência do microrganismo



Cultura (vídeo “How to Use: InPouch”) ¹¹

1. Legendar o InPouch TF com nº do animal e data de colheita.
2. Movimentar o ar e o líquido presentes na câmara superior para a câmara inferior.
3. Remover o topo do InPouch.
4. Abrir o InPouch pelas bordas brancas.
5. Movimentar algum líquido para a câmara superior.
6. Dobrar ao meio o InPouch.
7. Rodar a zaragatoa estéril humedecida com soro estéril na cavidade bucal e esófago proximal.
8. Rodar a zaragatoa com a amostra na câmara superior do InPouch.
9. Repetir passo 2.
10. Enrolar câmara superior até à câmara inferior.
11. Fechar o InPouch com as pontas metálicas.

⁸ (Fadhil and Ali 2019b)

⁹ (Hamad and Hassan 2017b)

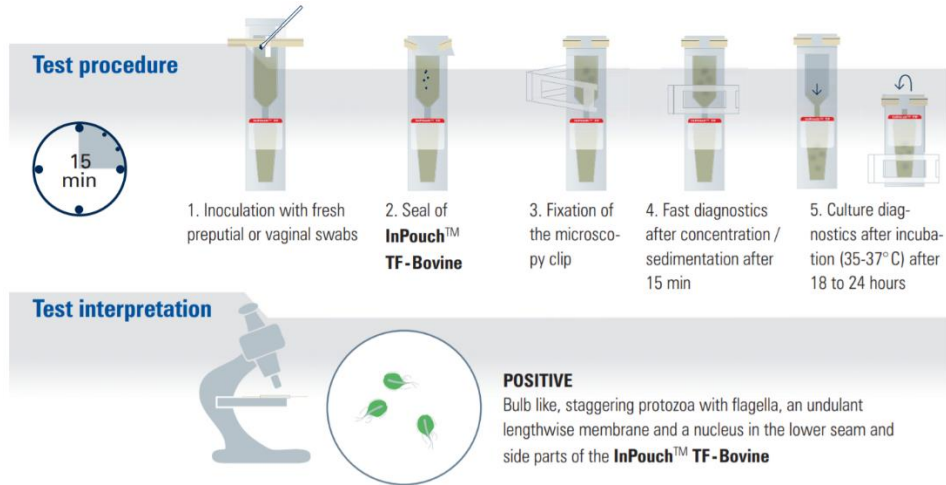
¹⁰ (Giemsa Stain- Principle, Procedure, Results, Interpretation - Staining 2021 Jul 2)

¹¹ (InPouch® TF-Bovine - Prepared Media Broth for Tritrichomonas foetus)

12. Incubar a 37°C durante 24h.
13. Examinar de 24/24h durante 3 dias. ¹²

positivo: presença do microrganismo

negativo: ausência do microrganismo após 3 dias de incubação



Nota: é possível usar o InPouch para realizar o método direto.

¹² (Qamar et al. 2017b)