

MARINA DE OLIVEIRA CESAR

***Sarcocystis* sp eliminados por *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (Gambás) de vida livre no Estado de São Paulo: infecção experimental em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e camundongos Balb/c nude**

São Paulo
2011

MARINA DE OLIVEIRA CESAR

***Sarcocystis* sp eliminados por *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (Gambás) de vida livre no Estado de São Paulo: infecção experimental em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e camundongos Balb/c nude**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2408
FMVZ

Cesar, Marina De Oliveira

Sarcocystis sp eliminados por *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (Gambás) de vida livre no Estado de São Paulo: infecção experimental em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e camundongos Balb/c nude / Marina De Oliveira Cesar. – 2011.

131 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.

1. *Sarcocystis* sp. 2. *S. falcatula*. 3. *S. neurona*. 4. *Didelphis* sp. 5. Patologia.
I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Frequência de ocorrência e análise histopatológica em ensaios biológicos com *Sarcocystis falcatula* presentes em *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (Gambás) de vida livre no Estado de São Paulo", protocolado sob o nº1527/2008, utilizando 50 (cinquenta) periquitos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09 de setembro de 2009.

We certify that the Research "Frequency of occurrence and histopathological analysis in biological assays with *Sarcocystis falcatula* in *Didelphis aurita* and *Didelphis albiventris* (Opossum) from wildlife in the State of São Paulo", utilizing 50 (fifty) lovebirds, protocol number 1527/2008, under the responsibility Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/09.

São Paulo, 10 de setembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Frequência de ocorrência e análise histopatológica em ensaios biológicos com *Sarcocystis falcatula* presentes em *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (Gambás) de vida livre no Estado de São Paulo", protocolado sob o nº 2019/2010, utilizando 7 (sete) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/09/2010.

We certify that the Research "Frequency of occurrence and histopathological analysis in biological assays with *Sarcocystis falcatula* in *Didelphis aurita* and *Didelphis albiventris* (Opossum) from wildlife in the state of São Paulo", protocol number 2019/2010, utilizing 7 (seven) mice, under the responsibility Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/29/2010.

São Paulo, 19 de novembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira",
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CESAR, Marina de Oliveira

Título: ***Sarcocystis* sp eliminados por *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (Gambás) de vida livre no Estado de São Paulo: infecção experimental em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e camundongos Balb/c nude**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Zuleica, pelo apoio e
dedicação em todas as fases de minha vida.*

*Ao meu noivo Ricardo, pelos nossos doze anos de
amor, companheirismo e amizade.*

*Aos animais que fazem parte de minha
vida por toda a alegria que me proporcionam.*

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos...

A Deus por guiar minha vida até aqui.

À Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima pelos ensinamentos, pela amizade, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de trabalhar com esse universo maravilhoso que é a medicina de animais selvagens.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares pela amizade, bom humor, confiança, ensinamentos e indispensável auxílio nas análises moleculares.

Ao Prof. Dr. Idércio Luiz Senhorini pela amizade e por me apresentar o mundo da documentação fotográfica.

À minha mãe Zuleica por dar a base para construir meu caráter, por me apoiar em todos os momentos, pelo amor incondicional, pela dedicação e por todas as palavras de incentivo nos momentos difíceis.

Ao Tony, meu segundo pai, por todo o apoio e por ter proporcionado tanto carinho durante toda a minha infância.

Ao meu noivo Ricardo que por muitos anos vêm passando noites em claro para me acompanhar nas aventuras de trabalho, por todo amor, por estar sempre presente e por todo o carinho.

À minha irmã Rosana pela amizade, carinho e por me proporcionar momentos de alegria sempre.

Aos meus irmãos Ricardo, Kim, Hermes, Nathan, João Fernando pelo carinho de sempre.

À minha avó Ivete por me fazer sentir sempre a pessoa mais especial do mundo.

Ao meu pai, Roberto, que me mostrou indiretamente a importância de nunca desistir e lutar pelos nossos sonhos.

À Flora, onde ela estiver. Será sempre a minha pequena.

Ao BOB, o cachorro mais companheiro desse mundo, por seu amor incondicional.

A todos os animais que fazem parte da minha vida: Ninha, Bina, Mel, Angel, Belinha, Psitas por me ensinarem tanto sobre a vida, a todo instante.

A toda minha família, minhas sobrinhas Giovanna e Ana Beatriz, minha sogra Ivone e cunhados pelo carinho e amor de sempre.

As minhas amigas queridas Ticiane e Bruna por todos os momentos maravilhosos de alegria, pela paciência nos meus momentos de distração e pela amizade longa e sincera.

Aos amigos: MP, Mário, Fábio, Thieska, Márcio, Andréa e Celina pela amizade e por entender minha ausência.

A minha amiga Renata C. F. Santos, pelo companheirismo nos momentos difíceis, pelas conversas agradáveis em Pirassununga e pela ajuda em vários momentos.

A todo o pessoal do LAPCOM: Pedro, Angélica, Alice, Silmara, Marina Bueno, Cátia Dejuste, Kátia, Alex, Omar, Cláudia, Stéfanie, Fabíola e Jorge por toda a ajuda, amizade e pelas longas conversas.

A todo o pessoal da clínica da Dra. Andrea: Andrea, Bete, Jú, Val, Bárbara, Iraci.

Ao Senhor Alfredo Keller pelo auxílio com a aquisição dos animais e pelo suporte gentilmente oferecido.

Ao Grupo "Peixe também é Bicho" pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

A Revista Passarinheiros pelo auxílio e atenção.

À Hilda F. J. Pena do Laboratório de Parasitárias III (VPS/FMVZ/USP) por todo o auxílio e ensinamentos essenciais para este trabalho.

Ao meu amigo Ralph Vanstreels pelas análises estatísticas.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia, Luciano A. Bugalho e Cláudio Arroyo, pela confecção de diversas lâminas e pelos ensinamentos.

A Shirley Meire da Silva, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela amizade e auxílio com os materiais.

À amizade da Profa. Dra Tânia de Freitas Raso.

A todos os funcionários do VPS de Pirassununga: “João”, “Ni” e “Seu Antônio” pelo auxílio, pela amizade e pelo amor com os animais deste trabalho.

As alunas de pós-graduação orientadas do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares: Estela, Sheila, Michele pela amizade e ajuda.

Ao Marcio Neves Carreira , cunhado da Renata, pela ajuda com a língua inglesa.

A todos os funcionários e pós-graduandos do VPT e VPS da FMVZ/USP que de alguma forma positiva fizeram parte da minha vida e que, por isso, merecem meu carinho.

Aos veterinários e biólogos do Parque Ecológico do Tietê, do Zoológico Quinzinho de Barros de Sorocaba, DEPAVE, Zoológico de São Bernardo dos Campos e ONG Vila Verde pelos animais e amostras cedidos para que este trabalho pudesse ser realizado: Liliane Milanello, Aduino V. Nunes, Adriana Joppert, Dafne Neves, Marcelo da Silva Gomes, Rodrigo H. F. Teixeira, Thaís Caroline Sanchez, Bruno Petri. Muito obrigada!

A Dra. Gertrud Muller pelas amostras cedidas.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka pelos ensinamentos, pela ajuda fundamental com os ensaios biológicos em camundongos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias pela amizade, pelos ensinamentos e palavras amigas.

A Cláudia Madalena Cabrera Mori pela ajuda indispensável com os camundongos imunodeficientes neste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ/USP pela dedicação, carinho e atenção dispensada em diversos momentos.

A CAPES e a FAPESP pelo suporte financeiro.

“Para ser grande, sê inteiro; nada teu
exagera ou exclui;
sê todo em cada coisa; põe quanto és no mínimo que fazes;
assim em cada lago, a lua toda brilha porque alta vive”.

Fernando Pessoa.

RESUMO

CESAR, M. O. *Sarcocystis* sp eliminados por *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (Gambás) de vida livre no Estado de São Paulo: infecção experimental em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e camundongos Balb/c nude. [*Sarcocystis* sp eliminated by free-ranging *Didelphis aurita* and *Didelphis albiventris* (opossum) in São Paulo: experimental infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and Balb / c nude mice] 2011. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Didelphis virginiana (gambá) é hospedeiro definitivo do *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis speeri*. Os esporocistos de *S. neurona*, *S. falcatula* e *S. speeri* são similares morfológicamente, mas podem ser distinguidos por sua patogenicidade e infectividade em aves e camundongos imunodeficientes e métodos moleculares. Porém, há uma considerável controvérsia a respeito da identificação das espécies de *Sarcocystis* de gambás. A heterogeneidade genética das espécies de *Sarcocystis* dificulta a identificação definitiva destes parasitos. Utilizou-se *D. aurita* e *D. albiventris* (gambás) mortos provenientes de Zoológicos e Centros de Triagens do Estado de São Paulo. Após usar o método de centrífugo-flutuação em solução de sacarose, purificou-se 19 (31,25%) das 25 amostras positivas em duplicatas para realização de PCR e ensaios biológicos utilizando periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) como modelo biológico do *S. falcatula* e camundongos Balb/c nude como modelo experimental para *S. neurona*. As amostras de esporocistos foram identificadas por PCR e sequenciamento de nucleotídeos de fragmentos codificadores de gene de proteína de superfície 2 (SAG-2) como *S. falcatula*. Os resultados das inoculações experimentais em periquitos australianos também demonstraram que as amostras continham esporocistos de *Sarcocystis falcatula* de alta patogenicidade e infectividade. Quinze animais inoculados vieram a óbito 10 dias pós-inoculação. As análises histopatológicas revelaram lesões severas principalmente em pulmão e fígado. Entretanto, não foram encontradas lesões em camundongos Balb/c nude inoculados com duas dessas amostras de esporocistos. Este trabalho demonstrou a importância desta enfermidade no Estado de São Paulo.

Palavras-chave: *Sarcocystis* sp. *S. falcatula*. *S. neurona*. *Didelphis* sp. Patologia.

ABSTRACT

CESAR, M. O. *Sarcocystis* sp eliminated by free-ranging *Didelphis aurita* and *Didelphis albiventris* (opossum) in São Paulo: experimental infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and Balb/c nude mice. [*Sarcocystis* sp eliminados por *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (Gambás) de vida livre no Estado de São Paulo: infecção experimental em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e camundongos Balb/c nude.]2011. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Didelphis virginiana (opossum of North America) is a definitive host of *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis speeri*. Sporocysts of *S. neurona*, *S. falcatula* and *S. speeri* are morphologically similar but can be distinguished by its pathogenicity and infectivity in immunodeficient mice and birds and molecular methods. However, there is considerable controversy regarding the identification of *Sarcocystis* species from opossums. The genetic heterogeneity of species of *Sarcocystis* hinders definitive identification of these parasites. We used dead *D. aurita* and *D. albiventris* (opossum) from Zoos and Trials Centers of São Paulo. After using the centrifugal flotation in sucrose solution, nineteen (31.25%) of 25 positive samples were purified in duplicate for PCR and biological assays using budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) as a biological model of *S. falcatula* and Balb/c nude as a model for *S. neurona*. Samples of sporocysts were identified by PCR and sequencing of gene fragments encoding surface protein 2 (SAG-2) as *S. falcatula*. The results of experimental inoculations in budgerigars also showed that the samples contained high pathogenic and infective *Sarcocystis falcatula* sporocysts. Fifteen infected animals died 10 days post-inoculation. The histopathological analysis showed severe lesions mainly in lung and liver. However, no lesions were found in Balb/c nude inoculated with two samples of sporocysts. This study demonstrated the importance of this disease in the state of São Paulo.

Key words: *Sarcocystis* sp. *S. falcatula*. *S. neurona*. *Didelphis* sp. Pathology

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C	Celsius
°C/s	Graus Celsius por Segundo
DEPAVE	Departamento de Parque e Áreas Verdes
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
EPM	Mieloencefalite Protozoária Equina
EUA	Estados Unidos da América
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
g	Gramas
G	Gambá
g/ml	Gramas por Mililitro
h	Horas
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
H&E	Hematoxilina e Eosina
IFA	Teste de Indireto de Fluorescência para Anticorpo
IUCN	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources
LCR	Líquido Céfalo Raquidiano
LAPCOM	Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres
mg/ml	Miligramas por Mililitro
Min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
ng	Nanograma
ONG	Organização Não Governamental
%	Por Cento
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
RAPD	Rapid Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
S	Sul
SAG	Gene do Antígeno de Superfície
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
TNE	Tris NaCl EDTA
µL	Microlitro
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
VPT	Departamento de Patologia
v/v	Volume a Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	CLASSIFICAÇÃO ZOOLOGICA E ASPECTOS BIOLÓGICOS DOS GAMBÁS	20
3.1.1	O gênero <i>Didelphis</i>	21
3.1.1.1	<i>Didelphis albiventris</i>	22
3.1.1.2	<i>Didelphis aurita</i>	23
3.2	CLASSIFICAÇÃO E CICLO DO <i>SARCOCYSTIS</i> SP	26
3.2.1	<i>Sarcocystis</i> em marsupiais sul-americanos (gambás)	28
3.2.1.1	<i>Sarcocystis neurona</i>	28
3.2.1.2	<i>Sarcocystis falcatula</i>	31
3.2.1.3	Relação entre as espécies de <i>Sarcocystis</i>	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	ANIMAIS	37
4.2	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	37
4.2.1	Pesquisa de oocisto/espocisto de <i>Sarcocystis</i>	38
4.2.2	Preparação da solução sacarose	38
4.2.3	Exame de fezes e de raspado de mucosa do intestino delgado	38
4.2.4	Preparação dos inóculos	39
4.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
4.4	ANÁLISES MOLECULARES.....	40
4.4.1	Primers utilizados: primers direcionados ao gene codificador de antígeno de superfície 2 (SAG-2)	40
4.4.2	Extração de DNA	42
4.4.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	43
4.4.4	Heminested-PCR	43
4.4.5	Deteção do produto amplificado	44
4.4.6	Sequenciamento	45
4.4.6.1	Purificação dos Produtos Amplificados.....	45
4.4.6.2	Quantificação dos Produtos de PCR Purificados.....	45
4.4.6.3	Reação de sequenciamento.....	46

4.4.6.4	Eletroforese de Sequenciamento	47
4.4.6.5	Análise das Seqüências	47
4.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	47
4.5.1	Infecção em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>).....	58
4.5.2	Infecção em camundongos Balb/c nude (<i>Mus musculus</i>).....	51
5	RESULTADOS	53
5.1	EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS	53
5.1.1	<i>Didelphis albiventris</i>	54
5.1.2	<i>Didelphis aurita</i>	54
5.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS61	
5.3	INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM PERIQUITOS AUSTRALIANOS (<i>MELOPSITTACUS UNDULATUS</i>).....	63
5.4	INFECÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/C NUDE (<i>Mus musculus</i>).....	69
5.5	ANÁLISES MOLECULARES.....	71
5.5.1	Análise das seqüências.....	71
6	DISCUSSÃO.....	73
6.1	AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS RECEBIDAS	73
6.2	INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL EM PERIQUITOS AUSTRALIANOS (<i>MELOPSITTACUS UNDULATUS</i>).....	75
6.3	INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS BALB/C NUDE (<i>Mus musculus</i>)	78
6.4	ANÁLISES MOLECULARES.....	80
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE.....	94

1. INTRODUÇÃO

Didelphis é um dos gêneros de mamíferos mais extensamente distribuído no continente americano e é popularmente conhecido como gambás. A crescente fragmentação dos remanescentes de mata nos arredores da cidade tem causado a aproximação dos gambás às áreas urbanas. O avanço da agricultura e da pecuária próximos às áreas naturais, bem como a ação degradante do homem nos ecossistemas, proporcionou o contato da população humana e dos animais domésticos com os animais silvestres. A restrição de sua área domiciliar, a redução de seus predadores naturais como aves de rapina e felinos, o sucesso reprodutivo da espécie cujos filhotes permanecem protegidos na bolsa e a grande facilidade de adaptação ao meio urbano são os principais motivos do aumento da população de gambás na cidade de São Paulo. Frequentemente e com relativa facilidade invadem domicílios a procura de alimentos. O estreito contato associado ao comportamento nômade desses animais facilitou a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambiente.

O *Sarcocystis* sp é um protozoário que possui um hospedeiro definitivo, geralmente um animal predador e um hospedeiro intermediário. A ingestão de tecido muscular ou nervoso contendo sarcocistos maduros (isto é, bradizoítas) é a única via pela qual o hospedeiro definitivo adquire a infecção por *Sarcocystis*. Os oocistos/esporocistos formados são infectantes para o hospedeiro intermediário.

Animais do gênero *Didelphis* são os hospedeiros definitivos de pelo menos três espécies de *Sarcocystis*: *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis falcatula* e *Sarcocystis speeri*.

A mieloencefalite protozoária equina (EPM) é uma doença neurológica debilitante dos equinos resultante da infecção no sistema nervoso central (SNC) mais comumente pelo *S. neurona*. A alta prevalência de anticorpos específicos para *S. neurona* (36%) detectada em 101 equinos (70 do Jockey Club de São Paulo, 15 Centro

de Treinamento do Rio de Janeiro e 16 de uma fazenda do Rio Grande do Sul) no Brasil em 1999 indicou contaminação ambiental por este protozoário.

Os esporocistos de *S. neurona*, *S. falcatula* e *S. speeri* são similares morfológicamente e utilizam marsupiais do gênero *Didelphis* como hospedeiros definitivos, mas podem ser distinguidas por sua patogenicidade e infectividade em aves e camundongos imunodeficientes. *Sarcocystis falcatula* não é infectivo para camundongos imunodeficientes, enquanto que, *S. neurona* e *S. speeri* não são para aves e *S. falcatula* é apenas para aves. Ambos, *S. neurona* e *S. speeri* podem induzir encefalites em camundongos associados com esquizontes e merozoítos. Sarcocistos têm sido vistos em camundongos nocauteados (Gamma Interferon Knockout - KO) alimentados com esporocistos de *S. speeri*. No entanto, existe considerável controvérsia a respeito da identificação das espécies de *Sarcocystis* de gambás.

Em espécies de aves altamente susceptíveis, a infecção geralmente resulta em morte hiperaguda devido à congestão pulmonar severa. Menos frequentemente a ave sobrevive e geralmente exibe sintomas incluindo emaciação, anormalidades neurológicas, letargia, tremores, paresia e "head tilt". Periquitos australianos infectados desenvolveram pneumonia aguda assim como hepatite, miocardite, nefrite e encefalite.

Até o ano de 1999, não havia sido relatado caso natural de *S. falcatula* em aves fora dos Estados Unidos. Em 1999, pela primeira vez, foi identificado *S. falcatula* na Argentina em *D. albiventris*. No Brasil, o primeiro relato de *S. falcatula* em gambás ocorreu no Estado de São Paulo no ano de 2000. De três gambás adultos recebidos para análise, os esporocistos foram obtidos de um gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris*) proveniente de Jaboticabal (SP) e enviado para os Estados Unidos para identificação. Em 2001, foi isolado novamente nos Estados Unidos *S. falcatula* a partir de amostras oriundas do Brasil, sendo oito *D. albiventris* e, pela primeira vez, de um *D. marsupialis*.

Os métodos de diferenciação molecular até então descritos para discriminar *S. neurona* e *S. falcatula* entre outros *Sarcocystis* dos quais os mamíferos do gênero

Didelphis são os hospedeiros definitivos não possuem confiabilidade. Não há até o momento, um estudo utilizando marcador com reconhecida capacidade de resolução de questões filogenéticas para a discriminação entre as espécies citadas acima.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos e publicados na literatura internacional a respeito da infectividade e patogenicidade das espécies de *Sarcocystis* transmitidos por gambás em aves e equinos, bem como em outras espécies de mamíferos, porém poucos estudos foram realizados acerca desse assunto no Brasil.

Nesse sentido, são necessários maiores estudos com vistas ao conhecimento da patogenicidade, infectividade e envolvimento do gambá no ciclo da sarcosporidiose aviária e encefalomielite equina. Propõe-se, portanto, utilizar periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) como modelo biológico para infecção por *Sarcocystis falcatula* e camundongos Balb/c nude (*Mus musculus*) para *Sarcocystis neurona* para diferenciação das espécies de *Sarcocystis*, utilizando *primers* e amplificar, pela reação em cadeia pela polimerase, fragmentos de loci gênico responsável pela codificação de antígenos de superfície de protozoários do gênero *Sarcocystis* spp. isolados de conteúdo intestinal de marsupiais do gênero *Didelphis*. Além disso, sequenciar os fragmentos gênicos de todas os isolados e compará-los entre si e com fragmentos de sequências homólogas disponíveis no GenBank e com fragmentos obtidos de isolados padrão.

Estudos mais aprofundados relacionados com *S. neurona* e *S. falcatula* são necessários devido à escassez de informações na literatura nacional associada à alta incidência desta enfermidade em aves e equinos no Brasil e principalmente no Estado de São Paulo. E conseqüentemente conhecer e compreender melhor a participação dos gambás na sarcosporidiose aviária e EPM, já que são animais selvagens sinantrópicos, frequentemente encontrados em nosso ambiente e pouco valorizados cientificamente.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi comprovar a hipótese da participação do gambá como transmissor do *Sarcocystis falcatula*, agente etiológico de pneumonias agudas associados a cistos musculares de aves e do *Sarcocystis neurona*, agente etiológico da encefalomielite equina no Brasil por meio de ensaios biológicos e análises moleculares.

Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Avaliar a frequência de ocorrência das espécies de *Sarcocystis* em animais do gênero *Didelphis* através de exame qualitativo.
- Avaliar a infectividade e patogenicidade das amostras de oocistos/espocistos de *Sarcocystis* (raspado de mucosa intestinal e fezes) dos gambás utilizando modelo biológico específico para *S. falcatula*, o periquito australiano, *Melopsittacus undulatus* avaliando-se também a evolução clínica da doença.
- Avaliar a infectividade e patogenicidade de algumas das amostras de oocistos/espocistos de *Sarcocystis* (raspado de mucosa intestinal e fezes) dos gambás utilizadas como modelo biológico para *S. neurona*, o camundongo Balb/c nude avaliando-se também a evolução clínica da doença.
- Identificar a(s) espécie(s) de *Sarcocystis* sp por meio da PCR e sequenciamento automático de ácidos nucleicos de fragmentos de genes codificadores de antígenos de superfície SAG-2.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CLASSIFICAÇÃO ZOOLOGICA E ASPECTOS BIOLÓGICOS DOS GAMBÁS

Marsupialia é o grupo dos mamíferos maior e mais diverso, existindo aproximadamente 262 espécies pertencentes a 16 famílias. A Infraclasse Marsupialia está dividida em sete ordens que são Dasyuromorphia, Peramelemorphia, Diprotodontia, Notoryctemorphia, Paucituberculata, Microbiotheria e Didelphimorphia (FINNIE, 1986).

