

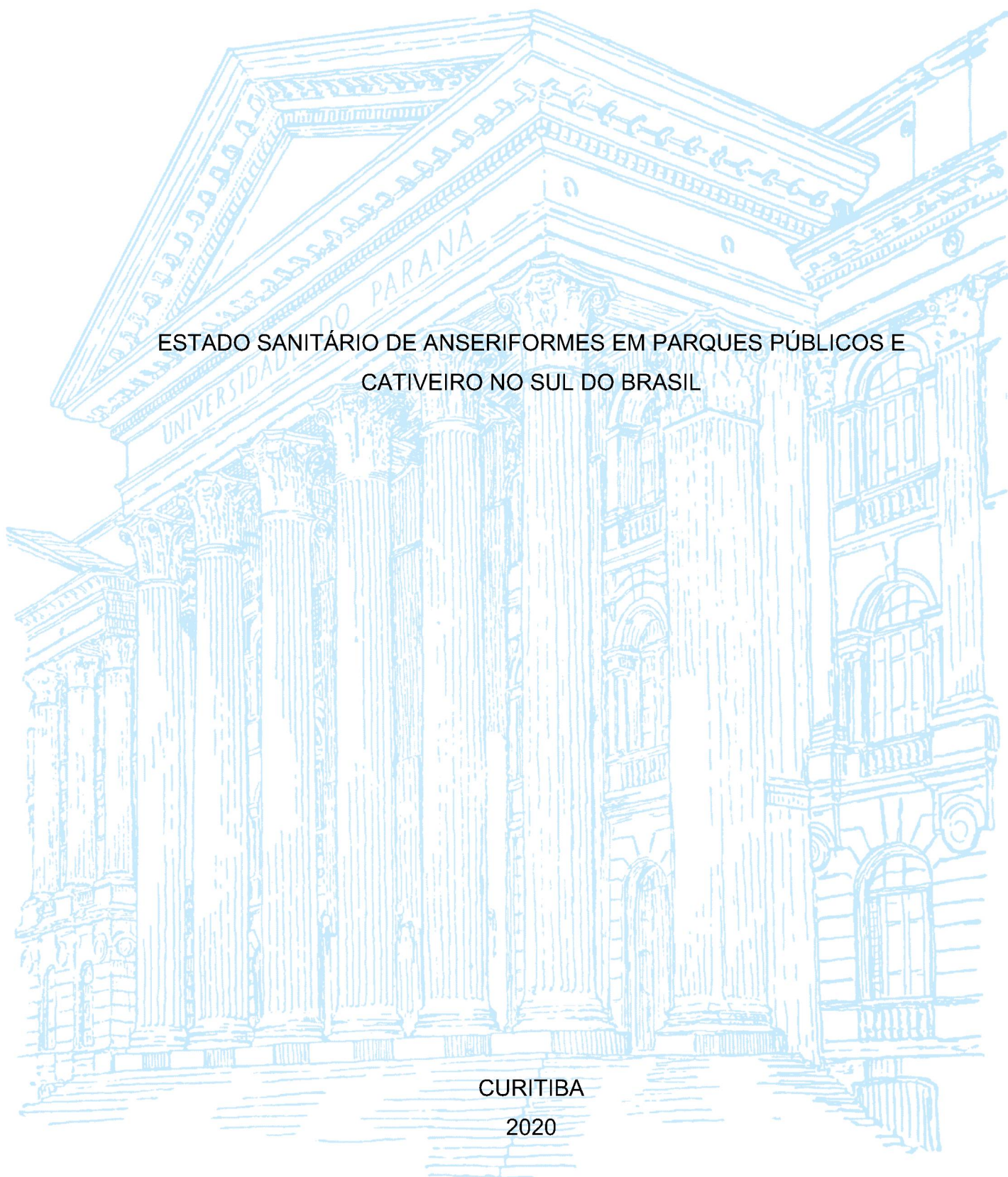
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE LUIZA KONELL

ESTADO SANITÁRIO DE ANSERIFORMES EM PARQUES PÚBLICOS E
CATIVEIRO NO SUL DO BRASIL

CURITIBA

2020



ALINE LUIZA KONELL

ESTADO SANITÁRIO DE ANSERIFORMES EM PARQUES PÚBLICOS E
CATIVEIRO NO SUL DO BRASIL

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Rosangela Locatelli-Dittrich

CURITIBA

2020

Konell, Aline Luiza

Estado sanitário de anseriformes em parques públicos e cativeiro no sul do Brasil. / Aline Luiza Konell. - Curitiba, 2020.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Rosangela Locatelli-Dittrich.