Os marsupiais da América do Sul são considerados os mamíferos terrestres mais antigos do mundo. Eles pertencem à ordem Didelphimorphia (FINNIE, 1986). A ordem Didelphimorphia compreende a grande maioria dos marsupiais americanos vivos, distribuídos do sudeste do Canadá ao sul da Argentina na altura da latitude 47°S (NOWAK, 1999). HERSHKOVITZ (1992) reconheceu quatro famílias dentro desta ordem: Marmosidae, Caluromyidae, Glironiidae e Didelphidae. A família Didelphidae apresenta 17 gêneros e 87 espécies. No entanto, dois novos gêneros (VOSS; GARDNER; JANSÁ, 2004; VOSS; LUNDE; JANSÁ, 2005), duas novas espécies (SOLARI, 2004; VOSS; TARIFA; YENSEN, 2004) e três espécies revalidadas (VOSS; LUNDE; JANSÁ, 2005) devem ser acrescentadas a estes números, totalizando 19 gêneros e 92 espécies atualmente reconhecidas. Dentre eles, 16 gêneros e 55 espécies ocorrem no Brasil. Os marsupiais desta família podem ser caracterizados como mamíferos de pequeno a médio porte variando de 10 a 3000 g (EMMONS; FEER, 1997). Possuem mãos e pés com cinco dedos, sendo o primeiro dedo do pé desprovido de garra ou unha e geralmente opositor, usado para agarrar e escalar galhos. A cauda é geralmente longa e preênsil, podendo conter pelos longos ou diminutos e invisíveis a olho nu.

Na família Didelphidae encontra-se o gênero *Didelphis*, que são popularmente conhecidos como gambás. Os animais pertencentes à família Didelphidae são extremamente adaptáveis aos mais diferentes ambientes e são considerados um sucesso evolutivo. As espécies do gênero *Didelphis* são onívoras e encontradas em habitats variados, como florestas, áreas de matas e próximos a cursos de água. São essencialmente terrestres, mas escalam obstáculos com bastante facilidade. São nômades, com hábitos solitários, sendo difícil definir seu território, pois percorrem longas distâncias e permanecem em uma área por períodos relativamente curtos, facilitando assim a disseminação de patógenos. Os predadores destes animais incluem as grandes aves de rapina e todos os carnívoros (FINNIE, 1986).

A forma anatômica de distinguir os marsupiais de outros mamíferos é a presença de uma dobra de pele que cobre os filhotes durante o desenvolvimento, denominada bolsa marsupial (FINNIE, 1986). Nos gambás, esta bolsa é sustentada por dois ossos denominados epipúbis. O trato reprodutor da fêmea apresenta ovários, ovidutos, úteros e cérvix duplos e completamente separados. Cada útero abre-se em um saco vaginal separado por um septo medial. Os tratos digestório, urinário e reprodutor apresentam uma abertura externa única, denominada de cloaca. A temperatura destes animais é mais baixa que os mamíferos placentários, variando de 17-37°C, dependendo da temperatura ambiente, excitação e atividade (HUNSAKER, 1977).

3.1.1 O gênero *Didelphis*

Didelphis é um dos gêneros de mamíferos mais extensamente distribuído no continente americano, perdendo apenas para a espécie humana, sendo também o gênero de marsupial mais distribuído do mundo (HUNSAKER, 1977). Nas Américas do Norte e Central encontra-se o *Didelphis virginiana* (Figura 4). Na América do Sul

existem quatro espécies: *Didelphis marsupialis* (Figura 1), *D. albiventris* (Figura 2), *D. aurita* (Figura 3) e *D. imperfecta* (VOSS; EMMONS, 1996). No Estado de São Paulo encontra-se o *D. aurita* (norte da Argentina ao nordeste do Brasil) e *D. albiventris* (zona temperada da América do Sul), não existindo o *D. marsupialis* que se distribui apenas na floresta amazônica (CERQUEIRA, R. , 1985). Há referência na literatura de que *D. marsupialis* e *D. aurita* seriam a mesma espécie (gambás de orelhas pretas), no entanto constatou-se através de análises morfométricas se tratar de espécies diferentes (CERQUEIRA, R.; LEMOS, 2000).

3.1.1.1 *Didelphis albiventris*

D. albiventris é também chamado de gambá, raposa, saruê, seriguê, micurê. A distribuição geográfica desta espécie inclui as porções leste e centro-oeste do Brasil, Paraguai, Uruguai, as regiões norte e central da Argentina e sul da Bolívia (LEMOS; CERQUEIRA, 2002). Sua ocorrência na Colômbia, Equador e Peru, mencionada por Gardner (2005), não é corroborada pela análise de centenas de espécimes depositados em coleções zoológicas realizada por Lemos e Cerqueira (2002). Possui porte médio, com comprimento da cabeça e corpo entre 305 e 890 mm, comprimento da cauda entre 290 e 430 mm e massa corporal entre 500 e 2750 g (SILVA, 1994; EMMONS; FEER, 1997; CÁRCERES; MONTEIRO-FILHO, 1999; EISENBERG; REDFORD, 1999). Há variações consideráveis na coloração, com alguns indivíduos mais escuros do que outros. Ainda assim predomina a coloração grisalha, conferida por pelos negros misturados a pelos esbranquiçados. A face apresenta três listras pretas, duas delas sobre os olhos e uma na fronte. As orelhas são pretas na base e branco-rosadas na metade distal. Sua cauda é preênsil e provida de pelos em até dois terços basais, sendo o restante nu. *Didelphis albiventris* foi classificada como frugívora-onívora por Fonseca et al. (1996). Pode consumir roedores e aves de pequeno porte, rãs, lagartos,

insetos, caranguejos e frutos (LANGE; JABLONSKI, 1998; EISENBERG; REDFORD, 1999; NOWAK, 1999). É frequentemente relacionada à predação de aves domésticas, especialmente galinhas (CABRERA; YEPES, 1960). É solitária, como outros marsupiais, com exceção da época reprodutiva, que ocorre pelo menos uma vez ao ano. A gestação varia de 12 a 14 dias e o número de filhotes gerados, de quatro a 14. Após aproximadamente 60 dias, os filhotes iniciam o desmame, que se completa entre 70 e 100 dias. Apresenta hábitos crepusculares e noturnos, buscando abrigo em ocos de árvores, entre suas raízes, ou debaixo de troncos caídos. É considerada como de baixo risco de extinção pela IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais / 2010), subcategoria preocupação menor.

3.1.1.2 *Didelphis aurita*

D. aurita é também chamado de gambá, raposa, saruê, seriguê, micurê. Distribui-se na porção leste do Brasil, do estado de Alagoas a Santa Catarina, estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul, ocupando ainda o sudeste do Paraguai e a província de Misiones, na Argentina (CERQUEIRA, R.; LEMOS, 2000; BROWN, 2004). Apresenta porte médio, com comprimento da cabeça e corpo entre 355 e 450 mm, comprimento da cauda entre 298 e 470 mm e massa corporal entre 670 e 1882 g (VIEIRA, 1997; LANGE; JABLONSKI, 1998). Em sua face vê-se uma listra escura na frente e outra sobre cada olho. A orelha é grande, desprovida de pelos e o pavilhão auditivo completamente negro. Sua coloração dorsal pode ser negra ou grisalha, devido à presença de pelos-guarda brancos que se sobressaem aos pelos de cobertura negros. A pelagem ventral é creme-amarelada. A cauda é preênsil, preta em sua parte basal seguida por um branco-amarelado; está coberta de pelos apenas na região próxima ao corpo.

Didelphis aurita tem uma dieta onívora, com certa variação no consumo dos itens. Já foram registrados para sua alimentação: aves, répteis, pequenos mamíferos, vários invertebrados, sementes e frutos (CABRERA; YEPES, 1960; SANTORI; MORAES; CERQUEIRA, 1995; CHEREN et al., 1996; LEITE; COSTA; STALLINGS, 1996; CÁRCERES; MONTEIRO FILHO, 2001; CÁRCERES, 2004). Santori, Moraes e Cerqueira (1995) encontraram no estômago desta espécie um pedaço de pele de um *Didelphis aurita* (gambá) jovem. Cáceres e Monteiro-Filho (2001) destacaram o consumo de invertebrados e uma serpente fossoriais, *Liotyphlops beui*, e Cabrera e Yepes (1960) observaram o consumo de crustáceos marinhos em áreas próximas à costa.

É considerada como de baixo risco de extinção pela IUCN (2010), subcategoria preocupação menor.



Fonte: http://www.icb.ufmg.br/lbem/ddb/mammalia/didelphis_marsupialis.html

Figura 1 - *Didelphis marsupialis*



Fonte: <http://www.terramambiente.org/fauna/Mammiiferi/metatheria/didelphimorphia>

Figura 2 - *Didelphis albiventris*



Fonte: http://iie.itaipu.gov.br/print_node.php??secao=turbinadas1&nid=17632

Figura 3 - *Didelphis aurita*



Fonte: <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/opussum.htm>

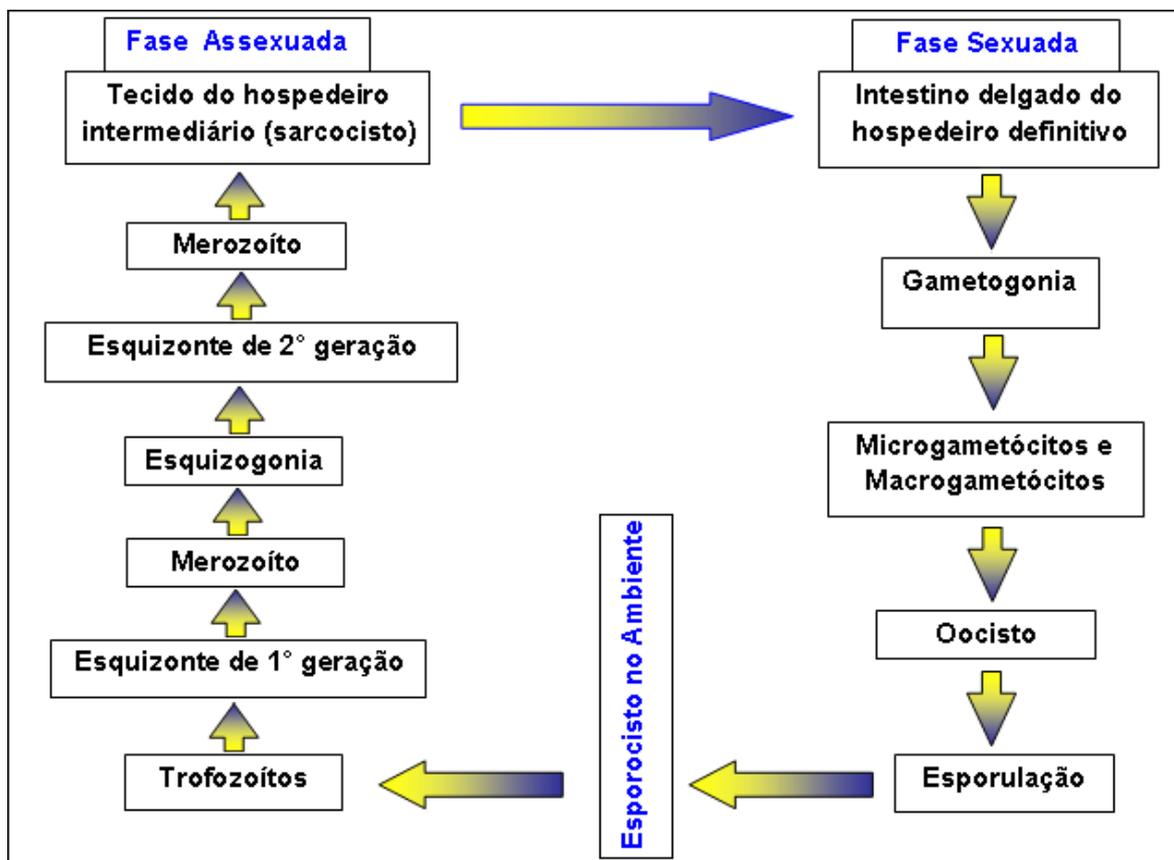
Figura 4 - *Didelphis virginiana*

3.2 CLASSIFICAÇÃO E CICLO DO *SARCOCYSTIS* SP

O *Sarcocystis* é um protozoário do filo Apicomplexa que acomete mamíferos, aves e répteis. As espécies de *Sarcocystis* têm dois hospedeiros no seu ciclo de vida, um hospedeiro definitivo, geralmente um animal predador e um hospedeiro intermediário (ciclo heteroxeno), conforme o quadro 1 (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989).

A ingestão de tecido muscular ou nervoso contendo sarcocistos maduros (isto é, bradizoítas) é a única via pela qual o hospedeiro definitivo adquire a infecção por *Sarcocystis*. Os bradizoítos são liberados dos sarcocistos pela ação das enzimas digestivas, penetram a mucosa do intestino delgado e se transformam em gametócitos masculinos (microgametócitos) e gametócitos femininos (macrogametas). Há a fertilização dos macrogametas pelos microgametas, com a

formação de oocistos na lâmina própria. A esporulação ocorre *in situ*, resultando na formação de dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. A parede do oocisto é delicada e frequentemente se rompe, liberando os esporocistos. Assim, oocistos esporulados e, mais comumente, esporocistos livres, entram no lúmen intestinal e são eliminados com as fezes, sendo imediatamente infectantes para o hospedeiro intermediário (TADROS; LAARMAN, 1982; DUBEY; SPEER; FAYER, 1989).



Fonte: (DUBEY, I. P.; SPEER; FAYER, 1989)

Quadro 1 - Ciclo Biológico do *Sarcocystis*

3.2.1 *Sarcocystis* em marsupiais sul-americanos (gambás)

O *Didelphis virginiana* (gambá da América do Norte) é hospedeiro definitivo de três espécies patogênicas de *Sarcocystis*: *S. falcatula* (BOX; MEIER; SMITH, 1984), *S. neurona* (FENGER et al., 1997) e *S. speeri* (DUBEY; LINDSAY, 1999). No Brasil o primeiro relato de *S. speeri* ocorreu em 2000 (DUBEY et al., 2000b). Os esporocistos foram provenientes da Universidade de São Paulo obtidos de um *D. marsupialis* adulto.

3.2.1.1 *Sarcocystis neurona*

A mieloencefalite protozoária equina (EPM) é uma doença neurológica debilitante dos equinos resultante da infecção no sistema nervoso central (SNC) mais comumente pelo protozoário *S. neurona*, descoberto em 1991 através do cultivo *in vitro* do SNC de equinos com paralisia (DUBEY et al., 1991b). Em sua forma predominante, apresenta-se como uma ataxia assimétrica progressiva que pode ser acompanhada de atrofia muscular focal (ROONEY et al., 1970). A EPM afeta equinos de qualquer raça, sexo e idade, no entanto, as raças mais acometidas são Puro Sangue Inglês (FAYER et al., 1990), American Trotter (ROONEY et al., 1970) e Quarto de Milha (FAYER et al., 1990) em animais com idade entre um a seis anos (MACKAY; DAVIS; DUBEY, 1992).

O primeiro relato de EPM ocorreu na região leste dos Estados Unidos (ROONEY et al., 1970), mas o agente só foi identificado em 1991 (DUBEY et al., 1991b). No Brasil o primeiro relato de EPM ocorreu em 1986 no sul do país (BARROS; DE BARROS; DOS SANTOS, 1986), sendo que o agente foi observado na medula espinhal de um equino; no entanto, o diagnóstico é duvidoso porque o

Toxoplasma gondii também já foi associado à doença neurológica em equinos no Brasil (MACRUZ et al., 1975). Em 1992, relatou-se a ocorrência de *S. neurona* associado à ataxia em dois equinos no Brasil, através da técnica de imunistoquímica, sugerindo que o hospedeiro definitivo não estava confinado à América do Norte (MASRI; ALDA; DUBEY, 1992).

Na América do Norte, o único hospedeiro definitivo do *S. neurona* é o *Didelphis virginiana* (gambá virginiano) (FENGER et al., 1997). Os equinos são infectados ao consumirem alimentos ou água contaminados com oocistos ou esporocistos do parasito (DUBEY et al., 2001a).

Em 1991, foi desenvolvido no “Gluck Equine Research Center” da Universidade de Kentucky nos EUA, o teste “Western blot” (GRANSTROM et al., 1993), sendo este baseado na separação eletroforética das frações protéicas de merozoítos de *S. neurona* cultivado. O “Western blot” permite avaliar amostras séricas e de líquido cefalorraquidiano (LCR) de equinos suspeitos, quanto à presença de anticorpos específicos, sendo assim de grande utilidade no diagnóstico ante-mortem da EPM (GRANSTROM, 1995). A técnica de “Western blot” (imunoblot) para detecção de anticorpos para *S. neurona* é o método padrão de diagnóstico ante-mortem em equinos apresentando sensibilidade e especificidade de 89% (GRANSTROM et al., 1993). Com esta técnica, demonstrou-se que 36% dos equinos no Brasil e Argentina foram expostos a esse agente (DUBEY; KERBER; GRANSTROM, 1999). No entanto, o diagnóstico definitivo da EPM é somente post-mortem, pela demonstração do protozoário em lesões no SNC (GRANSTROM et al., 1991).

A técnica indireta de fluorescência para anticorpos foi utilizada para medir anticorpos em camundongos infectados experimentalmente (LINDSAY; THOMAS; DUBEY, 2000), assim como ELISA foi utilizado para monitorar cavalos infectados experimentalmente (LINDSAY et al., 2000). A sensibilidade e a especificidades dessas técnicas não foram avaliadas.

Estudos realizados em regiões dos Estados Unidos com alta incidência de EPM determinaram a soroprevalência de anticorpos para *S. neurona* em populações de equinos. A soroprevalência de anticorpos anti-*S. neurona* na Pensilvânia foi de 45,3% (BENTZ; GRANSTROM; STAMPER, 1997), em Oregon, de aproximadamente 45% (BLYTHE et al., 1997) e em Ohio, de 53,6% (SAVILLE et al., 1997). No norte do Colorado, a soroprevalência foi de 33,6% (TILLOTSON et al., 1999) e em Michigan, de 60% (ROSSANO et al., 2001). Em Oregon e Michigan, a soroprevalência foi associada à presença de gambás (BLYTHE et al., 1997; ROSSANO et al., 2001). Segundo Blythe et al. (1997); Bentz, Granstrom e Stamper (1997) e Saville et al. (1997) a presença de anticorpos anti-*S. neurona* em cavalos neurologicamente normais não é recomendado para definir o diagnóstico de EPM, devendo-se analisar a presença de anticorpos no LCR (BERNARD, 1998).

Dubey, Kerber e Granstrom (1999) realizaram em 1999 um estudo da soroprevalência de anticorpos para *S. neurona* com 101 equinos (70 do Jockey Club de São Paulo, 15 do Centro de Treinamento do Rio de Janeiro e 16 de uma fazenda do Rio Grande do Sul) do Brasil. Como resultado, encontraram 36% dos 101 equinos clinicamente saudáveis com sorologia positiva. Detecção de anticorpos no soro indica somente exposição ao agente, mas não que o animal apresenta a doença (DUBEY; KERBER; GRANSTROM, 1999).

De acordo com Baccarin et al. (2001), durante 31 meses (de junho de 1997 a janeiro de 2000), foram cadastrados no Hospital Veterinário da FMVZ/USP 37 equinos apresentando sintomatologia neurológica compatível com EPM. Para confirmação da enfermidade, foi coletado LCR de todos os animais e enviado ao Laboratório *Neogen Corporation* em Lexington – Kentucky (EUA), para determinação de anticorpos anti-*S. neurona* através do teste “Western blot”, sendo que destes, 35 apresentaram anticorpos anti-*S. neurona* no LCR. Eram animais de ambos os sexos, de idade e raças variadas e provenientes de diferentes cidades do Estado de São Paulo.

A alta prevalência de anticorpos específicos para *S. neurona* detectada (DUBEY; KERBER; GRANSTROM, 1999) no Brasil em 1999 indicou contaminação ambiental por *S. neurona*. No entanto, o único hospedeiro conhecido até então era o *D. virginiana* cuja distribuição se restringe à América do Norte e Central. Dubey et al. (2001b) utilizando oito amostras provenientes da Universidade de São Paulo de *D. albiventris* adultos, oriundos de áreas do entorno da cidade de São Paulo, isolaram pela primeira vez, *S. neurona* do intestino de gambás do Brasil. Com isso, a presença de esporocistos de *S. neurona* em *D. albiventris* naturalmente infectados pode ser a explicação da alta prevalência de anticorpos nos equinos no Brasil (DUBEY, J. P.; KERBER; GRANSTROM, 1999).

3.2.1.2 *Sarcocystis falcatula*

Sarcocystis falcatula causa doença grave em determinadas espécies de aves. Severa sarcosporidiose aguda pulmonar tem sido observada entre as espécies de Psittaciformes e Passeriformes de zoológicos na América do Norte (JACOBSON et al., 1984; SMITH et al., 1990; HILLYER et al., 1991; CLUBB; FRENKEL, 1992; PAGE et al., 1992).

A espécie de *Sarcocystis* estudada por Box e Smith (1982) foi considerada incomum, devido à alta patogenicidade no hospedeiro intermediário e por apresentar uma grande quantidade de espécies como hospedeiros intermediários e prolongado período de esquizogonia (média de cinco meses). Box, Meier e Smith (1984) elucidaram a espécie envolvida como sendo *Sarcocystis falcatula*.

Segundo Fenger et al. (1997), potros alimentados com esporocistos de gambás de vida livre dos EUA produziram anticorpos anti-*S. neurona*, determinado pelo "Western blot", e desenvolveram sinais neurológicos sugestivos de EPM, mas os parasitos não foram observados no SNC dos animais necropsiados. Os mesmos

esporocistos também foram administrados para aves, os quais desenvolveram cistos musculares semelhantes aos causados por infecção por *S. falcatula*. Isso demonstrou que os gambás podem transmitir os dois agentes. A ingestão de um isolado de sarcocistos presentes em fezes de gambás pode causar infecção tanto em cavalos como em aves.

As aves se infectam através das fezes de gambás contendo oocistos e esporocistos esporulados. Experimentalmente, em algumas espécies de aves alimentadas com alguns poucos esporocistos, o *S. falcatula* pode ser letal (BOX; SMITH, 1982). O principal órgão acometido é o pulmão, mas alterações decorrentes da parasitose também podem ser observadas no fígado, baço, cérebro, rim, intestino e musculatura esquelética. Esquizontes de *Sarcocystis* são frequentemente encontrados nas células endoteliais de capilares, vênulas e veias (SMITH et al., 1987b; FAYER et al., 1990) e hepatócitos (RUIZ; FRENKEL, 1976). Hipertrofia endotelial, esquizontes e endoflebite resultam em obstrução dos vasos. Inicia-se então edema na parede alveolar pulmonar evoluindo para envolvimento do lúmen alveolar com degeneração de pneumócitos (SMITH et al., 1987a; b; NEILL; SMITH; BOX, 1989).

Na América do Norte, o *S. falcatula* tem como hospedeiro definitivo o *D. virginiana*; (BOX; DUSZYNSKI, 1978) e aves das Ordens Psittaciformes, Passeriformes e Columbiformes como hospedeiros intermediários conforme estudado por Box e Smith (1982) que utilizaram como modelos de estudo para hospedeiros intermediários as seguintes espécies: canários (*Serinus canarius*), mandarim (*Poephila guttata*), periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), pombo doméstico (*Columba livia*), galinhas (*Gallus gallus*) e galinha d'angola (*Numida meleagris*). As aves das ordens Anseriformes e Galiformes se mostraram resistentes à infecção. Todd, Gallina e Nelson (1975) relataram a presença de sarcocistos em Periquito-de-testa-laranja (*Aratinga canicularis*) e relatos de casos semelhantes em Tuim-santo (*Forpus passerinus*), Jandaia-mineira (*Aratinga auricapillus*), Arara canindé (*Ara ararauna*), e Periquito-de-queixo-laranja (*Brotogeris jugularis*), mostrando que psitacídeos nativos do continente americano desenvolvem cistos musculares (TODD; GALLINA;

NELSON, 1975; BOX; SMITH, 1982). A resistência relativa de psitacídeos do continente americano adultos à infecção por *S. falcatula* deve-se provavelmente à seleção dessas aves em um ambiente onde gambás infectados por esse agente seja prevalente (FRENKEL, 1989).

Box e Smith (1982) descreveram *S. falcatula* baseados em estudos do ciclo de vida e passagem para hospedeiros experimentais com capacidade de infectividade, os quais incluem periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), canários belga (*Serinus canarius*), pombas (*Columba livia*), mas não em galinhas domésticas (*Gallus gallus*). Os periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) têm sido utilizados frequentemente como hospedeiros intermediários experimentais porque são altamente susceptíveis à infecção por *S. falcatula*. No entanto, *S. falcatula* raramente desenvolve a forma madura em periquitos australianos porque o estágio de esquizogonia no pulmão é geralmente fatal (NEILL; SMITH; BOX, 1989).

Em espécies de aves altamente susceptíveis, a infecção geralmente resulta em morte hiperaguda devido à congestão pulmonar severa. Menos frequentemente a ave sobrevive e geralmente exhibe sintomas incluindo emaciação, anormalidades neurológicas, letargia, tremores, paresia e “head tilt” (DUBEY et al., 1991a). Periquitos australianos infectados desenvolveram pneumonia aguda assim como hepatite, miocardite, nefrite e encefalite (NEILL; SMITH; BOX, 1989).

Até o ano de 1999, não havia sido relatado caso natural de *S. falcatula* em aves fora dos Estados Unidos. Em 1999, pela primeira vez, foi identificado *S. falcatula* na Argentina em *D. albiventris*. Periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) alimentados com esporocistos de gambás naturalmente infectados (*D. albiventris*) morreram devido à sarcosporidiose aguda associada com *S. falcatula* (DUBEY et al., 1999).

Um surto de sarcosporidiose acometendo psitacídeos mantidos em cativeiro levou 47 animais a óbito em Foz do Iguaçu, Paraná (GODOY et al., 2009), sendo que 32 morreram agudamente entre os anos de 1997 a 1998. Na necropsia, foram observadas hemorragia pulmonar e esplenomegalia. Formas imaturas de *Sarcocystis*

sp foram observadas nas células endoteliais e em macrófagos pulmonares associado a áreas de hemorragia em 23 psitacídeos. Foram necropsiados quatro gambás que viviam próximos aos recintos, sendo que estes apresentavam oocistos de *Sarcocystis* sp na submucosa intestinal. Guimarães et al. (1999) e Rinaldi et al. (2002) relataram infecção por *Sarcocystis* sp em aves do gênero *Euphonia* e em *Saltator similis* mantidas em cativeiro, provenientes da cidade de São Paulo (SP).

No Brasil, o primeiro relato de *S. falcatula* em gambás ocorreu no Estado de São Paulo no ano de 2000. De três gambás adultos recebidos para análise, os esporocistos foram obtidos de um gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris*) proveniente de Jaboticabal (SP) e enviado para os Estados Unidos para identificação (DUBEY et al., 2000c). Em 2001, foi isolado novamente nos Estados Unidos *S. falcatula* a partir de amostras oriundas do Brasil, sendo oito *D. albiventris* e, pela primeira vez, de um *D. marsupialis* (DUBEY et al., 2001c).

Embora a sarcosporidiose seja uma doença sistêmica que afeta múltiplos órgãos, é comum que os sinais clínicos sugiram acometimento de determinadas porções corpóreas tais como o sistema neurológico, respiratório ou muscular. Adicionalmente, o diagnóstico ante-mortem da doença é difícil sem o auxílio de exames laboratoriais. Recentemente um novo teste indireto de fluorescência para anticorpos (IFA) desenvolvido para detectar animais infectados por *Sarcocystis falcatula* vem sendo utilizado na *Division of Comparative Pathology of the University of Miami* permitindo reconhecimento dos animais infectados e tratamento prévio (CRAY et al., 2005).

O tratamento inclui medidas de suporte cabíveis a cada caso associado à pirimetamina 0.5 mg/kg por via oral e sulfadiazina-trimetropim 30 mg/kg intramuscular duas vezes ao dia por 30 dias (PAGE et al., 1992).

3.2.1.3 Relação entre as espécies de *Sarcocystis*

Os esporocistos de *S. neurona*, *S. falcatula* e *S. speeri* são similares morfológicamente, mas podem ser distinguidos por sua patogenicidade e infectividade em aves e camundongos imunodeficientes. *Sarcocystis falcatula* não é infectante para camundongos imunodeficientes, enquanto que, *S. neurona* e *S. speeri* não são para aves e *S. falcatula* é apenas para aves (DUBEY; LINDSAY, 1998; DUBEY; SPEER; LINDSAY, 1998). Ambos, *S. neurona* e *S. speeri* podem induzir encefalites em camundongos associados com esquizontes e merozoítos (DUBEY; LINDSAY, 1999). Sarcocistos têm sido vistos em camundongos nocauteados (*Gamma Interferon Knockout* - KO) alimentados com esporocistos de *S. speeri* (DUBEY; LINDSAY, 1999). No entanto, existe considerável controvérsia a respeito da identificação das espécies de *Sarcocystis* de gambás.

Embora a grande similaridade na sequência codificadora da fração 18S do ribossomo do *S. falcatula* e *S. neurona* sugerisse que estas correspondiam a uma única espécie (DAME et al., 1995), subsequentes análises de outros loci gênicos forneceram suporte para diferenciar estas espécies (TANHAUSER et al., 1999). Embora *S. neurona* se mostre geneticamente uniforme, grandes variações têm sido observadas entre *S. falcatula*. Duas linhagens diferentes de *S. falcatula* foram identificadas por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) analisando o locus gênico 33/54 e corroborando para a sequência de variação do locus 25/396 (TANHAUSER et al., 1999). Embora a primeira desta linhagem represente *S. falcatula* porque foi isolada de aves, a segunda destas linhagens marcadas por RFLP, assume o padrão de *S. falcatula* porque infectou aves alimentadas com esporocistos de *D. albiventris* provenientes da Argentina (DUBEY et al., 2000c; 2000a). A heterogeneidade genética das espécies de *S. falcatula* dificulta a identificação definitiva destes parasitos, sendo que esta heterogeneidade foi descoberta recentemente. Tanhauser et al. desenvolveram

primers específicos, para distinguir *S. falcatula* e *S. neurona*-like e forneceram evidências moleculares para outras espécies de *Sarcocystis* não identificados.

Estudos recentes têm gerado novos rumos no que tange a biologia molecular e celular do *S. neurona*. Cerca de 15.000 sequências tags (ESTs) estão disponíveis para *S. neurona* (HOWE, D. K., 2001). Este banco de dados de sequências tem facilitado a identificação e caracterização de fatores de virulência de inúmeros parasitas como os antígenos de superfície (snSAGs) (HOWE, D. et al., 2005). Finalmente, o gene para antígeno de superfície snSAG1 tem sido também utilizado como um marcador de genótipo intraespecífico (HYUN; GUPTA; MARSH, 2003; ELSHEIKHA; MANSFIELD, 2004). O membro protótipo de uma larga superfamília de genes snSAG, snSAG1 foi descrito apenas recentemente (JUNG; LEE; GRIGG, 2004; HOWE, D. et al., 2005). Porém, Howe et al. (2008) divulgou em seu estudo recente que algumas cadeias de *S. neurona* possuem completa ausência desse antígeno de superfície. Por isso, foi proposto a utilização de outros genes de antígeno de superfície para a identificação e caracterização desse parasita como o snSAG3, snSAG2 e snSAG4, sendo esses últimos se mostrado mais eficientes (REJMANEK, D et al., 2010). Ortólogos desses genes snSAG tem se mostrado relevantes na identificação de diferenças genótípicas ao longo da cadeia de outro apicomplexa relacionado, *Toxoplasma gondii* (MONDRAGON et al., 1998; GRIGG et al., 2001).

Estudos de espécies de *Sarcocystis* parasitando gambás na América do Sul e Central são limitados a *D. virginiana*, *D. marsupialis* e *D. albiventris* na Argentina e Brasil, no entanto o parasitismo é considerado diversificado nos grupos avaliados (ROSENTHAL; LINDSAY; DUBEY, 2001). Nestas poucas amostras foram observadas cinco linhagens de *Sarcocystis* spp que podem ser distinguidos baseados nas variações moleculares dos esporocistos observadas nestas três espécies de gambás. Uma linhagem corresponde ao *S. neurona*, causando doença neuronal em equinos bem como em lontras marinhas, o mesmo acontecendo em *D. albiventris* no Brasil, e em *D. virginiana* nos Estados Unidos (ROSENTHAL; LINDSAY; DUBEY, 2001). As outras quatro linhagens têm sido designadas de *S. falcatula* ou *S. falcatula*-like.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados marsupiais sul-americanos do gênero *Didelphis* (*D. aurita* e *D. albiventris*) mortos, jovens ou adultos provenientes do Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba - SP), Zoológico de São Bernardo do Campo (São Bernardo – SP), DEPAVE-3 Fauna (Departamento de Parques e Áreas Verdes da cidade de São Paulo – SP), Parque Ecológico do Tietê (São Paulo – SP) e ONG Vila Verde. Os animais mortos foram transportados até o LAPCOM do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) para serem submetidos a exame necroscópico.

Os animais foram classificados quanto à espécie e sexo. Quando a idade do marsupial não foi relatada, a faixa etária foi baseada na fórmula dentária, classificando-o como jovem, adulto e idoso, segundo Petrides (1949).

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras recebidas foram inicialmente processadas e identificadas no LAPCOM do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (apêndice A).

4.2.1 Pesquisa de Oocisto/Esporocisto de *Sarcocystis*

Foi realizada no Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres do VPT/FMVZ/USP.

4.2.2 Preparação da Solução de Sacarose

A solução de sacarose que foi utilizada no método de centrífugo-flutuação consiste no preparo de uma solução “A” inicial. Esta primeira solução é feita através da adição de 128g de açúcar a 100 mL de água destilada até atingir uma densidade de 1,275 g/mL. Em seguida, adicionam-se três partes dessa solução “A” para cada parte de água destilada até conseguir-se uma densidade de 1,075 g/mL.

4.2.3 Exame de Fezes e de Raspado de Mucosa de Intestino Delgado

Durante a realização da necropsia dos gambás foram feitos raspados do intestino delgado (DUBEY; SPEER; FAYER, 1989) e coletadas amostras de fezes da cloaca. Para isolamento dos esporocistos de *Sarcocystis* spp do intestino delgado e oocistos/esporocistos das fezes foi realizado o método de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (OGASSAWARA; BENASSI, 1980). Foram utilizados 11 mL da solução de sacarose, adicionando 1g de conteúdo homogeneizado do intestino delgado e fezes da cloaca separadamente processados. Estas foram coadas em gaze e transferidas para um tubo tipo Falcon, sendo este centrifugado a 400 g. durante 10 minutos. Após isso, com o uso de uma alça de platina adaptada, foi retirada uma

gota da superfície do centrifugado e transferida para uma lâmina sendo, então coberta com uma lamínula de 1cm² e observada em microscópio composto com objetiva de 40x. As amostras positivas para esporocistos e oocistos de *Sarcocystis* spp foram armazenados em dicromato de potássio e inicialmente mantidos resfriados a 4°C.

4.2.4 Preparação dos inóculos.

Para a preparação dos inóculos/isolados de *Sarcocystis* spp, peneirou-se as amostras lavando-se com água destilada (Granutest-Telastem Peneiras para Análise LTDA, ABNT 35, abertura em mm = 0,50/TYLER 32) e após decantação das fezes, retirou-se o sobrenadante. O decantado foi centrifugado a 1.600 g por 10 minutos e 4°C a fim de concentrar os oocistos/esporocistos, retirando-se o sobrenadante novamente. O pellet foi ressuspendido em solução de HBSS (Hanks' buffered salt solution) a 4°C (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland) e acrescido de 10 unidades de penicilina G, 0,05 mg/ml de fungizone (Gibco® - princípio ativo é anfotericina B) e 100 µg/ml de estreptomicina e após contagem em câmara de Neubauer foram armazenados a 4°C para ensaio biológico e extração de DNA (DUBEY; LINDSAY, 1998).

Para as análises moleculares, a recuperação dos esporocistos e oocistos foi realizada com a lavagem da lâmina e lamínula com 1,5mL de tampão TE (10mM Tris HCl ph 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) em placa de Petri. O lavado foi transferido para microtubos de 1,5mL e centrifugado a 12.000g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foi repetido o mesmo processo. O sedimento contendo oocistos foi submetido à extração do DNA.

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram transferidos a planilhas eletrônicas. Os dados foram transformados em tabelas de contingência, e foram feitas comparações entre as espécies e gêneros através de testes Qui-Quadrado. Quando os dados não se enquadraram nas prerrogativas do teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher foi então aplicado. Todos os testes foram interpretados sob nível de significância α de 0.05.

4.4 ANÁLISES MOLECULARES

Os procedimentos referentes à extração de DNA e PCR – RFLP foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS)/ FMVZ/USP. Foi realizado o isolamento dos esporocistos conforme o item 4.2.4 e em seguida a realização da extração do DNA.

4.4.1 *Primers* utilizados: *primers* direcionados ao gene codificador de antígeno de superfície 2 (SAG-2)

O *primer* foi desenhado a partir de alinhamentos múltiplos entre todas as sequências EST (sequências SAG-like) disponíveis das espécies de *S. falcatula* e sequências de mRNA codificadoras de SAG-2 de *S. neurona*. Estas sequências SAGs

oriundas de *S. neurona* já foram determinadas e caracterizadas, estando disponíveis em bancos de dados de acesso público.

Os contigs formados com sequências heterólogas (aqueles formados por alinhamentos entre sequências EST de *S. falcatula* e sequências mRNA de *S. neurona*) foram utilizados para o desenho de *primers* consensuais potencialmente capazes de amplificar indistintamente sequências de *S. falcatula* e *S. neurona*.

Três *primers* foram desenhados e utilizados em formato de PCR e *Heminested-PCR* (hnPCR) conforme o quadro 2.

<i>Primers para PCR</i>	Sequências	Tamanho do produto*
SAG2 (4) (senso)	CAA CAA TTG CGT GCA CAC AA	411
SAG2 (3) (anti-senso)	ACA ACA CTG TGA GAG ATG CGA	
<i>Primers para hnPCR</i>		
SAG2 (11) (senso)	GGT CAG AGC TTT GTG CTG AA	360
SAG2 (3) (anti-senso)	ACA ACA CTG TGA GAG ATG CGA	

Quadro 2 - Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR, seus respectivos tamanhos em pares de bases e os produtos que amplificam. *As dimensões são estimadas, pois são baseadas em sequências contig de sequências heterólogas formados por alinhamentos entre sequências EST de *S. falcatula* e sequências mRNA de *S. neurona*.

4.4.2 Extração de DNA

Adicionou-se ao sedimento de oocistos obtido conforme descrito no item 4.2.4 um tampão de extração (Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%) até a obtenção de um volume final de 590 μ L. Realizou-se o congelamento (a -80°C) e descongelamento (a 37°C) das amostras três vezes consecutivas para melhor rompimento dos oocistos. Adicionou-se 5 μ l de proteinase K (10 μ g/ μ L) e procedeu-se uma incubação em banho-seco por 4 horas à 37°C ou 2 horas a 56°C. O volume final obtido foi de 600 μ L.

Para a purificação das amostras adicionou-se 300 μ L de fenol e 300 μ L de clorofórmio, seguido por homogeneização e centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (cerca de 400 μ L) foi transferido a um novo microtubo e adicionou-se 10% deste volume recolhido, que neste caso foi 40 μ L, de acetato de sódio (3M pH 5,3) para precipitação do DNA. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C por no mínimo 2 horas, ou “overnight”.

As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 30 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 1mL de etanol a 70%. O material foi novamente centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo deixado em posição invertida até estarem completamente secos.

Por fim, adicionou-se 30 μ L de TE (10mM Tris HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) nas amostras e essas foram homogeneizadas e incubadas em banho-seco a 56°C por 30 minutos. Após uma nova homogeneização as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até a sua utilização.

4.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O protocolo a seguir foi adotado para a amplificação das amostras com qualquer um dos *primers* desenhados neste estudo.

Para uma reação de 50 μ L foram utilizados:

- ✓ 25, 2 μ L de água ultrapura autoclavada
- ✓ 5 μ L de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; pH 9,0)
- ✓ 8 μ L da mistura de dNTPs (1,25mM)
- ✓ 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM)
- ✓ 2,5 μ L de cada primer (10 pmol/ μ L)
- ✓ 0,3 μ L de Taq DNA polimerase
- ✓ 5 μ L de DNA extraído da amostra alvo

Utilizando-se o termociclador executou-se o seguinte ciclo:

- ✓ Desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos
- ✓ Desnaturação a 94°C por 30 segundos
- ✓ Hibridização dos *primers* a 55°C por 30 segundos
- ✓ Extensão a 72°C por 50 segundos
- ✓ 40 ciclos de repetição a partir da desnaturação por 30 segundos
- ✓ Extensão final a 72°C por 5 minutos

4.4.4 Heminested-PCR

Para uma reação de 50 μ L utilizou-se 2,5 μ L de cada primer (10pmol/ μ L), 5 μ L de 10x PCR Buffer, 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM), 8 μ L de dNTP (1,25mM), 0,3 μ L de Taq polimerase e 1 μ L de DNA extraído da amostra alvo.

O protocolo a seguir foi adotado para a amplificação das amostras com qualquer um dos pares de *primers* desenhados neste estudo.

Para uma reação de 50 μ L foram utilizados:

- ✓ 29, 2 μ L de água ultrapura autoclavada
- ✓ 5 μ L de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; pH 9,0)
- ✓ 8 μ L da mistura de dNTPs (1,25mM)
- ✓ 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM)
- ✓ 2,5 μ L de cada primer (10 pmol/ μ L)
- ✓ 0,3 μ L de Taq DNA polimerase
- ✓ 1 μ L de DNA extraído da amostra alvo

Foi utilizado o seguinte ciclo:

- ✓ Desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos
- ✓ Desnaturação a 94°C por 30 segundos
- ✓ Hibridização dos *primers* a 55°C por 30 segundos
- ✓ Extensão a 72°C por 50 segundos
- ✓ 40 ciclos de repetição a partir da desnaturação por 30 segundos
- ✓ Extensão final a 72°C por 5 minutos

4.4.5 Detecção dos produtos amplificados

Os produtos obtidos com os ensaios de amplificação mais o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder), foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em cuba horizontal, imersos em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 1mM). Em cada

orifício do gel foram depositados 10 μ L de cada amostra misturado a 2 μ L de corante de amostra (30% de glicerol; 0,25% de azul de bromofenol).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) por 15 a 20 minutos e a visualização das bandas foi realizada através de transiluminação com luz ultravioleta.

4.4.6 Sequenciamento dos produtos de *Heminested*-PCR

Foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP.

4.4.6.1 Purificação dos Produtos Amplificados

Os produtos de *Heminested*-PCR de tamanho esperado foram recortados do gel de agarose a 1,5% com lâmina de bisturi. Esses fragmentos foram eluídos do gel e a purificação do DNA foi realizada com o “kit” GFXTM (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante.

4.4.6.2 Quantificação dos Produtos de PCR Purificados

Alíquotas dos produtos de PCR purificados (5 μ L) foram quantificadas com o auxílio do marcador de peso molecular Gene Ruler TM 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas) em gel de agarose 1,5% imerso em tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato

0,045M; EDTA 0,001M). As intensidades luminosas das bandas adquiridas após purificação do DNA foram visualmente comparadas com as do marcador. A concentração em nanogramas de DNA das amostras foi determinada seguindo tabela fornecida pelo fabricante do marcador de peso molecular.

4.4.6.3 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o “kit” ABI PRISM™ Big Dye Terminator™ (Applied Biosystems). Misturou-se de 6ng de DNA purificado, 2µL de Big Dye™, 1µL de tampão SaveMoney 5x (Tris-HCl 400mM; MgCl₂ 10mM, pH 9,0), 2pmol de cada um dos *primers* (senso ou anti senso) e água q.s.p. 10 µL.

O ciclo de sequenciamento foi efetuado no termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf com o seguinte programa:

- ✓ Desnaturação inicial; 96°C por 1 minuto
- ✓ Desnaturação: 96°C por 15 segundos
Rampa: 1,0°C/ s
- ✓ Hibridização: 50°C por 15 segundos
Rampa: 1,0°C/ s
- ✓ Extensão: 60°C por 4 minutos
Rampa: 1,0°C/ s

O ciclo repete-se por mais 39 vezes a partir da desnaturação. Em seguida, as amostras foram mantidas a 4 °C embrulhadas em folhas de alumínio até a sua precipitação.

4.4.6.4 Eletroforese de sequenciamento

As amostras foram homogeneizadas com formamida, colocadas em banho-seco por 3 minutos a 95°C, mantidas em gelo por cerca de 2 minutos e aplicadas para o sequenciamento. Este foi realizado a partir do protocolo do manual técnico do equipamento ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

4.4.6.5 Análise das sequências

A qualidade dos produtos sequenciados, bem como a montagem da sequência final de cada amostra foi realizada utilizando-se o programa Phred-Phrap, contido na suíte Codoncode Aligner.

Determinada as sequências de nucleotídeos de cada amostra, as mesmas foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W, contido na suíte BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no GenBank.

As sequências foram submetidas a busca no sítio BLAST, para pesquisa de similaridade com sequências disponíveis no GenBank.

4.5 ENSAIO BIOLÓGICO

Foi utilizado o periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) como modelo experimental para *S. falcatula* e o camundongo Balb/c nude, *Mus musculus* para *S. neurona*.

4.5.1 Infecção em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*)

Para testar a infectividade e patogenicidade dos esporocistos de cada amostra de intestino delgado ou fezes positiva para *Sarcocystis* spp foram utilizados dois periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) de seis a oito semanas de idade obtidos de cativeiro comercial. Esses animais eram examinados clinicamente (apêndice B), permaneciam em quarentena e eram tratados preventivamente com enrofloxacina (15 mg/Kg) e cetoprofeno (2 mg/Kg). O segundo lote de animais recebidos foi ainda tratado com Ivermectina (uma gota aplicada no dorso de cada animal) depois da detecção de sarna do gênero *Knemidokoptes* em um dos animais do lote. Foram então mantidos dois animais por gaiola no Infectório Experimental do Departamento de Preventiva e Saúde Animal (VPS/FMVZ/USP), conforme figura 5. Os animais foram alimentados com ração comercial para periquitos e água filtrada.

Antes da inoculação dos animais, foram realizados exames das fezes para detecção de coccídeos, utilizando-se o método de flutuação em solução de sacarose como descrito anteriormente no item 4.2.3. Esta etapa foi realizada em três fases de inoculações conforme a formação de lotes de animais recebidos, e se encontra melhor descrito adiante. Os animais foram alimentados por via oral com pelo menos 500 esporocistos (FENGER et al., 1997) contados em câmara de Neubauer e acompanhados clinicamente (apêndice C). Esta etapa foi realizada em três fases de inoculações conforme a formação de lotes de animais recebidos, e se encontra melhor descrito adiante. Os animais experimentais e os controles foram eutanasiados após um mínimo de 29 dias. Animais que morreram ou foram eutanasiados foram necropsiados (DUBEY et al., 2000c) e fragmentos de todos os órgãos internos foram fixados em formalina tamponada a 3,8% por 24 horas (apêndice D). Os fragmentos dos órgãos foram cortados em aproximadamente 5 mm e enviados ao Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ, para posterior desidratação, diafanização e inclusão em parafina e, posteriormente, seccionados em cortes de 5 µm de espessura e,

finalmente, corados por hematoxilina e eosina (H&E). O exame das lâminas foi realizado em microscopia de luz, com aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x.

Fragmentos de pulmão, fígado, baço, encéfalo, rim, intestino, língua, traquéia, esôfago, ventrículo, proventrículo, coração e músculo esquelético foram coletados assepticamente e congelados em -80°C para possíveis estudos futuros.

Descrição das fases de inoculação:

Primeira fase:

- Mortes no recebimento do lote: quatro animais vieram a óbito e foram descartados
- Quantidade de gaiolas: seis
- Quantidade total de periquitos: 11
- Quantidade de animais controles: um animal
- Período de tratamento com antibacteriano pré-inoculação: sete dias
- Inoculado em 05/09/09 e reinoculado dia 20/09/09

Segunda fase:

- Mortes no recebimento do lote: seis animais descartados
- Quantidade de gaiolas: cinco
- Quantidade total de periquitos: 10
- Quantidade de animais controles: dois animais
- Período de tratamento com anti-bacteriano pré-inoculação: 10 dias
- Tratados também com ivermectina 1% devido presença de sarna em alguns animais
- Inoculado em 21/10/09 reinoculado dia 05/11/09

Terceira fase:

- Mortes no recebimento do lote: oito animais descartados
- Quantidade de gaiolas: 11
- Quantidade total de periquitos: 19
- Quantidade de animais controles: dois animais
- Período de tratamento com anti-bacteriano pré-inoculação: 15 dias (animais mais debilitados no recebimento)
- Inoculado em 09/12/09 e reinoculado dia 28/01/10



Figura 5 - Infecção experimental em periquitos realizada no Infectório Experimental do VPS/FMVZ em Pirassununga

4.5.2 Infecção em camundongos Balb/c nude (*Mus musculus*)

Para testar a infectividade e patogenicidade dos esporocistos de cada amostra de intestino delgado ou fezes positiva para *Sarcocystis* spp foram utilizados dois camundongos Balb/c nude (figura 6) machos de 5 a 8 semanas de idade obtidos do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Foram mantidos dois animais por caixa sendo a terceira caixa contendo três animais controles totalizando sete animais inoculados e três caixas. Os animais controles receberam apenas solução utilizada na diluição e preservação das amostras (solução HBSS (Hanks' buffered salt solution) acrescido de 10 unidades de penicilina G por ml, 0,05 mg/ml de fungizone (Gibco®) e 100 µg/ml de estreptomicina). Os animais foram alocados no Biotério do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres do Departamento de Patologia (FMVZ/USP) permanecendo dentro de uma câmara de fluxo laminar. As caixas apresentavam aproximadamente 30cmx15cmx15cm contendo bebedouro com água autoclavada *ad libitum*, tampa com grade e alimento (ração comercial autoclavada para camundongos) oferecido diariamente e filtro. As caixas foram mantidas em câmaras de fluxo laminar para diminuir a exposição dos animais aos patógenos ambientais durante a manipulação. Caixas eram forradas com maravalha autoclavada. Animais foram manipulados apenas no primeiro dia para alimentação com os esporocistos, para a troca de caixa e maravalha uma vez por semana e no último dia para eutanásia.

Imediatamente antes da inoculação e durante os 21 dias, foram realizados semanalmente exames das fezes para detecção de coccídeos, utilizando-se o método de flutuação em solução de sacarose conforme descrito no item 4.2.3. Ainda foram realizados exames físicos diariamente considerando-se parâmetros como: consistência e coloração de fezes, grau de atividade, coloração de mucosa ocular ou quaisquer observações clínicas relevantes. Os animais foram alimentados por via oral

com 500 esporocistos (FENGER et al., 1997) contados em câmara de Neubauer. Os animais foram eutanasiados 21 dias após o início do experimento. Animais que vieram a óbito ou que foram eutanasiados foram necropsiados e fragmentos de todos os órgãos foram fixados em Methacarn (metanol 60%, ácido acético 10% e clorofórmio 30%) por 4 horas e depois mantidos em álcool 95%. Para eutanásia, realizou-se anestesia com 100 mg/Kg de quetamina e 15 mg/Kg de xilazina por via intramuscular e fez-se punção cardíaca por pessoa treinada. Animais vieram a óbito após hipovolemia.

Os fragmentos dos órgãos foram cortados em aproximadamente 5mm e enviados ao Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ, para desidratação, diafanização e inclusão em parafina e, posteriormente, seccionados em cortes de 5 µm de espessura e, finalmente, corados por hematoxilina e eosina (H&E). O exame das lâminas foi realizado em microscopia de luz, com aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x.



Fonte: http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=CAMUNDONGO&id_ani=3&caract=sim

Figura 6 – Camundongo Balb/c nude (*Mus musculus*)

5 RESULTADOS

A análise dos resultados foi realizada através da determinação da presença de *Sarcocystis* spp em amostras de raspado de mucosa do intestino delgado e nas fezes (coletadas da cloaca), determinando-se a frequência de animais positivos e pela determinação da presença de *Sarcocystis* spp em cortes histológicos dos periquitos e camundongos inoculados experimentalmente.

5.1 EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS

Os resultados obtidos na pesquisa de *Sarcocystis* spp pela centrífugo-flutuação em sacarose das amostras de raspado de mucosa do intestino delgado e das fezes de cloaca dos gambás (*Didelphis albiventris* e *D. aurita*) estão relatados nos itens abaixo, de acordo com a espécie estudada.

Foram analisados 80 animais (apêndice E) sendo 25 positivos para *Sarcocystis* spp. Dentre os animais, foram 33 (41%) *Didelphis albiventris* e 47 (47%) *Didelphis aurita*.

Seguem na Tabela 1 os dados dos animais coletados.

A contagem máxima de esporocistos/oocistos em câmara de Neubauer foi de 3,5 milhões (amostra G26) de esporocistos/oocistos por ml de amostra e a mínima foi de mil esporocistos/oocistos por ml (amostra G71).

5.1.1 *Didelphis albiventris*

Para *D. albiventris* foram analisados 18 (54,5%) machos e 15 (45,5%) fêmeas. Um adulto proveniente do DEPAVE e os outros todos adultos provenientes do Zoológico de Sorocaba. Desses, quatro (12,1%) tiveram resultado positivo e os outros 29 (87,8%) foram negativos para o exame de centrífugo-flutuação realizado.

5.1.2 *Didelphis aurita*

Para o *D. aurita* são 22 (46,8%) fêmeas e 24 (51%) machos, um pool contendo fezes de dois animais sendo um macho e uma fêmea (2,1%). 44 eram (93,6%) adultos e dois filhotes (4,3%) e o pool de fezes continha dois animais jovens (2,1%). Com relação à origem, 28 (59,6%) eram gambás provenientes do DEPAVE (amostras congeladas), quatro (8,5%) do Parque Ecológico do Tietê, cinco (10,6%) animais do Zoológico de São Bernardo do Campo e dois (6,4%) do Zoológico de Sorocaba, um animal encontrado morto em rodovia próximo a Cotia (2,1%) e seis (12,7%) proveniente da ONG Vila Verde. As proporções entre os fatores foram representados nos gráficos 1,2,3, 4 e 5.

Desses, 21(44,7%) foram positivos e 26 (55,3%) negativos para o exame de centrífugo-flutuação em solução de sacarose.

Tabela 1 - Total de animais X Quantidade de animais positivos para cada fator.

Fator	NO. ANIMAIS	(%)	NO. POSITIVOS	(%)
Espécie	80 (100,00%)		25 (31,25%)	
<i>D. aurita</i>	47 (58,75%)		21 (84,00%)	
<i>D. albiventris</i>	33 (41,25%)		4 (16,00%)	
Para <i>D. aurita</i>				
Sexo	47 (100,00%)		21 (44,68%)	
Macho	24 (51,06%)		10 (47,61%)	
Fêmea	22 (46,80%)		11 (52,38%)	
Pool fezes	1 (2,12%)		0	
Idade	47 (100,00%)		21 (44,68%)	
Adulto	44 (93,61%)		21 (100,00%)	
Jovem/Filhote	3 (6,38%)		0	
Procedência	47 (100,00%)		21 (44,68%)	
Cativeiro	2 (4,25%)		0	

Continua

Fator	Conclusão	
	NO. ANIMAIS	NO. POSITIVOS
Vida livre	45 (25,74%)	21 (100,00%)
Para <i>D. albiventris</i>		
Sexo	33 (100%)	4 (12,12%)
Macho	18 (54,54%)	3 (75,00%)
Fêmea	15 (45,45%)	1(25,00%)

Na tabela 1 pode-se observar os resultados obtidos das amostras dos animais da espécie *D. aurita* e *D.albiventris*. Os resultados mostram a presença de 31,25% de exames positivos para *Sarcocystis* spp.

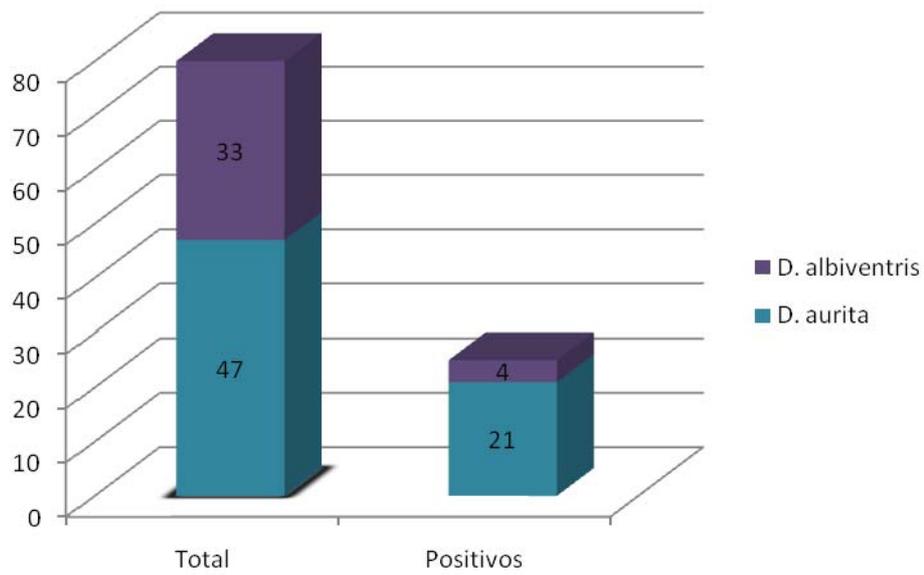


Gráfico 1 - Proporção de positividade entre as espécies coletadas

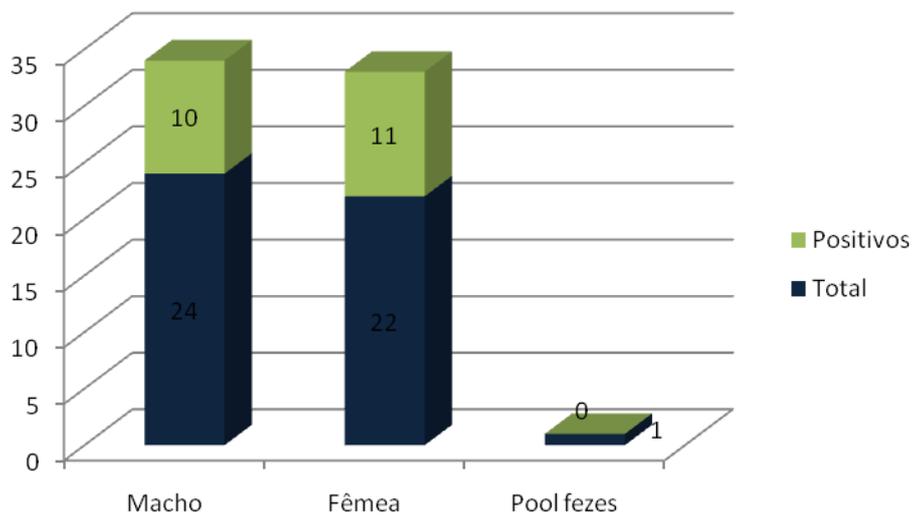


Gráfico 2 - Proporção de positividade entre sexo para *D. aurita*.

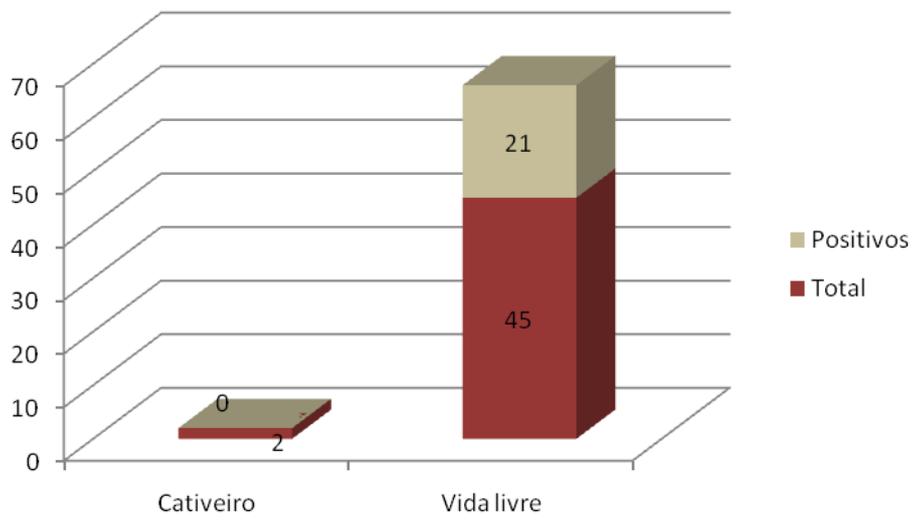


Gráfico 3 - Proporção de positividade relacionada à procedência para *D. aurita*.

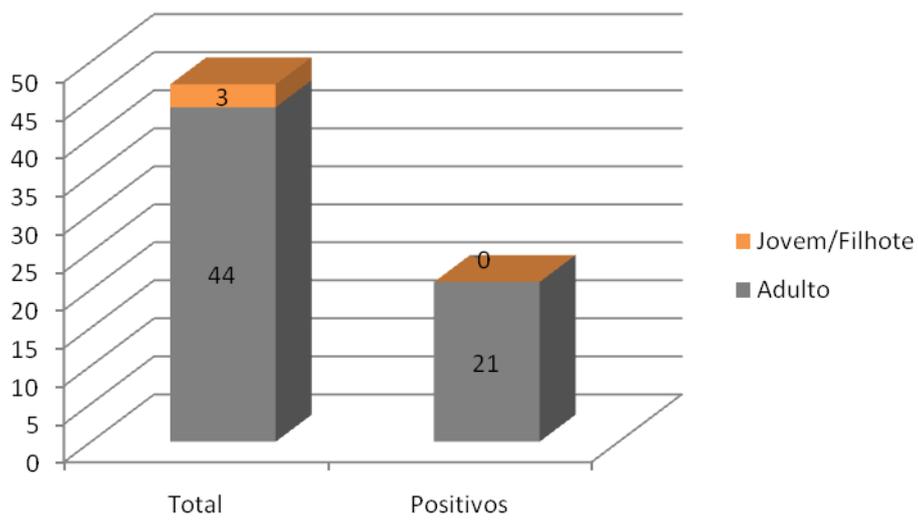


Gráfico 4 - Proporção de positividade relacionada à idade para *D. aurita*.

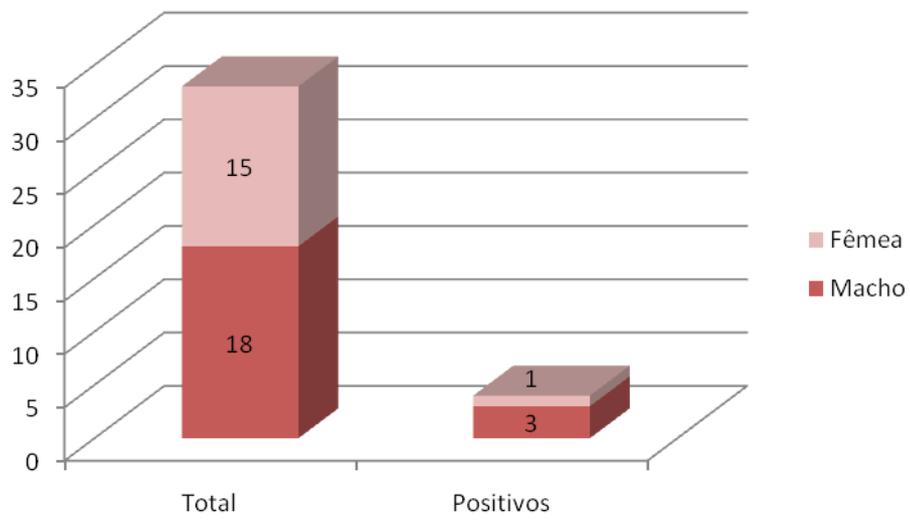


Gráfico 5 - Proporção de positividade entre sexo para *D. albiventris*.

Nas figuras 7 e 8 podem-se observar os oocistos e esporocistos de *Sarcocystis* spp no exame de centrífugo-flutuação em sacarose.

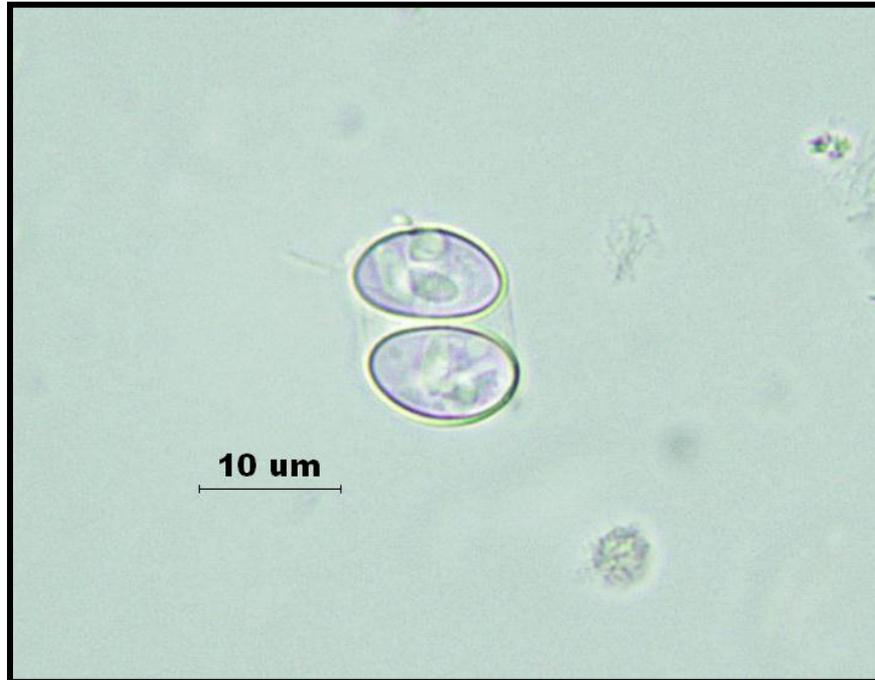


Figura 5 - Oocistos de *Sarcocystis* spp em exame de centrífugo-flutuação em sacarose.

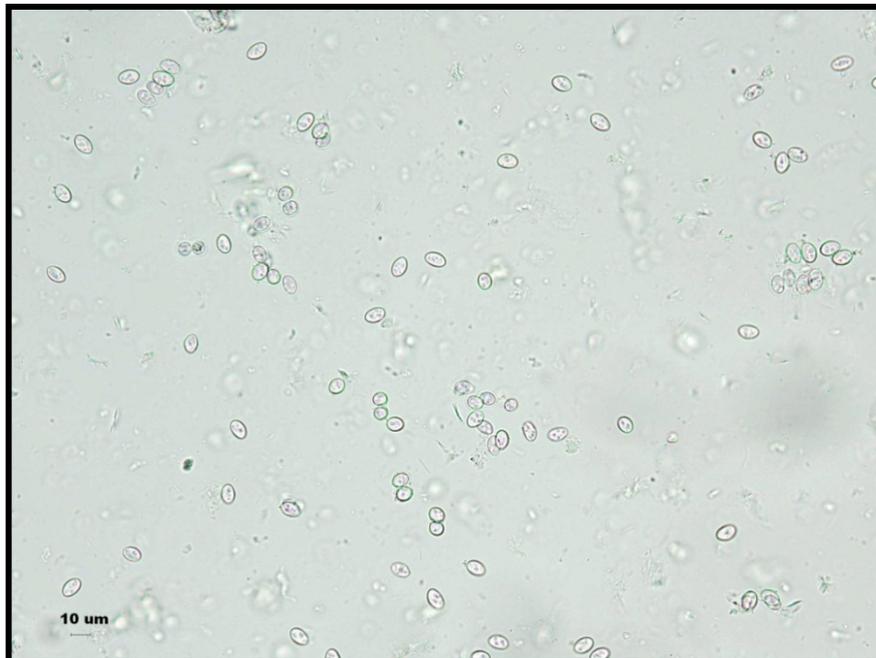


Figura 6 - Esporocistos de *Sarcocystis* spp em exame de centrífugo-flutuação em sacarose.

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A tabela 2 apresenta um sumário dos resultados. Foram estudados 81 espécimes de *Didelphis* sp., sendo 33 *D. albiventris* e 48 *D. aurita*. Todos os *D. albiventris* eram adultos procedentes de vida livre, sendo 18 machos e 15 fêmeas. Dois *D. aurita* procedentes de cativeiro foram estudados, sendo ambos machos adultos. Os demais *D. aurita* eram procedentes de vida livre, sendo quatro filhotes (dois machos e duas fêmeas) e 42 adultos (21 machos e 21 fêmeas).

Tabela 2: Sumário dos resultados

Espécie	Procedência	Idade	Sexo	Positivos / Total	
<i>D. albiventris</i>	Vida Livre	Adulto	Macho	3 / 18 (17%)	
			Fêmea	1 / 15 (7%)	
<i>D. aurita</i>	Cativeiro	Adulto	Macho	0 / 2	
	Vida Livre	Filhote	Macho	0 / 2	
			Fêmea	0 / 2	
			Adulto	Macho	10 / 21 (48%)
				Fêmea	11 / 21 (52%)
	Total				25 / 81 (31%)

Não foi possível comparar a influência da classe etária na positividade ao *Sarcocystis* sp. pois apenas quatro filhotes foram estudados (todos *D. aurita* de vida livre), sendo todos negativos. Tampouco foi possível comparar a incidência entre os animais mantidos em cativeiro e os de vida livre, pois apenas dois animais de cativeiro foram estudados (ambos *D. aurita* adultos). Para evitar uma possível influência da idade ou da procedência nas análises, estes foram excluídos das comparações subsequentes.

Comparando-se apenas adultos de vida livre, a incidência foi significativamente diferente entre as espécies, com *D. albiventris* apresentando uma menor incidência (4/33, 12%) do que *D. aurita* (21/42, 50%) (Teste Qui-quadrado: $X^2=11.932$, $gl=1$, $P=0.001$).

Entre os adultos de vida livre, não houve diferença significativa na incidência de machos e fêmeas em *D. albiventris* (Teste exato de Fisher: $P=0.607$) nem tampouco em *D. aurita* (Teste Qui-quadrado: $X^2=0.095$, $gl=1$, $P=0.758$).

Para a tabela 3, classificou-se a região onde situa-se o Zoológico de Sorocaba como interior e as demais instituições como região da capital. A tabela apresenta a comparação dos resultados entre as instituições por região (capital ou interior) estudadas, sendo apenas indicados os resultados de adultos de vida livre. O baixo número de animais estudados e a desproporção no número de animais e espécie examinados em cada instituição não permitiram testar estatisticamente a presença de diferenças de incidência entre as regiões estudadas (interior e capital). Os resultados, no entanto, sugerem que não haja uma diferença na incidência de *Sarcocystis* sp. entre as regiões estudadas, uma vez que, sobretudo para *D. aurita*, os resultados se mostram consistentes em indicar uma incidência próxima a 50-67%.

Tabela 3 - Comparação dos resultados entre as regiões estudadas

	<i>D.</i>	
	<i>albiventris</i>	<i>D.aurita</i>
DEPAVE	0 / 1	13 / 26 (50%)
Zoo - Sorocaba	4 / 31 (13%)	2 / 3 (67%)
Cotia	-	0 / 1
ONG Vila Verde	-	4 / 6 (67%)
Pq. Ecológico do Tietê	-	2 / 4 (50%)
UFPE / Zoo - Sorocaba	0 / 1	-
Zoo - SBC	-	0 / 2
Total	4 / 33 (12%)	21 / 42 (50%)

5.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM PERIQUITOS AUSTRALIANOS (*MELOPSITTACUS UNDULATUS*)

Dos 40 animais inoculados experimentalmente (apêndice F), cinco eram controles e receberam apenas solução conservante da amostra contendo HBSS associado a antibacteriano e fungicida, 15 vieram a óbito e os outros 20 animais foram eutanasiados sendo que seis desses animais receberam apenas 200 esporocistos.

Dois animais pertencentes ao grupo controle vieram a óbito com sinais de caquexia, diarréia e anorexia. No exame histopatológico apresentaram apenas necrose e congestão de mucosa intestinal sugerindo um processo entérico possivelmente de origem bacteriana. Não foram realizados outros exames complementares.

Na microscopia de luz constatou-se esquizontes contendo merozoítos de *Sarcocystis* no endotélio pulmonar de 29 dos 35 animais inoculados e no fígado de 12 animais (apêndice G).

Entre os 15 animais que vieram a óbito, puderam-se observar sinais clínicos em 12 periquitos, sendo dispnéia intensa e letargia. Estes sinais estavam presentes apenas no dia e algumas horas antes da morte. Os achados necroscópicos apresentados consistiram de: esplenomegalia moderada a severa, hepatomegalia, congestão hepática, renal e pulmonar com presença de edema severo. Os vasos cerebrais encontravam-se congestionados com conseqüente aumento do calibre. O pâncreas e duodeno apresentavam-se congestionados. Os animais vinham a óbito com excelente conformação da musculatura peitoral e em quase 100% dos casos possuíam grande quantidade de alimento em inglúvio (figura 9).

No exame microscópico observou-se que o pulmão e o fígado apresentavam lesões severas. Notou-se a presença de esquizontes sinuosos contendo merozoítos de *Sarcocystis* no endotélio de capilares pulmonares, congestão severa e em alguns casos,

pneumonia com infiltrado de células inflamatórias (linfócitos) tanto perivascular como no interstício. Infiltração de células inflamatórias (linfócitos) tanto perivascular como no interstício. Média a grande quantidade de fibrina no lúmen dos parabrônquios. O fígado apresentou congestão severa, hemossiderose em hepatócitos, edema intra e extracelular, áreas de hemorragia e degeneração vacuolar na maioria dos casos, aumento da celularidade mononuclear com infiltração linfoplasmacitária periportal além da presença de merozoítos de *Sarcocystis* no endotélio hepático. Na musculatura cardíaca pôde-se observar áreas de necrose de coagulação em alguns animais. O baço apresentou na maioria dos animais marcada histiocitose e plasmocitose, porém diferentemente, em outros animais houve depleção esplênica. O rim apresentava-se com marcada congestão e muitos mostraram áreas de necrose de coagulação focais além de infiltrado inflamatório mononuclear. O pâncreas apresentava congestão e áreas de necrose, enquanto que o duodeno apresentava congestão na maioria das aves infectadas. O cérebro apresentou moderada a severa congestão, encefalite caracterizada por gliose evidente se concentrando em geral na periferia do órgão, edema intracelular e áreas de necrose em alguns periquitos. Não se observou a formação de sarcocistos na musculatura esquelética (figuras 10 e 11).

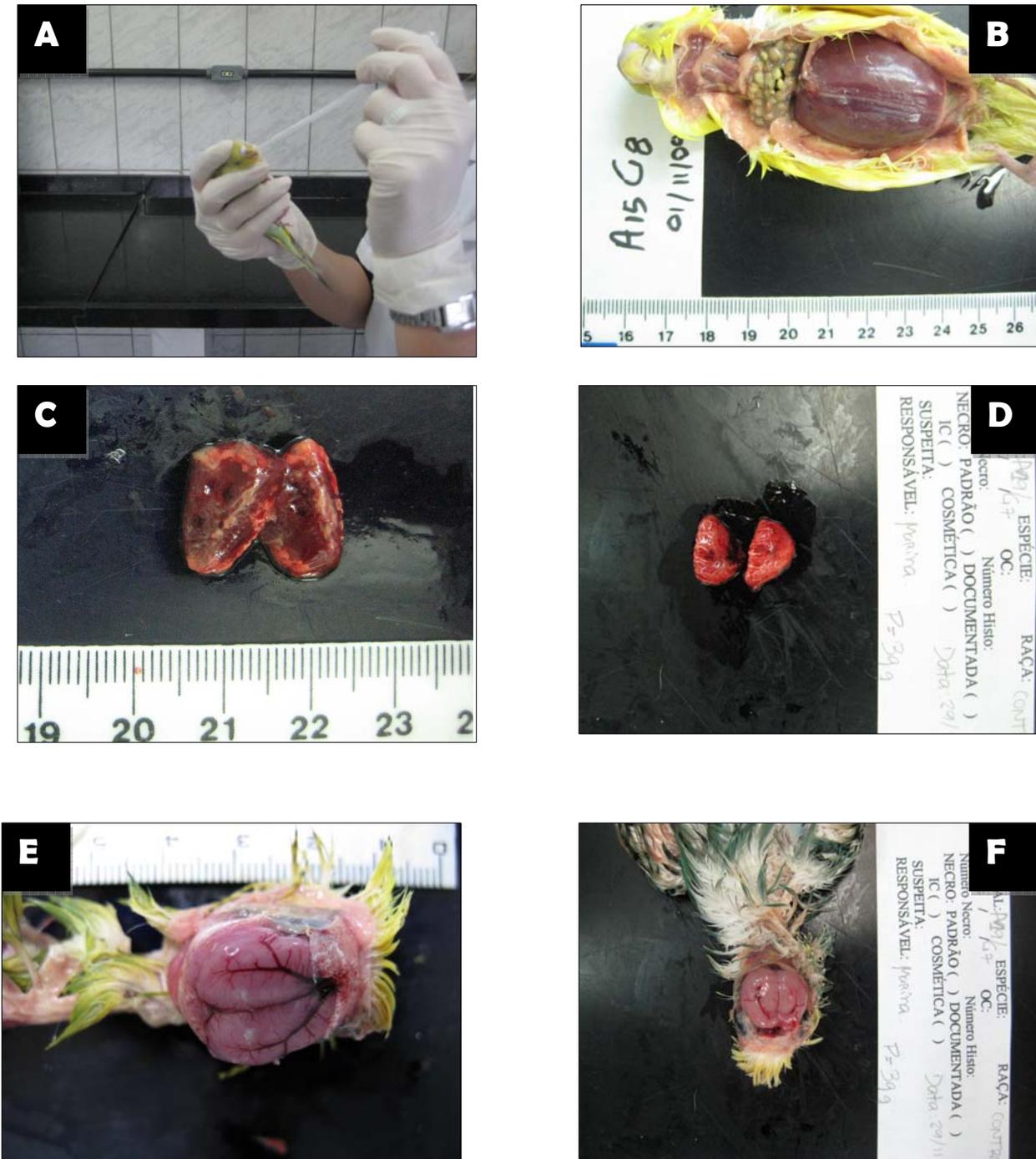


Figura 9 - A: Inoculação em periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*). Ingestão de esporocistos/ocistos por via oral. B: Periquito australiano infectado. Óbito acompanhado por boa conformação de musculatura peitoral e grande quantidade de alimento em ingluvío. C: Pulmão. Animal infectado. Edema, congestão e hemorragia severos e difusos na macroscopia e confirmados na microscopia. D: Pulmão. Animal controle. Pulmão de coloração rósea. E: Sistema Nervoso Central. Animal infectado. Congestão cerebral. F: Sistema Nervoso Central. Animal controle.

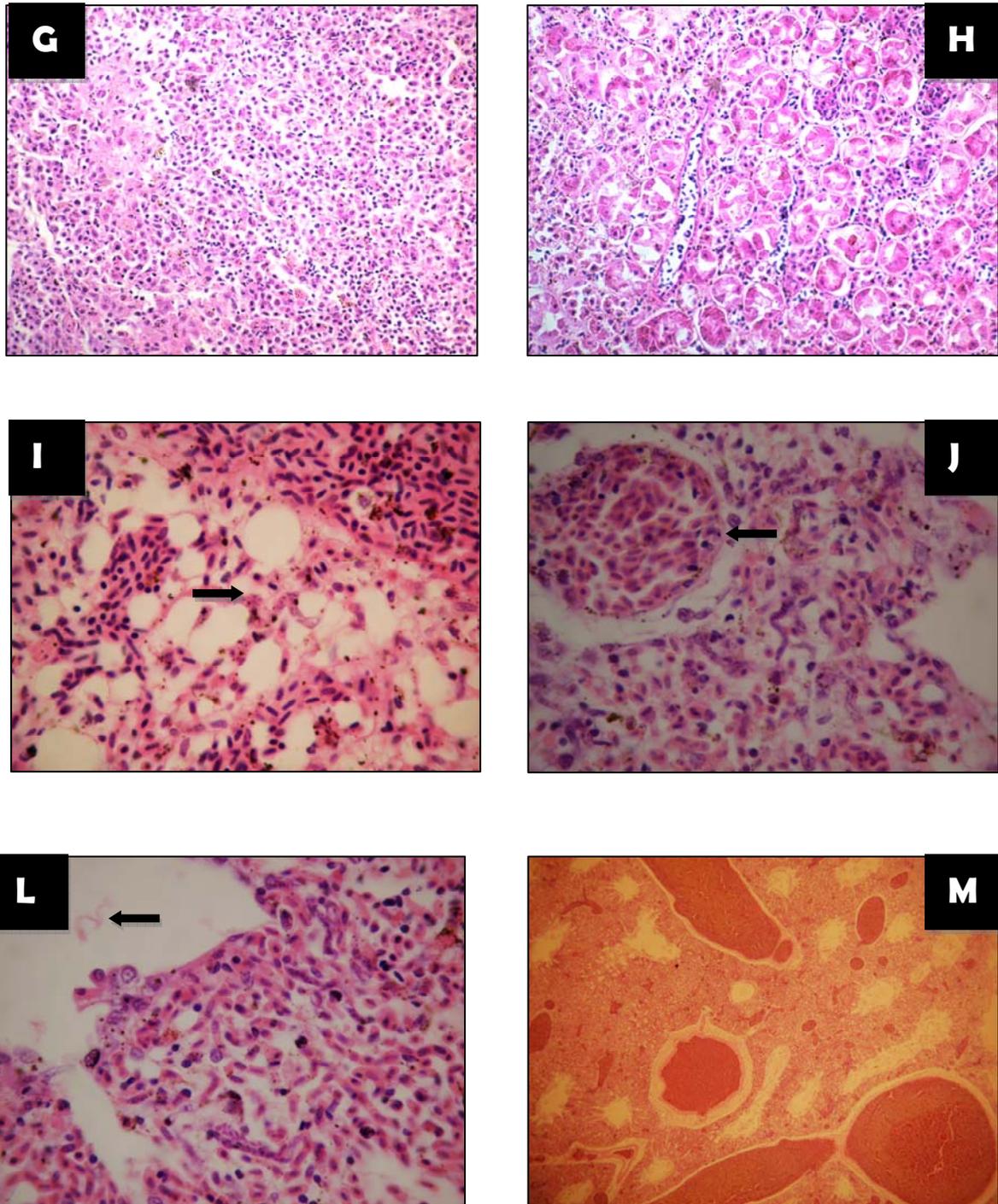


Figura 10 - G: Baço. Presença de histiocitose em animal infectado. HE. (400x). H: Rim. Necrose de coagulação multifocal e infiltrado inflamatório mononuclear. HE. (400x). I: Pulmão. Animal infectado. Esquizonte contendo merozoítos de *Sarcocystis falcatula* acometendo endotélio capilar pulmonar assumindo forma sinuosa (seta). HE. (1000x). J: Pulmão. Animal infectado. Inúmeros esquizontes contendo merozoítos de *Sarcocystis falcatula* acometendo endotélio capilar pulmonar. Vaso sanguíneo (seta) contendo grande quantidade de hemácia (congestão). HE. (1000x). L: Pulmão. Animal infectado. Inúmeros esquizontes contendo merozoítos de *Sarcocystis falcatula* acometendo endotélio capilar pulmonar. Presença de edema e fibrina livre em luz de parabrônquio pulmonar (seta). HE. (1000x). M: Pulmão. Congestão de vasos severa. HE. (40x).

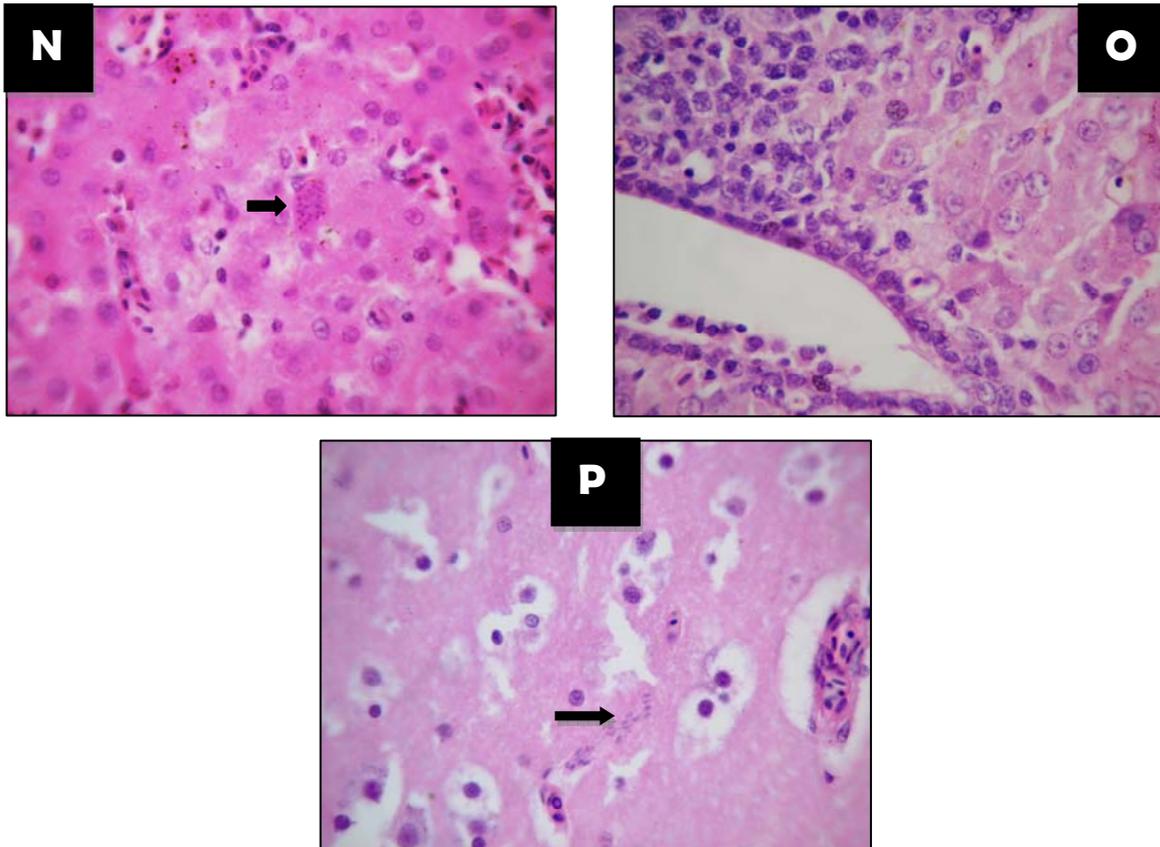


Figura 11 - N: Fígado. Presença de merontes em endotélio de capilar hepático (seta). HE. (1000x). O: Fígado. Infiltração inflamatória mononuclear em animal infectado. HE. (1000x). P: Sistema nervoso central. Presença de merontes em cérebro (seta). Vaso cerebral com grande quantidade de hemácias demonstrando congestão. HE. (1000x)

5.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS BALB/C NUDE (*Mus musculus*)

Nenhum dos animais inoculados apresentou sinais clínicos e permaneceram ativos durante toda a experimentação; e apresentaram normorexia e normodipsia até o momento da eutanásia.

Nenhuma lesão foi visualizada nos animais inoculados tanto na necropsia quanto na microscopia (figura 12).

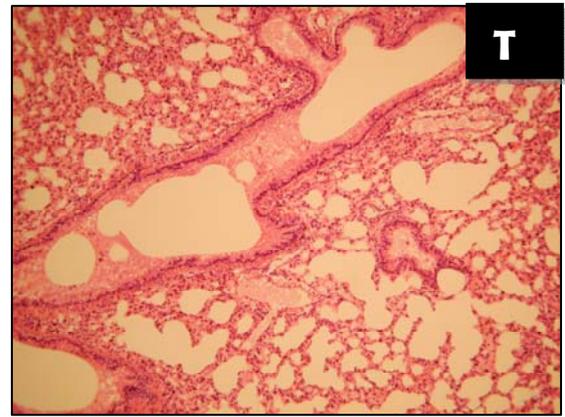
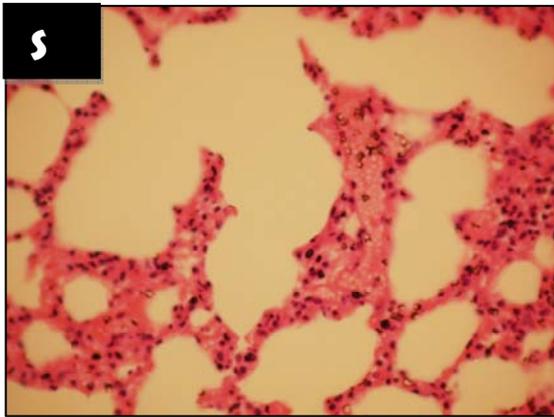
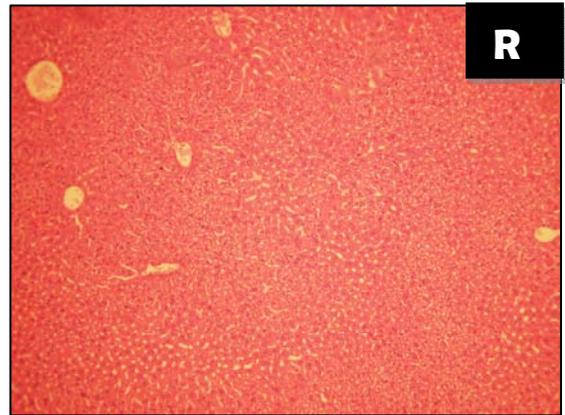
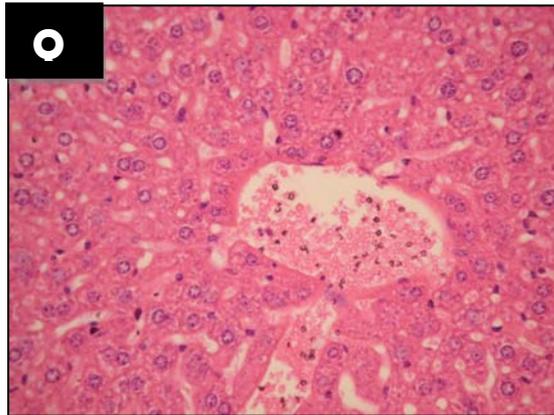


Figura 12 - Q: Fígado. Ausência de lesões que sugerem infecção por *Sarcocystis* sp. HE. (1000x). R: Fígado. Ausência de lesões que sugerem infecção por *Sarcocystis* sp. HE. (40x). S: Pulmão. Ausência de lesões que sugerem infecção por *Sarcocystis* sp. Paredes alveolares preservadas. HE. (100x). T: Pulmão. Ausência de lesões que sugerem infecção por *Sarcocystis* sp. Vaso sanguíneo com repleção leve. HE. (40x)

5.5 ANÁLISES MOLECULARES

Foram analisadas as 19 amostras de esporocistos de *Sarcocystis* spp. provenientes de gambás dos gêneros *Didelphis* oriundos do Estado de São Paulo (figura 13), conforme descrito no **item 4.1**.

Todas as amostras foram positivas pela PCR direcionada ao gene codificador de SAG-2, tendo sido gerados fragmentos entre 300 e 400 pares de bases (Figura 13).

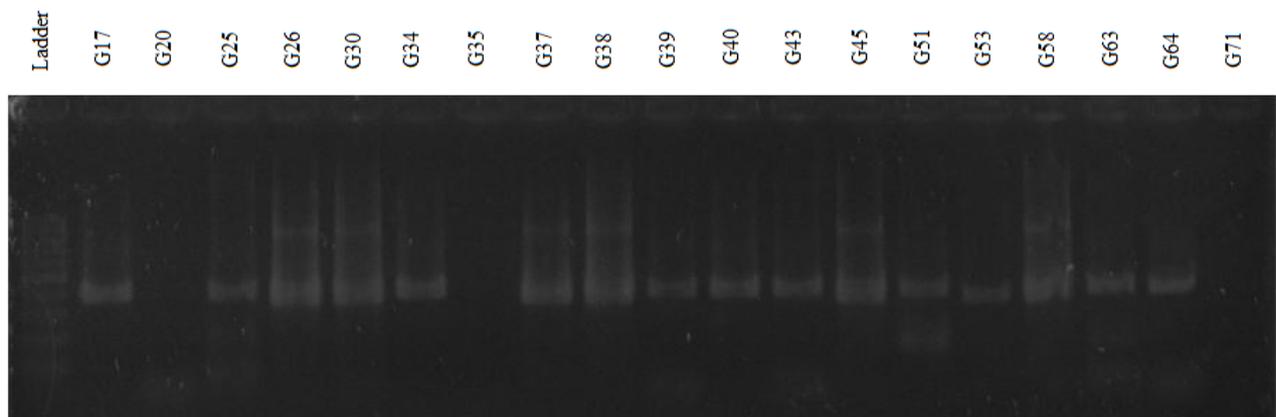


Figura 13 - PCR das 19 amostras onde a primeira coluna representa ladder e os demais são fragmentos que apresentam entre 300 e 400 pares de bases. As amostras G20, G35 e G71 foram positivas em uma segunda reação de PCR.

5.5.1 Análise das sequências

Foram determinadas as sequências de 318 nucleotídeos dos produtos gerados a partir da amplificação das amostras positivas pela PCR direcionada ao gene SAG-2.

Dois haplótipos foram determinados e estes diferem entre si em apenas uma substituição sinônima. As sequências determinadas revelaram elevada similaridade com sequências homólogas de *Sarcocystis falcatula* (quadro 3).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Sfa  ATGAAGACTC CCCGATGCAT TCTTGCCTGC GCTGCAGGCA TAGCAGCAGT TATTATTTC AGTTCTTTCT CCATCGCATC
Sne  ...G.....
04  .....
15  -----

      90     100     110     120     130     140     150     160
Sfa  GGCCCAAGTC GCAACAATTG CGTGACACA AGCTGGAGCG ACCCCGTGTTT CTCTGGGCC CGGTCAGAGC TTTGTGCTGA
Sne  .....AT.
04  .....
15  -----

      170     180     190     200     210     220     230     240
Sfa  ACTGCCAGGC ACCCTTTACC ACAGCGACGC CTGCCAACTT TCACACCCAC GCTTGTGCGG GCACCTGGTGC CAATTGTCAG
Sne  .....T.....
04  .....
15  -----

      250     260     270     280     290     300     310     320
Sfa  ACTCCTGAAA CGTACGCCAA GTTGTCTCA AAGGCGTCCA ACCACGTGTG GGTGAGTCCA GCGGACAGCA CTAGTACGTC
Sne  .A.....C.....G..A.
04  .....
15  .....G.....

      330     340     350     360     370     380     390     400
Sfa  TCATACCTGG ACGGCACCCG CTGCGAACCA GTTGTGCGGC AAAACTGTGT TTAGTGTGGG ATGCACCAGT ACAGGCGACC
Sne  .....
04  .....
15  .....

      410     420     430     440     450     460     470     480
Sfa  CAGCCGGGAT CTGCGCTGTC GACGTTACAG TTTCCAGCTC AGTGAAGACA GTCGCCTCTG GTGTCCTGCT TGCAATGTGT
Sne  .....C.....G.....T.....
04  .....
15  .....

      490     500
Sfa  TCACTCGCAT CTCTCACAGT GTTGTA
Sne  .....
04  .....
15  -----

```

Quadro 3 - Sequências das amostras apresentando elevada similaridade com sequências homólogas de *Sarcocystis falcatula*

6 DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS RECEBIDAS

O primeiro estudo envolvendo infecção experimental de esporocistos de *S. falcatula*-like provenientes de fezes de gambás obtidos no Estado de São Paulo foi realizado por Dubey et al. (2001c). Até então, apenas alguns relatos de casos foram publicados (ECCO et al., 2008). Este trabalho demonstrou que há no Estado de São Paulo a presença do agente responsável pela sarcosporidiose em aves conforme já foi relatado por Dubey et al. (2000c).

Ao exame de fezes, pode-se constatar que um alto percentual de gambás estava infectado. Porém, os resultados para a prevalência de positividade por *Sarcocystis* sp nas amostras estudadas (31%) ainda são menores que o relatado por Dubey (2000).

Pode-se sugerir que esta positividade reflita uma infecção por *Sarcocystis* sp altamente prevalente em gambás do Estado de São Paulo. Este valor pode ainda estar subestimado já que amostras com número de esporocistos muito reduzido podem ter sido consideradas negativas devido à baixa sensibilidade do método de diagnóstico.

O número de espécies de *Sarcocystis* sp em gambás é desconhecido. Sabe-se que existem ao menos três espécies de *Sarcocystis*: *S. falcatula*, *S. neurona*, *S. speeri*. Esse estudo demonstrou que *S. falcatula* parece ser a espécie mais prevalente nas amostras, porém não foi possível testar todas as amostras em camundongos Balb/c nude. As duas amostras testadas em camundongos não apresentaram resultados conclusivos. Como os camundongos Balb/c nude são animais mais resistentes à infecção que camundongos os *Knockout*, a dose de *Sarcocystis* de 500 esporocistos oferecida pode não ter sido suficiente para o sucesso da infecção já que nenhuma lesão e nenhum parasita foram encontrados no exame histopatológico.

Este resultado é particularmente importante ao notar-se que seis dos 34 gambás coletados no Zoológico de Sorocaba foram positivos. Os parasitas do tipo *S. falcatula*-like causam sarcosporidiose aguda em várias espécies de aves e relatos de casos de mortes de aves têm sido documentados em diversos zoológicos (ECCO et al., 2008).

Outras 13 amostras das 27 recebidas do DEPAVE também foram positivas. O DEPAVE presta atendimento veterinário com suporte laboratorial aos animais silvestres trazidos por munícipes, Corpo de Bombeiros, Polícia Ambiental, Centro de Controle de Zoonoses, entre outros; e tem entre outras funções a reabilitação e destinação adequada aos animais recebidos. Por ser tratar de um local que recebe variadas espécies de animais geralmente debilitados, inclusive aves, o número de quase 50% de positividade nas amostras obtidas do DEPAVE torna-se um fator preocupante para a sanidade dos animais locais. Além disso, os animais recebidos pelo DEPAVE são oriundos na sua maioria da cidade de São Paulo. A cidade de São Paulo apresenta um grande Zoológico (Fundação Parque Zoológico de São Paulo) além de diversos locais onde residem equinos como as diversas Hípicas e o Jockey Club. Essa alta positividade de *Sarcocystis* sp é igualmente importante para os equinos da cidade e faz-se importante conhecer a prevalência de *S. neurona* em amostras provenientes do DEPAVE.

O presente estudo sugere também que o *Sarcocystis* apresenta grande resistência em diferentes meios de conservação. Amostras que foram recebidas congeladas e mesmo aquelas não refrigeradas apresentaram aparentemente a mesma infectividade e patogenicidade que as amostras não congeladas, já que todas as congeladas e não refrigeradas levaram os animais a óbito. Dubey et al. (2002) realizaram um estudo onde esporocistos de *Sarcocystis neurona* foram submetidos a diferentes temperaturas ou a diferentes concentrações de desinfetantes de fórmula variada. Nesse estudo, utilizaram-se variações de altas temperaturas e a infectividade do parasita foi menor quanto maior a temperatura e o tempo de exposição. O aquecimento dos esporocistos a 50 °C por 60 minutos e a 55°C por 5 minutos não

impediu a infecção em camundongos KO enquanto que o aquecimento do parasita por 15 minutos a 55°C ou a 60 °C por um minuto geraram esporocistos não infectivos para camundongos KO. Foi utilizado ainda hipoclorito de sódio (10,20 e 100%), clorexidine 2%, Povidine 1%(PVPI), o-benzil-p-clorofenol 5%, fenol 12,56%, cloreto de benzalcônio 6% (amônia quaternária) e formalina a 10% porém estes se mostraram ineficazes na morte dos esporocistos. Adicionalmente, obteve-se resposta positiva com o uso de hidróxido de amônio 100% por uma hora, porém, após diluição a 10% por um período de 6 horas, este também se mostrou ineficaz. Os resultados obtidos por esse autor demonstram que o calor é o método mais eficiente para inibir a viabilidade dos esporocistos de *Sarcocystis neurona*, contudo nenhum estudo foi realizado acerca do uso de baixas temperaturas no controle da doença. O conhecimento acerca desse assunto é necessário já que a resistência do parasita no ambiente tem implicações negativas diretas no sucesso do controle e prevenção da doença.

Por conseguinte, a mortalidade de aves e as perdas econômicas devido à infecção em equinos podem não ser prevenidas a menos que os gambás sejam mantidos longe de zoológicos, aviários e equideoculturas.

6.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM PERIQUITOS AUSTRALIANOS (*MELOPSITTACUS UNDULATUS*)

O parasita presente nas amostras inoculadas levou a óbito 42% dos animais inoculados gerando um quadro de congestão e hemorragia pulmonar grave assim como o observado por Box e Smith (1982); Neill, Smith e Box (1989); Dubey et al. (1999); Villar et al. (2008); Ecco et al. (2008) e Godoy et al. (2009). A doença tem um curso agudo em torno de 10 a 15 dias.

Durante quase toda a fase de infecção, não se observou sinais clínicos nos animais inoculados, porém os que vieram a óbito iniciaram sintomas como prostração 24 horas antes do óbito e dispnéia foi constatada apenas de duas a três horas antes do óbito. Os animais foram submetidos apenas à inspeção para avaliação dos sinais clínicos a fim de se minimizar o stress na contenção e alterar o curso da doença, portanto, não foi feita auscultação e nem palpação e também não foi possível aferir a temperatura em nenhum dos animais.

As aves vinham a óbito apresentando boa conformação corporal, musculatura peitoral bem desenvolvida e a presença de alimento em ingluvío demonstrando o caráter agudo e agressivo da doença. Essa característica implica na dificuldade do diagnóstico ante-mortem da doença.

Alguns trabalhos foram realizados para encontrar o método mais eficiente de diagnóstico ante-mortem da doença. O teste de aglutinação direto foi desenvolvido para detecção de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona* em camundongos infectados experimentalmente obtendo 100% de sensibilidade e 90% de especificidade. Camundongos infectados com *Sarcocystis falcatula* e *S. speeri* não soroconvertem (LINDSAY; DUBEY, 2001). O diagnóstico mais utilizado para equino é o Immunoblot (GRANSTROM et al., 1993).

Para aves, alguns autores relataram o uso do teste de fluorescência para anticorpos (CRAY et al., 2005) mas este ainda não está padronizado e não é utilizado por todos os praticantes da medicina de animais silvestres. E ainda, tem-se reportado outro método para o diagnóstico da sarcosporidiose baseado na biópsia da musculatura esquelética (quadríceps ou musculatura peitoral) e dos pulmões (PAGE et al., 1992). Porém devido ao caráter agudo da doença, há uma grande dificuldade na execução da biópsia devido à necessidade de contenção física e química do animal gerando grande estresse e possivelmente a morte da ave. Consequentemente, o insucesso no diagnóstico e, portanto, no tratamento dos animais afetados com a forma aguda da doença enfatiza a importância do controle e prevenção desta enfermidade.

A contagem do parasita em câmara de Neubauer demonstrou a grande capacidade de replicação do parasita no tecido da parede intestinal do hospedeiro direto. A contagem máxima foi de 3,5 milhões de esporocistos/ocistos por ml de amostra e a mínima foi de mil esporocistos/ocistos por ml; sugerindo uma alta capacidade de contaminação ambiental pelo agente. Porter et al. (2001) utilizaram animais da espécie *Molothrus ater* infectados com *Sarcocystis falcatula* para infectar experimentalmente gambás da espécie *Didelphis aurita* e obtiveram uma taxa média de eliminação fecal de 25.900 esporocistos por dia por animal sendo o valor máximo apresentado por um dos animais de 647.500 esporocistos. Porém, são necessários estudos acerca da quantidade de esporocistos/ocistos que são de fato eliminados pelo *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* por meio das fezes para poder-se dimensionar com maior precisão a capacidade de contaminação ambiental.

Adicionalmente, além do controle da contaminação ambiental, do bom acondicionamento e preparação de alimentos, isolamento da ave do ambiente externo evitando criações *outdoor*, faz-se importante o controle dos vetores. Sabe-se que a ingestão de baratas ou de suas fezes pode levar à transmissão já que estes invertebrados são considerados vetores (CLUBB; FRENKEL, 1992).

Os resultados da infecção experimental em periquitos australianos apresentados são compatíveis com os relatados em literatura e por Dubey et al. (2000c). Após a infecção de periquitos australianos com amostras de *Sarcocystis* provenientes da Argentina, Dubey et al. (1999) observaram esquizontes em cérebro, coração, músculo esquelético, fígado, baço, rim e pulmão.

Neste trabalho, o pulmão foi o órgão mais severamente acometido e apresentou edema, congestão severa e hemorragia compatível com os resultados encontrados por Box e Smith (1987a) e Dubey et al. (1999, 2001b). Ainda outras duas características histopatológicas foram evidentes em todos os animais infectados, sendo elas hepato e esplenomegalia corroborando com os achados visualizados por Godoy et al. (2009).

Os mecanismos que tornam as aves do continente americano mais resistentes que as aves do Velho Mundo ainda não é bem compreendido. Por isso estudos sobre a resistência ao parasita e a relação parasita-hospedeiro ainda precisam ser mais explorados.

Não foi possível observar sinais clínicos em todas as aves inoculadas. Os sinais clínicos visualizados foram associados à infecção do trato respiratório (dispnéia severa) associado a sintomas inespecíficos como letargia e prostração. Esses mesmos sintomas foram observados por Jacobson et al. (1984), Clubb e Frenkel (1992) e por Siegal-Willott et al. (2005).

A pomba doméstica (*Columba livia*) é espécie sinantrópica e de fácil reprodução no meio urbano. Considerando-se que *S. falcatula* é infectivo para aves da ordem Columbiformes e devido a relativa facilidade em encontrar-se pombas domésticas mortas que podem servir de alimento para gambás, acredita-se que esses animais sejam hospedeiros intermediários que podem auxiliar na compreensão acerca da prevalência de *S. falcatula* do entorno da cidade de São Paulo.

6.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS BALB/C NUDE (*MUS MUSCULUS*)

O ciclo de vida do *S. neurona* não está completamente definido (MACKAY et al., 2000; MANSFIELD et al., 2001), uma vez que seus hospedeiros intermediários não são conhecidos segundo Dubey et al. (2001a). Os conhecimentos adquiridos sobre a EPM no Brasil são recentes. Em 1986, Barros et al. relataram um caso de mieloencefalite por protozoários em um equino de 10 anos de idade, na região sul do Brasil (BARROS; DE BARROS; DOS SANTOS, 1986). Posteriormente, a presença de esquizontes e merozoítos de *Sarcocystis*, em cortes histológicos de sistema nervoso, foi associada a sinais de ataxia em equinos (MASRI; ALDA; DUBEY, 1992).

Os sinais clínicos podem estar relacionados à localização das lesões no sistema nervoso nos animais afetados. Ataxia, incoordenação motora e fraqueza muscular são os sinais mais comuns (MASRI; ALDA; DUBEY, 1992; FENGER et al., 1997; MACKAY, 1997).

Até o ano de 1991, quando o *S. neurona* foi isolado, o diagnóstico baseava-se nos sinais clínicos e na exclusão de outras doenças que acometem o sistema nervoso dos equinos, como as mieloencefalites bacterianas e virais, as meningites, os traumas e o estreitamento do canal cervical (MOORE et al., 1997). Posteriormente, o cultivo do parasita possibilitou o desenvolvimento de testes de identificação de anticorpos específicos no soro e no líquido dos animais suspeitos, que atualmente têm sido utilizados nas investigações epidemiológicas e como auxílio diagnóstico em casos de EPM (BENTZ; GRANSTROM; STAMPER, 1997). Hoje ainda é possível o diagnóstico baseado em bioensaios utilizando camundongos imunodeficientes. O diagnóstico da doença é importante para a escolha do tratamento mais adequado. Adaptações da conduta terapêutica para a toxoplasmose humana consistiram as primeiras tentativas de tratamentos para os casos de EPM. O protocolo envolve a administração de uma combinação de sulfonamidas/trimetoprim e pirimetamina por 90 dias (MACKAY, 1997).

As inoculações experimentais em camundongos foram realizadas antes dos resultados de PCR. Os resultados obtidos na inoculação experimental em camundongos Balb/c nude podem ser considerados inconclusivos. Os animais não apresentaram sintomas nem lesão na necropsia e na microscopia. É importante salientar que estes animais são mais resistentes que os camundongos *Knockout* à infecção por *Sarcocystis* e por isso precisam de uma dose infectante maior. Os animais receberam apenas 500 esporocistos para que houvesse uma padronização do tamanho do inóculo utilizado nas inoculações tanto em periquitos como em camundongos. Dubey e Lindsay (1998) utilizaram um inóculo de pelo menos $1,5 \times 10^5$ esporocistos para camundongos nude e de 1×10^5 para camundongos *Knockout*. Estudos envolvendo infecção experimental em camundongos com amostras

provenientes do Brasil são escassos e pouco se conhece acerca dos hospedeiros intermediários de *Sarcocystis* sp em especial da espécie *Sarcocystis neurona* na fauna brasileira.

Trabalhos envolvendo a infecção experimental de esporocistos de amostras fecais de gambás em equinos têm sido publicados e geram informações bastante relevantes no que tange a temática aqui proposta elucidando melhor o envolvimento de gambás na EPM (FURR et al., 2006; ELITSUR et al., 2007; WITONSKY et al., 2008). Contudo, nenhum deles foi realizado no Brasil ou com amostras brasileiras.

A EPM no Brasil tem propiciado perdas para a equideocultura. Trata-se de uma doença infecciosa, mas não contagiosa endêmica nas Américas, tendo os equinos como hospedeiros acidentais, portanto, sendo de grande importância econômica (RADOSTITS et al., 2002). A prevalência e patogenicidade da doença para equinos ainda precisa ser melhor avaliada no Brasil.

6.4 ANÁLISES MOLECULARES

Todas as amostras estudadas obtiveram resultados positivos para PCR para *Sarcocystis* sp. O *primer* utilizado para o gene de antígeno de superfície SAG2 mostrou-se eficaz na identificação desse parasita. Após sequenciamento, pode-se diferenciar a espécie em *S. falcatula*. As amostras G20, G35 e G71 foram negativas na PCR inicialmente, porém repetindo-se a reação elas apresentaram-se positivas para *S. falcatula*.

No Brasil, poucos estudos foram conduzidos envolvendo a detecção dos hospedeiros intermediários para *S. neurona*. Por isso, faz-se importante conhecer os hospedeiros intermediários do *S. neurona* para melhor compreensão da epidemiologia da doença no país. Sem esses dados é difícil discursar sobre o que poderia levar todas as amostras presentes nesse estudo a serem caracterizadas

apenas como *S. falcatula*. Havendo um pequeno número de espécies envolvidas, possivelmente gera uma maior dificuldade em animais do gênero *Didelphis* alimentarem-se de carcaças infectadas por *Sarcocystis neurona*, e de forma contrária, entende-se que há uma facilidade de existência de carcaças de animais da Ordem Columbiformes, Passeriformes ou Psitaciformes infectadas pelo parasita *S. falcatula* para consumo.

Este gene mostrou-se extremamente bem conservado e geneticamente idêntico nas cadeias de *Sarcocystis neurona* em diferentes hospedeiros intermediários estudados por Rejmanek et al. (2010). A criação de um *primer* que se amplifica indiscriminadamente tanto *Sarcocystis neurona* quanto *Sarcocystis falcatula* é um procedimento que facilita a identificação com o sequenciamento tornando o processo menos oneroso.

Este trabalho possibilitou melhor compreensão da participação dos gambás na sarcosporidiose aviária, da infectividade e patogenicidade desse agente, da diferenciação molecular entre outras espécies de *Sarcocystis* transmitidas por gambás, bem como da resistência a diferentes meios de conservação demonstrando a importância dessa doença no Estado de São Paulo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A crescente fragmentação dos remanescentes de mata nos arredores da cidade tem causado a aproximação dos gambás às áreas urbanas. A restrição de sua área domiciliar, a redução de seus predadores naturais como aves de rapina e felinos, o sucesso reprodutivo da espécie cujos filhotes permanecem protegidos na bolsa e a grande facilidade de adaptação ao meio urbano são os principais motivos do aumento da população de gambás na cidade de São Paulo. Associado a isso, o estreito contato associada ao comportamento nômade desses animais facilitou a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes.

A sarcosporidiose aviária é uma doença fatal que possui impacto negativo em populações de aves principalmente de cativeiro. Por isso, maiores estudos acerca da sarcosporidiose aviária tanto em populações de aves de vida livre quanto de cativeiro se fazem necessários para dimensionar a sarcosporidiose aviária no Brasil.

Os gambás (*Didelphis* sp) se mostraram portadores de *Sarcocystis falcatula* pois periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) infectados com esporocistos de *Sarcocystis* sp provenientes de fezes de gambás vieram a óbito observando-se merozoitos e esquizontes nos tecidos dos animais infectados. Técnicas de imunistoquímica são necessárias para elucidar e avaliar melhor a doença levando a um diagnóstico definitivo.

A infecção experimental em camundongo Balb/c nude foi inconclusiva e há, portanto, a necessidade de maiores estudos com relação à infectividade e patogenicidade do *Sarcocystis* sp, utilizando-se preferencialmente camundongos *Gamma Interferon Knockout* – KO já que são animais imunodeficientes mais sensíveis ao agente.

Sarcocystis sp é um agente bastante resistente no ambiente e o uso de desinfetantes comuns tem se mostrado ineficaz. O tratamento de amostras com

desinfetantes comuns em estudos nos EUA mostrou que a infectividade deste parasita se mantém, sendo o calor o método de desinfecção mais eficaz. Assim, estudos sobre a resistência do *Sarcocystis* sp à desinfecção e à diferentes temperaturas em amostras brasileiras são necessárias para permitir o maior controle e prevenção da doença. Por meio da temática abordada neste estudo, é possível afirmar que atualmente a melhor forma de evitar a doença é o controle e a prevenção sendo que a maneira mais eficiente de prevenção é evitar o contato das fezes do gambá com os alimentos dos animais e a contaminação ambiental de recintos.

Para a prevenção da sarcosporidiose em aves convém a exposição de animais em recintos fechados por vidro que impeça o acesso de gambás. No caso da EPM, é importante retirar o alimento de comedouros durante o período noturno e higienizá-los diariamente antes da reposição do alimento. A desinfecção ambiental por uso do calor também é fundamental em comedouros e bebedouros além dos recintos e material utilizados para tratar os animais.

As análises moleculares demonstraram que o *primer* para o gene de antígeno de superfície SAG2 mostrou-se bastante eficiente na diferenciação entre as espécies de *Sarcocystis* apresentando pequena variação gênica entre as amostras de *Sarcocystis falcatula*.

Finalmente, o conhecimento desta enfermidade associado à educação sanitária representam a peça chave para possibilitar a manutenção de aves do Velho Mundo em cativeiro auxiliando na conservação de espécies ameaçadas e impedir perdas econômicas na equideocultura.

REFERÊNCIAS

- BACCARIN, R. Y. A.; FERNANDES, W. R.; VINCENZI, R. C.; RÊGO, E.; SILVA, L. C. L. C. Estudo da terapia e evolução clínica da mieloencefalite protozoária eqüina. **Veterinária Notícias**, v. 7, n. 2, p. 79-85, 2001.
- BARROS, C. S. L.; DE BARROS, S. S.; DOS SANTOS, M. N. Equine protozoal myeloencephalitis in southern Brazil. **Veterinary Records**, v. 119, n. 11, p. 283-284, 1986.
- BENTZ, B. G.; GRANSTROM, D. E.; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in a county of southeastern Pennsylvania. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 4, p. 517-518, 1997.
- BERNARD, W. Maybe it isn't EPM. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 18, n. 5, p. 304-305, 1998.
- BLYTHE, L. L.; GRANSTROM, D. E.; HANSEN, D. E.; WALKER, L. L.; BARTLETT, J.; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Oregon. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 4, p. 525-527, 1997.
- BOX, E. D.; DUSZYNSKI, D. W. Experimental transmission of *Sarcocystis* from icterid birds to sparrows and canaries by sporocysts from the opossum. **Journal of Parasitology**, v. 64, n. 4, p. 682-688, 1978.
- BOX, E. D.; SMITH, J. H. The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. **Journal of Parasitology**, v. 68, n. 4, p. 668-673, 1982.
- BOX, E. D.; MEIER, J. L.; SMITH, J. H. Description of *Sarcocystis falcatula* stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. **Journal of Protozoology**, v. 31, n. 4, p. 521-524, 1984.
- BROWN, B. E. **Atlas of new world marsupials** Fieldiana Zoology: New Series, 2004, v.102.
- CABRERA, A.; YEPES, J. **Mamíferos sud americanos. Vida, costumbres y descripción**. Buenos Aires: Comp. Argent., 1960. 370 p.
- CÁRCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Tamanho corporal em populações naturais de *Didelphis* (Mammalia: Marsupialia) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 3, p. 461-469, 1999.
- CÁRCERES, N. C. Diet of three didelphid marsupials (Mammalia, Didelphimorphia) in southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 69, n. 6, p. 430-433, 2004.

CÁRCERES, N. C.; MONTEIRO FILHO, E. Food habits home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a forest fragment of southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 36, n. 2, p. 85-92, 2001.

CERQUEIRA, R. The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae) **Journal of Biogeography**, v. 12, n., p. 135-145, 1985.

CERQUEIRA, R.; LEMOS, B. Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae) **Mammalia**, v. 64, n. 3, p. 319-327, 2000.

CHEREN, J. J.; GRAIPEL, M. E.; MENEZES, M. E.; SOLDATELLI, M. Observações sobre a biologia do gambá (*Didelphis marsupialis*) na Ilha de Ratonés Grande, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v. 9, n. 2, p. 47-56, 1996.

CLUBB, S. L.; FRENKEL, J. K. *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease in psittacine birds. **Journal of Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 116-124, 1992.

CRAY, C.; ZIELEZIENSKI-ROBERTS, K.; BONDA, M.; STEVENSON, R.; NESS, R.; CLUBB, S.; MARSH, A. Serologic Diagnosis of Sarcocystosis in Psittacine Birds: 16 Cases. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 19, n. 3, p. 208-215, 2005.

DAME, J. B.; MACKAY, R. J.; YOWELL, C. A.; CUTLER, T. J.; MARSH, A.; GREINER, E. C. *Sarcocystis falcatula* from passerine and psittacine birds: synonymy with *Sarcocystis neurona*, agent of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 930-935, 1995.

DUBEY, J. P. Prevalence of *Sarcocystis* species sporocysts in wild-caught opossums (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 705-710, 2000.

DUBEY, J. P.; DAVIS, S. W.; SPEER, C. A.; BOWMAN, D. D.; DE LAHUNTA, A.; GRANSTROM, D. E.; TOPPER, M. J.; HAMIR, A. N.; CUMMINGS, J. F.; SUTER, M. M. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 212-218, 1991b.

DUBEY, J. P.; KERBER, C. E.; GRANSTROM, D. E. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 7, p. 970-972, 1999.

DUBEY, J. P.; KERBER, C. E.; LINDSAY, D. S.; KASAI, N.; PENA, H. F. The South American opossum, *Didelphis marsupialis*, from Brazil as another definitive host for *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999. **Journal of Parasitology**, v. 121 Pt 6, n., p. 589-594, 2000b.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Isolation in immunodeficient mice of *Sarcocystis neurona* from opossum (*Didelphis virginiana*) faeces, and its differentiation from *Sarcocystis falcatula*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 1823-1828, 1998.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. *Sarcocystis speeri* N. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the opossum (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 903-909, 1999.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; KERBER, C. E.; KASAI, N.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; ROSENTHAL, B. M. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 295-304, 2001b.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; REZENDE, P. C.; COSTA, A. J. Characterization of an unidentified *Sarcocystis falcatula*-like parasite from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 538-544, 2000c.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ROSENTHAL, B. M.; KERBER, C. E.; KASAI, N.; PENA, H. F.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; GENNARI, S. M. Isolates of *Sarcocystis falcatula*-like organisms from South American opossums *Didelphis marsupialis* and *Didelphis albiventris* from Sao Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1449-1453, 2001c.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SAVILLE, W. J.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E.; SPEER, C. A. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 89-131, 2001a.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; VENTURINI, L.; VENTURINI, C. Characterization of *Sarcocystis falcatula* isolates from the Argentinian opossum, *Didelphis albiventris*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 260-263, 2000a.

DUBEY, J. P.; PORTER, S. L.; HATTEL, A. L.; KRADEL, D. C.; TOPPER, M. J.; JOHNSON, L. *Sarcocystis*-associated clinical encephalitis in a golden eagle (*Aquila chrysaetos*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 2, p. 233 - 236, 1991a.

DUBEY, J.P.; SAVILLE, W.; SREEKUMAR, C.; SHEN, S.; LINDSAY, O.; PENA, H.; VIANNA, M.; GENNARI, S.; REED, S. Effects of high temperature and disinfectants on the viability of *Sarcocystis neurona* sporocysts. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1252-1254, 2002.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and man**. . Boca Raton. CRC Press, 1989. 215 p.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; LINDSAY, D. S. Isolation of a third species of *Sarcocystis* in immunodeficient mice fed feces from opossums (*Didelphis virginiana*) and its differentiation from *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 6, p. 1158-1164, 1998.

- DUBEY, J. P.; VENTURINI, L.; VENTURINI, C.; BASSO, W.; UNZAGA, J. Isolation of *Sarcocystis falcatula* from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 239-244, 1999.
- ECCO, R.; LUPPI, M.; MALTA, M.; ARAÚJO, M.; GUEDES, R.; SHIVAPRASAD, H. An outbreak of sarcocystosis in psittacines and a pigeon in a zoological collection in Brazil. **Avian Disease**, v. 52, n. 4, p. 706-710, 2008.
- EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics: the Central Neotropics (Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil)**. Chicago, London: The University of Chicago Press, 1999. 609 p.
- ELITSUR, E.; MARSH, A. E.; REED, S. M.; DUBEY, J. P.; OGLESBEE, M. J.; MURPHY, J. E.; SAVILLE, W. J. Early migration of *Sarcocystis neurona* in ponies fed sporocysts. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 5, p. 1222-1225, 2007.
- ELSHEIKHA, H. M.; MANSFIELD, L. S. *Sarcocystis neurona* major surface antigen gene 1 (SAG1) shows evidence of having evolved under positive selection pressure. **Parasitology Research**, v. 94, n. 6, p. 452-459, 2004.
- EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: a field guide** Chicago and London: The University of Chicago Press, 1997
- FAYER, R.; MAYHEW, I. G.; BAIRD, J. D.; DILL, S. G.; FOREMAN, J. H.; FOX, J. C.; HIGGINS, R. J.; REED, S. M.; RUOFF, W. W.; SWEENEY, R. W.; ET AL. Epidemiology of equine protozoal myeloencephalitis in North America based on histologically confirmed cases. A report. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, n. 2, p. 54-57, 1990.
- FENGER, C. K.; GRANSTROM, D. E.; GAJADHAR, A. A.; WILLIAMS, N. M.; MCCRILLIS, S. A.; STAMPER, S.; LANGEMEIER, J. L.; DUBEY, J. P. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). **Veterinary Parasitology**, v. 68, n. 3, p. 199-213, 1997.
- FINNIE, E. P. Monotremes and Marsupials (Anatomy) In: Fowler, M. E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine**. Estados Unidos: Saunders Company, 1986, p.558-560.
- FONSECA, G. A. B.; HERRMANN, G.; LEITE, Y. L. R.; MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; PATTON, J. L. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. **Occasional papers: Conservation Biology**, v. 4, n., p. 1-38, 1996.
- FRENKEL, J. K. Tissue-dwelling intracellular parasites: Infection and immune responses in the mammalian host to *Toxoplasma*, *Sarcocystis* and *Trichinella* . **American Zoologist**, v. 29, n. 2, p. 455-467, 1989.
- FURR, M.; MCKENZIE, H.; SAVILLE, W. J.; DUBEY, J. P.; REED, S. M.; DAVIS, W. Prophylactic administration of ponazuril reduces clinical signs and delays

seroconversion in horses challenged with *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 637-643, 2006.

GARDNER, A. L. Order Didelphimorfia. In: Wilson, D. E. e Reeder, D. M. (Ed.). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Baltimore: Te Johns Hopkins University Press, 2005. v.1, p.3-18.

GODOY, S. N.; DE PAULA, C. D.; CUBAS, Z. S.; MATUSHIMA, E. R.; CATAO-DIAS, J. L. Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in captive psittacine birds in Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 1, p. 18-23, 2009.

GRANSTROM, D. E. Recent advances in the laboratory diagnosis of equine parasitic diseases. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 11, n. 3, p. 437-442, 1995.

GRANSTROM, D. E.; DUBEY, J. P.; DAVIS, S. W.; FAYER, R.; FOX, J. C.; POONACHA, K. B.; GILES, R. C.; COMER, P. F. Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 1, p. 88-90, 1993.

GRANSTROM, D. E.; GILES, R. C., JR.; TUTTLE, P. A.; WILLIAMS, N. M.; POONACHA, K. B.; PETRITES-MURPHY, M. B.; TRAMONTIN, R. R.; SWERCZEK, T. W.; HONG, C. B.; REZABEK, G. B.; ET AL. Immunohistochemical diagnosis of protozoan parasites in lesions of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, n. 1, p. 75-77, 1991.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 5, p. 633-639, 2001.

GUIMARÃES, M. B.; MAEDA, E. H.; MADEIRA, A. M. B. N.; MATUSHIMA, E. R. **Ocorrência de Sarcocystis sp em Euphonia sp: Relato de caso**. In: III CONGRESSO E VIII ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 1999, São Pedro. Anais. São Pedro: ABRAVAS, 1999. p. 30.

HERSHKOVITZ, P. The South American gracile mouse opossums, genus *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989 (Marmosidae, Marsupialia): a taxonomic review with notes on general morphology and relationships. **Fieldiana Zoology**, v. 70, n. New Series p. 1-56, 1992.

HILLYER, E. V.; ANDERSON, M. P.; GREINER, E. C.; ATKINSON, C. T.; FRENKEL, J. K. An outbreak of *Sarcocystis* in a collection of psittacines. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 4, p. 434-445, 1991.

HOWE, D. K. Initiation of a *Sarcocystis neurona* expressed sequence tag (EST) sequencing project: a preliminary report. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 233-239, 2001.

HOWE, D.; GAJI, R.; MARSH, A.; PATIL, B.; SAVILLE, W.; LINDSAY, D.; DUBEY, J.; GRANSTROM, D. Strains of *Sarcocystis neurona* exhibit differences in their surface antigens, including the absence of the major surface antigen SnSAG1. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 6, p. 623-631, 2008.

HOWE, D.; GAJI, R.; MROZ-BARRETT, M.; GUBBELS, M.; STRIEPEN, B.; STAMPER, S. *Sarcocystis neurona* merozoites express a family of immunogenic surface antigens that are orthologues of the *Toxoplasma gondii* surface antigens (SAGs) and SAG-related sequences. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1023-1033, 2005.

HUNSAKER, D. **The Biology of Marsupials**. . Estados Unidos: Academic Press, 1977.

HYUN, C.; GUPTA, G. D.; MARSH, A. E. Sequence comparison of *Sarcocystis neurona* surface antigen from multiple isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 1-2, p. 11-20, 2003.

JACOBSON, E. R.; GARDINER, C. H.; NICHOLSON, A.; PAGE, C. D. *Sarcocystis* encephalitis in a cockatiel. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 185, n. 8, p. 904-906, 1984.

JUNG, C.; LEE, C. Y.; GRIGG, M. E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal of Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 285-296, 2004.

LANGE, R. B.; JABLONSKI, E. **Mammalia do Estado do Paraná, Marsupialia**, 1998, v.43. 15-224 p. (Estudos de Biologia).

LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; STALLINGS, J. R. Diet and vertical space use of three sympatric opossums in a Brazilian Atlantic forest reserve. **Journal of Tropical Ecology**, v. 12, n., p. 435-440, 1996.

LEMOS, B.; CERQUEIRA, R. Morphological differentiation in the white-eared opossum group (Didelphidae: *Didelphis*). **Journal of Mammalogy**, v. 83, n. 2, p. 354-369, 2002.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for the detection of antibodies to *Sarcocystis neurona* in experimentally infected animals. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 179-186, 2001.

LINDSAY, D. S.; DYKSTRA, C. C.; WILLIAMS, A.; SPENCER, J. A.; LENZ, S. D.; PALMA, K.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. Inoculation of *Sarcocystis neurona* merozoites into the central nervous system of horses. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 157-163, 2000.

LINDSAY, D. S.; THOMAS, N. J.; DUBEY, J. P. Biological characterisation of *Sarcocystis neurona* isolated from a Southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 617-624, 2000.

MACKAY, R. J. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 13, n. 1, p. 79-96, 1997.

MACKAY, R. J.; DAVIS, S. W.; DUBEY, J. P. Equine protozoal myeloencephalitis. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.**, v. 14, n. 10, p. 1359-1366, 1992.

MACKAY, R. J.; GRANSTROM, D. E.; SAVILLE, W. J.; REED, S. M. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 16, n. 3, p. 405-425, 2000.

MACRUZ, R.; LENCI, O.; ISHIZUKA, M. M.; MIGUEL, O.; CUNHA, R. A. F. Toxoplasmose em eqüinos PSI: estudo sorológico. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 7, p. 277-282, 1975.

MANSFIELD, L. S.; SCHOTT, H. C., 2ND; MURPHY, A. J.; ROSSANO, M. G.; TANHAUSER, S. M.; PATTERSON, J. S.; NELSON, K.; EWART, S. L.; MARTENIUK, J. V.; BOWMAN, D. D.; KANEENE, J. B. Comparison of *Sarcocystis neurona* isolates derived from horse neural tissue. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 167-178, 2001.

MASRI, M. D.; ALDA, J. L.; DUBEY, J. P. *Sarcocystis neurona*-associated ataxia in horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 3-4, p. 311-314, 1992.

MONDRAGON, R.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 639-641, 1998.

MOORE, L. A.; JOHNSON, P. J.; MESSER, N. T.; KLINE, K. L.; CRUMP, L. M.; KNIBB, J. R. Management of headshaking in three horses by treatment for protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Records**, v. 141, n. 11, p. 264-267, 1997.

NEILL, P. J.; SMITH, J. H.; BOX, E. D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). IV. Ultrastructure of developing, mature and degenerating sarcocysts. **Journal of Protozoology**, v. 36, n. 4, p. 430-437, 1989.

NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of the World**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1999, v.1

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* spp **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, n. 1-2, p. 27-32, 1980.

PAGE, C. D.; SCHMIDT, R. E.; ENGLISH, J. H.; GARDINER, C. H.; HUBBARD, G. B.; SMITH, G. C. Antemortem diagnosis and treatment of sarcocystosis in two species of psittacines. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, n. 1, p. 77-85, 1992.

PETRIDES, G. A. Sex and age determination in the opossum. **Journal of Mammalogy**, v. 30, n. 4, p. 364-378, illust, 1949.

PORTER, R. A.; GINN, P. E.; DAME, J. B.; GREINER, E. C. Evaluation of the shedding of *Sarcocystis falcatula* sporocysts in experimentally infected Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 313-319, 2001.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clinica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. 1737 p.

REJMANEK, D.; MILLER, M. A.; GRIGG, M. E.; CROSBIE, P. R.; CONRAD, P. A. Molecular characterization of *Sarcocystis neurona* strains from opossums (*Didelphis virginiana*) and intermediate hosts from Central California. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 20-29, 2010.

REJMANEK, D.; MILLER, M.; GRIGG, M.; CROSBIE, P.; CONRAD, P. Molecular characterization of *Sarcocystis neurona* strains from opossums (*Didelphis virginiana*) and intermediate hosts from Central California. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 20-29, 2010.

RINALDI, D. P.; SILVA, G. C. O.; GUIMARÃES, M. B.; MADEIRA, A. M. B. N.; MATUSHIMA, E. R. **Ocorrência de Sarcocystis sp em Saltator similis: Relato de caso**. In: VI CONGRESSO E XI ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 2002, Guarapari. Anais. Guarapari: ABRAVAS, 2002. p. 62.

ROONEY, J.; PRICKETT, M.; DELANEY, F.; CROWE, M. Focal myelitis-encephalitis in horses. **Cornell Veterinarian**, v. 60, n. 3, p. 494-501, 1970.

ROSENTHAL, B. M.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Relationships among *Sarcocystis* species transmitted by New World opossums (*Didelphis* spp.). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 133-142, 2001.

ROSSANO, M. G.; KANEENE, J. B.; MARTENIUK, J. V.; BANKS, B. D.; SCHOTT, H. C.; MANSFIELD, L. S. The seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in Michigan equids. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 48, n. 2, p. 113-128, 2001.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. Recognition of cyclic transmission of *Sarcocystis muris* by cats. **Journal of Infectious Diseases**, v. 133, n. 4, p. 409-418, 1976.

SANTORI, R. T.; MORAES, D. A.; CERQUEIRA, R. Diet composition of *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Marsupialia, Didelphoidea) in the Southeastern Brasil. **Mammalia**, v. 59, n. 4, p. 511-516, 1995.

SAVILLE, W. J.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E.; HINCHCLIFF, K. W.; KOHN, C. W.; WITTUM, T. E.; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in

horses residing in Ohio. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 4, p. 519-524, 1997.

SIEGAL-WILLOTT, J. L.; POLLOCK, C. G.; CARPENTER, J. W.; NIETFELD, J. Encephalitis Caused by *Sarcocystis falcatula*-like Organisms in a White Cockatoo (*Cacatua alba*) **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 19, n. 1, p. 19-24, 2005.

SILVA, F. **Mamíferos silvestres**. Rio Grande do Sul: Fundação Zoobotânica do Sul, 1994. 246 p.

SMITH, J. H.; CRAIG, T. M.; DILLARD, E. A.; NEILL, P. J.; JONES, L. P. Naturally occurring apicomplexan acute interstitial pneumonitis in thick-billed parrots (*Rhynchopsitta pachyrhyncha*). **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 2, p. 285-288, 1990.

SMITH, J. H.; MEIER, J. L.; NEILL, P. J.; BOX, E. D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* in the budgerigar. I. Early pulmonary schizogony. **Laboratory Investigation**, v. 56, n. 1, p. 60-71, 1987b.

SMITH, J. H.; MEIER, J. L.; NEILL, P. J.; BOX, E. D. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* in the budgerigar. II. Pulmonary pathology. **Laboratory Investigation**, v. 56, n. 1, p. 72-84, 1987a.

TADROS, W.; LAARMAN, J. J. Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid coccidia. **Advances in Parasitology**, v. 20, n., p. 293-468, 1982.

TANHAUSER, S. M.; YOWELL, C. A.; CUTLER, T. J.; GREINER, E. C.; MACKAY, R. J.; DAME, J. B. Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 221-228, 1999.

TILLOTSON, K.; MCCUE, P. M.; GRANSTROM, D. E.; DARGATZ, D. A.; SMITH, M. O.; TRAUB-DARGATZ, J. L. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in northern Colorado. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 19, n. 2, p. 122-126, 1999.

TODD, K. S.; GALLINA, A. M.; NELSON, W. B. *Sarcocystis* species in psittaciform birds. **Journal of Zoo Animal Medicine**, v. 6, n., p. 21-24, 1975.

VIEIRA, M. V. Body size and form in two Neotropical marsupials, *Didelphis aurita* and *Philander opossum* (marsupialia: Didelphidae). **Mammalia**, v. 61, n. 2, p. 245-254, 1997.

VILLAR, D.; KRAMER, M.; HOWARD, L.; HAMMOND, E.; CRAY, C.; LATIMER, K. Clinical presentation and pathology of sarcocystosis in psittaciform birds: 11 cases. **Avian Disease**, v. 52, n. 1, p. 187-194, 2008.

VOSS, R. S.; EMMONS, L. H. Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 230, n., p. 1-115, 1996.

VOSS, R. S.; GARDNER, A. L.; JANSA, S. A. On the relationships of "*Marmosa*" *formosa* Shamel, 1930 (Marsupialia: Didelphidae), a phylogenetic puzzle from the Chaco of northern Argentina. **American Museum Novitates**, v. 3442, n., p. 1-18, 2004.

VOSS, R. S.; LUNDE, D. P.; JANSA, S. A. On the contents of *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. **American Museum Novitates**, v. 3482, n., p. 1-34, 2005.

WITONSKY, S. G.; ELLISON, S.; YANG, J.; GOGAL, R. M.; LAWLER, H.; SUZUKI, Y.; SRIRANGANATHAN, N.; ANDREWS, F.; WARD, D.; LINDSAY, D. S. Horses experimentally infected with *Sarcocystis neurona* develop altered immune responses in vitro. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 5, p. 1047-1054, 2008.

APÊNDICE A: Ficha de coleta e processamento das amostras.

Fichas de Coleta e Procedimento

Nº da amostra: _____

Data de coleta: ___/___/___

Procedência: _____

Animal: *D. aurita* ()

D. albiventris ()

Sexo: Macho ()

Fêmea ()

Idade: Jovem ()

Adulto ()

Tipo de amostra: Intestino grosso ()

Intestino delgado ()

Fezes ()

Procedimento - Centrifugação em solução de sacarose

Data: ___/___/___

Resultado: Positivo () Negativo ()

Outros: _____

Observação: _____

Procedimento – Purificação

Data: ___/___/___

Antibiótico: Sim () Não ()

Antifúngico: Sim () Não ()

PBS: Sim () Não ()

Número de réplicas:

Contagem de *Sarcocystis* em câmara de Neubauer:

Data: ___/___/___

Resultado: _____

Destino

PCR ()

Inoculação em Periquitos ()

Inoculação em Camundongos ()

APÊNDICE B: Ficha de exame clínico no recebimento dos periquitos

Exame clínico

Data:

Periquito 1

FC:

FR:

Hidratação:

Mucosa ocular e oral:

Auscultação:

T°C:

Sistema tegumentar:

Periquito 2

FC:

FR:

Hidratação:

Mucosa ocular e oral:

Auscultação:

T°C:

Sistema tegumentar:

Periquito 3

FC:

FR:

Hidratação:

Mucosa ocular e oral:

Auscultação:

T°C:

Sistema tegumentar:

Periquito 4

FC:

FR:

Hidratação:

Mucosa ocular e oral:

Auscultação:

T°C:

Sistema tegumentar:

Periquito 5

FC:

FR:

Hidratação:

Mucosa ocular e oral:

Auscultação:

T°C:

Sistema tegumentar:

APÊNDICE C: Ficha de exame de acompanhamento pós-inoculação.

Exame de acompanhamento pós-inoculação

Gaiola 1/Amostra -

Data inoculação: / /

Sinais

clínicos:

Hidratação:

FC:

FR:

T°C:

Inspeção:

Auscultação:

Óbito:

Data:

Hora:

Observações:

APÊNDICE D: Ficha de necropsia

FICHA DE NECROPSIA

Amostra inoculada:

Data de Inoculação:

Número do animal:

Data de necropsia:

Data de óbito:

HISTÓRICO CLÍNICOSintomatologia apresentada:

Peso: _____

Eutanásia: () sim () não

EXAME NECROSCÓPICOExame externo:

Exame internoSistema digestório:

Sistema cardio-respiratório:

Sistema genito-urinário:

Sistema endócrino:

Sistema músculo esquelético:

Sistema nervoso:

Provável Causa-Mortis: _____**COLETA PARA HISTOPATOLÓGICO**

- | | | |
|----------------------|-----------------------|----------------------|
| () Pele | () Esôfago | () Timo |
| () Músculo peitoral | () Inglúvio | () Língua |
| () Proventrículo | () Pâncreas | () Pulmões |
| () Traquéia | () Ventrículo | () Rins |
| () Siringe | () Intestino delgado | () Adrenais |
| () Sacos aéreos | () Intestino grosso | () Ovário/Testículo |
| () Tireóide | () Fígado | () Cérebro |
| () Coração | () Vesícula Biliar | () Cerebelo |
| () Pericárdio | () Baço | () Grandes vasos. |

OUTROS: _____

Apêndice E: Tabela dos animais coletados

Tabela 4: Tabela dos animais coletados.

<i>Núm.</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Nome científico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Procedência</i>	<i>Resultado</i>	<i>Origem</i>
Gb 1	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 2	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Positivo	Vida Livre
Gb 3	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 4	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 5	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Positivo	Vida Livre
Gb 6	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 7	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 8	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre

Continua

Continuação

<i>Núm.</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Nome científico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Procedência</i>	<i>Resultado</i>	<i>Origem</i>
Gb 9	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	UFPE / Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 10	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 11	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	Pq.Ecológico do Tietê	Negativo	Vida Livre
Gb 12	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Filhote	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 13	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 14	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 15	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 16	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 17	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Positivo	Vida Livre

Continua

Continuação

<i>Núm.</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Nome científico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Procedência</i>	<i>Resultado</i>	<i>Origem</i>
Gb 18	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	Zoo - SBC	Negativo	Cativeiro
Gb 19	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	Zoo - SBC	Negativo	Cativeiro
Gb 20	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 21	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 22	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 23	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 24	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 25	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 26	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 27	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - SBC	Negativo	Vida Livre

Continua

Continuação

<i>Núm.</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Nome científico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Procedência</i>	<i>Resultado</i>	<i>Origem</i>
Gb 28	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	F + M	2 jovens	Zoo - SBC	Negativo	Vida Livre
Gb 29	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	Zoo - SBC	Negativo	Vida Livre
Gb 30	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 31	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 32	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 33	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 34	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 35	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 36	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre

Continua

Continuação

<i>Núm.</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Nome científico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Procedência</i>	<i>Resultado</i>	<i>Origem</i>
Gb 37	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 38	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 39	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	Pq.Ecológico do Tietê	Positivo	Vida Livre
Gb 40	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	Pq.Ecológico do Tietê	Positivo	Vida Livre
Gb 41	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 42	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 43	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 44	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 45	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Positivo	Vida Livre

Continua

Continuação

<i>Núm.</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Nome científico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Procedência</i>	<i>Resultado</i>	<i>Origem</i>
Gb 46	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 47	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 48	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 49	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 50	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 51	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	ONG Vila Verde	Positivo	Vida Livre
Gb 52	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 53	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 54	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre

Continua.

Continuação

<i>Núm.</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Nome científico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Procedência</i>	<i>Resultado</i>	<i>Origem</i>
Gb 55	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 56	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 57	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 58	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	ONG Vila Verde	Positivo	Vida Livre
Gb 59	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 60	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	ONG Vila Verde	Negativo	Vida Livre
Gb 61	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	Pq.Ecológico do Tietê	Negativo	Vida Livre
Gb 62	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 63	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	ONG Vila Verde	Positivo	Vida Livre

Continua

Continuação

<i>Núm.</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Nome científico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Procedência</i>	<i>Resultado</i>	<i>Origem</i>
Gb 64	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	ONG Vila Verde	Positivo	Vida Livre
Gb 65	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	ONG Vila Verde	Negativo	Vida Livre
Gb 66	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 67	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 68	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	Cotia	Negativo	Vida Livre
Gb 69	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Filhote	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 70	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 71	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Positivo	Vida Livre
Gb 72	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre

Continua

Conclusão

<i>Núm.</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Nome científico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Procedência</i>	<i>Resultado</i>	<i>Origem</i>
Gb 73	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 74	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre
Gb 75	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Continua na próxima página.		<i>D. aurita</i>	Macho	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 77	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Macho	Adulto	Zoo - Sorocaba	Positivo	Vida Livre
Gb 78	Gambá o. branca	<i>D.albiventris</i>	Fêmea	Adulto	Zoo - Sorocaba	Negativo	Vida Livre
Gb 79	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Negativo	Vida Livre
Gb 80	Gambá o. preta	<i>D. aurita</i>	Fêmea	Adulto	DEPAVE	Positivo	Vida Livre

APENDICE F: Tabela dos achados necroscópicos.

Tabela 5: Resultados obtidos na inoculação experimental em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*).

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
1 05/09/09	H1	G34	5	500	3 dias	Anorexia, diarreia	Não	Não	Conteúdo enegrecido em ventrículo e alças intestinais e caquexia.
1 05/09/09	H2	G26	3	500	10 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.
1 05/09/09	H3	G26	3	500	30 dias	Sem sintomas	20/09/2009 (+500)	05/10/2009	NDN

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
1 05/09/09	H4	G30	4	500	30 dias	Sem sintomas	20/09/2009 (+500)	05/10/2009	NDN
1 05/09/09	H5	G30 - G26	4 (3)	500	30 dias	Sem sintomas	20/09/2009 (+500)	05/10/2009	NDN
1 05/09/09	H6	G34	5	500	11 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
1	05/09/09								
	H7	G35	6	500	10 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
1	05/09/09								
	H8	G35	6	500	11 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)										
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia	
1	05/09/09									
	H12	G20	2	500	15 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.	
1	05/09/09	H13	G20	2	500	30 dias	Sem sintomas	20/09/2009 (+500)	05/10/2009	NDN
1	05/09/09	H15	CONTROLE	1	CONTROLE	30 dias	Sem sintomas	20/set	05/10/2009	NDN

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
2	21/10/09								
	H9	G45	10	500	9 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
2	21/10/09					Dispnéia, letargia			
	H10	G45	10	500	10 dias		Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)										
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia	
2	21/10/09								Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.	
		H11	G37	8	500	10 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	
2	21/10/09	H16	G37	8	500	11 dias	Não observado	05/11/2009 (+500)	20/11/2009	Esplenomegalia discreta
2	21/10/09	H17	G43	9	500	30 dias	Sem sintomas	05/11/2009 (+500)	20/11/2009	NDN
2	21/10/09	H18	CONTROLE	7	CONTROLE	30 dias	Sem sintomas	05/11/2009	20/11/2009	NDN
2	21/10/09	H20	G43	9	500	12 dias	Não Observado	05/11/2009 (+500)	20/11/2009	Esplenomegalia discreta

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
2 21/10/09	H21	G51	11	200	30 dias	Sem sintomas	05/11/2009 (+200)	20/11/2009	NDN
2 21/10/09	H23	G51	11	200	17 dias	Não observado	05/11/2009 (+200)	20/11/2009	NDN
2 21/10/09	H24	CONTROLE	7	CONTROLE	30 dias	Sem sintomas	05/11/2009	20/11/2009	NDN
3 09/12/09	H19	G71	12	500	50 dias	Sem sintomas	12/01/2010 (+500)	28/01/2010	NDN
3 09/12/09	H22	G40	16	200	50 dias	Sem sintomas	12/01/2010 (+200)	28/01/2010	NDN
3 09/12/09	H25	G39	19	500	18 dias	Não observado	12/01/2010 (+500)	28/01/2010	NDN
3 09/12/09	H26	CONTROLE	22	CONTROLE	18 dias	Emagrecimento e anorexia	Não	Não	Ausência de conteúdo em ventrículo e alça intestinal, caquexia
3 09/12/09	H27	G58	18	500	19 dias	Não observado	Não	Não	Esplenomegalia
3 09/12/09	H28	G63	13	500	26 dias	Não observado	12/01/2010 (+500)	28/01/2010	Esplenomegalia discreta

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
3 09/12/09	H29	G38	14	500	12 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.
3 09/12/09	H30	G40	16	200	50 dias	Sem sintomas	12/01/2010 (+200)	28/01/2010	NDN
3 09/12/09	H31	G17	15	500	50 dias	Sem sintomas	12/01/2010 (+500)	28/01/2010	pulmões congestos

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
3 09/12/09	H32	G38	14	500	14 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
3 09/12/09	H33	G25	17	500	14 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
3	09/12/09								
	H34	G58	18	500	50 dias	não observado	12/01/2010 (+500)	28/01/2010	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.

Continua

Continuação

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
3 09/12/09	H35	G39	19	500	50 dias	não observado	12/01/2010 (+500)	28/01/2010	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.
3 09/12/09	H36	G25	17	500	50 dias	Sem sintomas	12/01/2010 (+500)	28/01/2010	Pulmões congestos e esplenomegalia discreta

Continua

Conclusão

Inoculação experimental em periquitos australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)									
Inoculação (número)	Lâmina HP	Amostra	Gaiola	Dose (esporocistos)	Tempo até óbito	Sinais clínicos	Reinoculação	Eutanásia	Macroscopia
3 09/12/09	H37	G53	20	500	17 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmão de coloração vinhosa, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, boa conformação de musculatura peitoral, rins aumentados de volume, presença de grande quantidade de alimento em inglúvio, aumento do calibre dos vasos cerebrais.
3 09/12/09	H38	G53	20	500	17 dias	Dispnéia, letargia	Não	Não	Pulmões congestos
3 09/12/09	H39	G64	21	200	50 dias	Sem sintomas	12/01/2010 (+200)	28/01/2010	Pulmão levemente congesto
3 09/12/09	H40	G64	21	200	50 dias	Sem sintomas	12/01/2010 (+200)	28/01/2010	NDN
3 09/12/09	H41	CONTROLE	22	CONTROLE	50 dias	Sem sintomas	12/01/2010	28/01/2010	NDN

APÊNDICE G: Tabela das lesões observadas na microscopia.

Tabela 6: Lesões observadas e classificadas conforme intensidade: auto - autólise, + leve, ++moderada, +++severa, - não observado.

<i>Resultados histopatológicos</i>		Inoculação 1									
		Óbito						Reinoculados			
Órgão	Lesão Lâmina	H1	H2	H6	H7	H8	H12	H3	H4	H5	H13
Pulmão	Congestão	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	Autólise
	Hemorragia	++	++	++	++	++	++	++	++	+	Autólise
	Depósito de fibrina	++	++	++	++	++	++	++	+++	+	Autólise
	Edema	++	+++	++	++	+	++	++	+++	+	Autólise
	Infiltrado inflamatório	-	+++	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Sarcocystis</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	Autólise
	Autólise	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Autólise
Coração	Necrose	-	-	+	-	-	-	-	+	-	Autólise
	Hemorragia	-	+	+	-	-	+	+	+	-	Autólise
	Congestão	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Autólise
	Autólise	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Autólise
Fígado	Edema intracelular	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	Autólise
	Edema extracelular	+	++	++	++	++	++	++	++	+	Autólise
	Congestão	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	Autólise
	Hemorragia	-	+	+	+	++	++	++	+++	+	Autólise
	Degeneração hepatócitos	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Autólise
	Degeneração vacuolar	++	++	+	-	+	++	++	+++	+	Autólise
	Necrose	++	+	+	+	+	++	+++	+++	+	Autólise
	<i>Sarcocystis</i>	-	+	+	+	+	+		-	-	Autólise

Continuação

<i>Resultados histopatológicos</i>		Inoculação 1									
		Óbito						Reinoculados			
Órgão	Lesão Lâmina	H1	H2	H6	H7	H8	H12	H3	H4	H5	H13
	Autólise	+	-	-	-	-	-		+	+	Autólise
Baço	Depleção linfóide	++	++	++	+	-	-	+	+	-	Autólise
	Histiocitose	++	-	-	-	++	++	+	++	-	Autólise
	Autólise	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Autólise
	<i>Sarcocystis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Autólise
Músculo esquelético	Necrose	-	+	+	-	-	+	-	+	-	Autólise
	Congestão	+	+	+	-	-	-	+	++	-	Autólise
	Hemorragia	+	-	+	-	-	-	-	+	-	Autólise
	<i>Sarcocystis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Autólise
	Autólise	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Autólise
Cérebro	Necrose		-	-	-	-	+	+	+	+	Autólise
	Gliose	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	Autólise
	Manguito perivascular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Autólise
	Edema	++	++	++	++	++	++	+	++	++	Autólise
	Congestão	++	++	++	++	++	++	++	+++	+	Autólise
	Hemorragia	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Autólise
	<i>Sarcocystis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Autólise
	Autólise	+	-	-	+	-	+	-	+	+	Autólise
Rim	Necrose	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	Autólise
	Congestão	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	Autólise
	Hemorragia	-	+	+	+	++	++	++	++	+	Autólise
	<i>Sarcocystis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Autólise
	Autólise	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Autólise
Intestino	Necrose	+	-	-	-	+	-	+	-	-	Autólise

Continua

Continuação

<i>Resultados histopatológicos</i>		Inoculação 1									
		Óbito						Reinoculados			
Órgão	Lesão Lâmina	H1	H2	H6	H7	H8	H12	H3	H4	H5	H13
	Destrução de vilosidades	+	+	+	+	+	+	+++	+	-	Autólise
	Destrução de criptas	+	+	+	+	+	+	+++	+	-	Autólise
	Autólise	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Autólise
	Congestão	+	+	+	+	++	++	+	++	+	Autólise
Pâncreas	Necrose	-	-	+	+	--	+	++	++	+	Autólise
	Autólise	-	+	-	-	--	-	-	+	+	Autólise

Continua

Continuação

<i>Resultados histopatológicos</i>			Inoculação 2							
			Óbitos			Reinoculados			200	
Órgão	Lesão	Lâmina	H9	H10	H11	H16	H17	H20	H23	H24
Pulmão	Congestão		++	+++	++	++	++	+++	+++	+
	Hemorragia		++	++	+	+	++	++	-	-
	Depósito de fibrina		+	++	+	+	+	++	-	-
	Edema		+	++	+	+	+	++	-	-
	Infiltrado inflamatório		+	+	+	+	+	+	-	-
	<i>Sarcocystis</i>		++	++	++	++	++	++	+	+
	Autólise		-	-	-	-	+	+	-	-
Coração	Necrose		-	-	-	-	-	-	-	-
	Hemorragia		-	-	-	-	-	+	-	-
	Congestão		+	-	-	-	-	-	-	-
	Autólise		-	-	-	-	-	-	-	-
Fígado	Edema intracelular		+	++	+	+	+	+	-	-
	Edema extracelular		+	++	+	+	+	+	+	-
	Congestão		++	+++	+	+	++	++	+	+
	Hemorragia		++	++	+	+	+	++	+	-
	Degeneração hepatócitos		+	+	-	+	+	+	-	-
	Degeneração vacuolar		++	+	-		+	+	+	-
	Necrose		+	+	+	-	+	+	-	-
	<i>Sarcocystis</i>		+	-	+	-	+	-	-	-
	Autólise		-	-	-	-	-	+	-	-
Baço	Depleção linfóide		+	-	-	+	-	-	-	-

Continua

Continuação

Resultados histopatológicos			Inoculação 2							
			Óbitos			Reinoculados			200	
Órgão	Lesão	Lâmina	H9	H10	H11	H16	H17	H20	H23	H24
	Histiocitose		+	+	-	-	+	++	+	-
	Autólise		-		-	-		-	-	-
	<i>Sarcocystis</i>		-		-	-		-	-	-
Músculo esquelético	Autólise		-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Sarcocystis</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
	Necrose		-	-	-	-	-	-	-	-
	Congestão		-	-	-	-	-	-	-	-
	Hemorragia		-	-	-	-	-	-	-	-
Cérebro	<i>Sarcocystis</i>		-	+	+	-		+	-	-
	Autólise		+	++	+	+	+	+	+	-
	Necrose		-	-	-	-	+	-	-	-
	Gliose		+	+	+	+	+	+	-	-
	Manguito perivascular		+	+	+	+	+	+	-	-
	Edema		+	+	+	+	-	-	-	-
	Congestão		-	-	-	-	-	-	-	-
	Hemorragia		-	-	-	-	-	+	-	-
Rim	<i>Sarcocystis</i>		+	++	+	+	+	++	-	-
	Autólise		+	+	+	++	+	+	-	-
	Necrose		+	+	++	+	+	+	-	-
	Congestão		-	-	-	-	-	-	-	-
	Hemorragia		-	-	-	-	-	-	-	-
Intestino	<i>Sarcocystis</i>		-	-	-	-	++	+	-	-
	Autólise		-	+	-	-	++	+	-	-
	Necrose		-	+	-	-	++	+	-	-

Continua

Continuação

<i>Resultados histopatológicos</i>			Inoculação 2							
			Óbitos			Reinoculados			200	
Órgão	Lesão	Lâmina	H9	H10	H11	H16	H17	H20	H23	H24
	Destruição de vilosidades		-	-	-	-	+	-	-	-
	Destruição de criptas		+	+	-	+	+	++	-	-
Pâncreas	Necrose		+	-	-	-	+	+	-	-
	Autólise		-	+	-	-	+	+	-	-

Continua

Continuação

<i>Resultados histopatológicos</i>			Inoculação 3																
			Óbitos					Reinoculação								200 esporocistos			
Órgão	Lesão	Lâmina	H27	H29	H32	H33	H37	H19	H25	H28	H31	H34	H35	H36	H38	H22	H30	H39	H40
Pulmão	Congestão		++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	Hemorragia		++	+++	+++	+++	+	++	+	+	++	+++	+++	+++	++	+	+	++	+
	Depósito de fibrina		+	++	+++	+++	+	-	+	-	-	++	++	++	+	-	-	++	+
	Edema		+	++	+++	+++	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	+
	Infiltrado inflamatório		+	+	++	++	+	-	+	+	+	++	++	+++	+	+	+	++	+
	<i>Sarcocystis</i>		++	++	+++	+++	+++	-	-	+	-		++	++	+	+	-	+	-
Coração	Autólise		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	Necrose		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hemorragia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Congestão		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Autólise		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Fígado	Edema intracelular		++	+	++	Autó	++	-	+	+	+	Autó	++	++	++	++	++	++	+
	Edema extracelular		++	++	++	Autó	++	+	+	+	+	Autó	++	++	+	++	++	++	+
	Congestão		++	+++	+++	Autó	+++	++	++	+	++	Autó	++	+++	+	++	+	++	++
	Hemorragia		+	++	+++	Autó	++	++	+	+	+	Autó	++	++	+	+	+	++	+
	Degeneração hepatócitos		++	+	++	Autó	++	+	+	+	+	Autó	+	++	+	++	+	+	+
	Degeneração vacuolar		+	+	+	Autó	+	+	+	+	++	Autó	+++	++	+++	+	+	++	++
	Necrose		+	++	+++	Autó	++	+	++	+	+	Autó	++	++	+	+	+	++	+
	<i>Sarcocystis</i>		-	-	+	Autó	-	-	-	-	-	Autó	-	++	-	-	+	+	-
	Autólise		-	-	+	+++	+	-	+	-	-	Autó	++	+	-	-	+	-	-
	Baço	Depleção linfóide		-	++	++	++	++	-	+	+	+++	-	++	++	+	++	-	++
Histiocitose			-	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Autólise			-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Sarcocystis</i>			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Continua

Continuação

Resultados histopatológicos			Inoculação 3																
			Óbitos					Reinoculação						200 esporocistos					
Órgão	Lesão	Lâmina	H27	H29	H32	H33	H37	H19	H25	H28	H31	H34	H35	H36	H38	H22	H30	H39	H40
Músculo esquelético	Necrose		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	Congestão		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	Hemorragia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Sarcocystis</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Autólise		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Cérebro	Necrose		-	+	-	Autó	+	+	+	+	+	Autó	Autó	++	+	++	+	++	+
	Gliose		+	++	++	Autó	++	++	+	+	+	Autó	Autó	++	++	++	+	+++	+
	Manguito perivascular		-	-	-	Autó	-	-	-	-	-	Autó	Autó	-	-	-	-	-	-
	Edema		+	++	+	Autó	++	+	+	+	+	Autó	Autó	+	+	+	+	++	+
	Congestão		++	++	+	Autó	+	+	+	-		Autó	Autó	++	+	+	+	++	+
	Hemorragia		-	-	+	Autó	+	-	-	-	-	Autó	Autó	-	-	-	-	-	-
	<i>Sarcocystis</i>		-	-	-	Autó	-	-	-	-	-	Autó	Autó	-	-	-	-	-	-
	Autólise		-	-	-	Autó	+	-	-	-	--	Autó	Autó	+	-	+	+	-	-
Rim	Necrose		+	++	-	Autó	+	+	+	+	+	Autó	++	++	+	++	+	++	+
	Congestão		++	++	++	Autó	+	+	+	+	+	Autó	+++	++	++	++	+	++	+
	Hemorragia		+	+	++	Autó	+	+	+	++	-	Autó	+++	++	++	+	+	++	+
	<i>Sarcocystis</i>		-	-	-	Autó	-	-	-	-	-	Autó	-	-	-	-	-	-	-
	Autólise		-	-	-	Autó	+	-	-	-	-	Autó	+	+	-	+	+	-	-
Intestino	Necrose		-	-	+	Autó	Autó	+	-	-	-	Autó	Autó	-	-	-	-	-	-
	Destruição de vilosidades		-	-	+	Autó	Autó	+	-	-	-	Autó	Autó	-	-	-	-	-	-
	Destruição de criptas		-	-	+	Autó	Autó	+	-	-	-	Autó	Autó	-	-	-	-	-	-
	Autólise		-	-	+	Autó	Autó	+	-	-	+++	Autó	Autó	-	-	+	+	-	-
	Congestão		+	++	++	Autó	Autó	-	-	-	-	Autó	Autó	-	-	+	-	-	-
Pâncreas	Necrose		-	++	++	Autó	Autó	+	+	-	-	Autó	Autó	-	-	-	-	-	-

Continua

Conclusão

<i>Resultados histopatológicos</i>			Inoculação 3																
			Óbitos					Reinoculação						200 esporocistos					
Órgão	Lesão	Lâmina	H27	H29	H32	H33	H37	H19	H25	H28	H31	H34	H35	H36	H38	H22	H30	H39	H40
	Autólise		-	-	++	Autó	Autó	-	+	-	+++	Autó	Autó	-	-	+	+	-	-