1. Saúde animal. 2. Aves aquáticas. 3. Ganso. I. Locatelli-Dittrich, Rosangela. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ALINE LUIZA KONELL** intitulada: **ESTADO SANITÁRIO DE ANSERIFORMES EM PARQUES PÚBLICOS E CATIVEIRO NO SUL DO BRASIL**, sob orientação da Profa. Dra. ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 04 de Junho de 2020.

Assinatura Eletrônica

08/06/2020 09:26:11.0

ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/06/2020 12:30:51.0

CYBELLE DE SOUZA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - MED.
VETERINARIA)

Assinatura Eletrônica

05/06/2020 20:25:02.0

NELSON RODRIGO DA SILVA MARTINS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS)

Assinatura Eletrônica

04/06/2020 18:54:26.0

ROGERIO RIBAS LANGE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/06/2020 09:30:31.0

RAFAEL FELIPE DA COSTA VIEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

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

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

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 42964

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 42964

À melhor pessoa que eu já conheci:
minha mãe, Elisabeth Konell.
Tudo sempre foi por você.

AGRADECIMENTOS

Novamente: à minha mãe, Elisabeth Konell, que fez o possível e o impossível para eu me tornar quem eu sou hoje. Por ter trilhado o caminho comigo, por ter pacientemente esperado eu concluir todos os meus caminhos profissionais. Essa tese inteiramente foi baseada na força e perseverança que você me ensinou. Eu te amo mais que tudo.

À minha família: Oma, Opa e Tedi. Por terem sido minha fortaleza desde sempre, por terem me tornado quem eu sou hoje.

William Lima pela paciência e compreensão, obrigada por estar ao meu lado durante todo o processo e sempre me encorajar a continuar, independente das dificuldades.

À Eloisa Muehlbauer, por ser a irmã que eu não tive. Seu apoio, carinho e sinceridade foram inexplicavelmente importantes. Você é luz.

À Thaiza Lima por ter sido um porto seguro por todos esses anos e por me mostrar que eu não estou sozinha, independente da situação.

À Elaine Gil, pelo apoio e conselhos que foram essenciais.

À Gabriela Maus por estar ao meu lado nas horas difíceis e por me fazer rir quando eu menos esperava.

À Marina Stival por ter sido a melhor aluna de iniciação científica possível, pela ajuda nas coletas, na organização do projeto e pela grande amizade.

À Monalisa L. Castro pelo apoio e palavras encorajadoras, que nossos caminhos continuem sempre se cruzando.

Ao prof. Dr. Rogério Ribas Lange por ser uma inspiração, um pai e um porto seguro. Obrigada por ter acreditado no meu potencial desde a residência.

Aos médicos veterinários e amigos Reinaldo R. Regio e Morgana Kuteques: grande parte dos ensinamentos que me auxiliaram na parte prática desta tese veio de vocês, que sempre me ensinaram com tanta paciência e carinho.

À Ana Paula Sato pelo apoio, conversas e amizade durante a jornada da pós-graduação. Os dias no laboratório foram melhores com a sua presença.

À Juliana Bornia pelo suporte e carinho durante toda a caminhada. Me tornei uma pessoa mais forte e melhor por causa do seu trabalho. Tudo isso só foi possível pelo seu apoio e disponibilidade.

À Maristela Toledo pelos conselhos, ajuda e cafés.

Pelo grande auxílio dos colegas, graduandos e médicos veterinários nas coletas nos parques e processamento de amostras: Ana Paula Sato, Bruno Massa Viveiros, Carolina Haluche Lautert, Marina Stival, Johanna Schmidt, Reinaldo Ramos Regio, Morgana Kuteques, Rafaella Martini, Thais Luiza, Elizandra Pitt, Lucas Baridotti, Thaiza Lima, Rafaela Ferreira, Rafaella Martini, Louise Candido, Gabriela Maus, Rhailyne Eler, Bianca Resseti, Rodrigo Girata, Bruna Espíndola, Nina da Cunha, Franciele Tuffi, Nathalia Malaguini, Letícia Kienen, Flávia Moreira, Ynae Silva, Mariana Mika, Olair Beltrame: sem vocês nada disso teria sido possível!

Ao Instituto Anami, pelo apoio financeiro e autorização das coletas.

À Daniela B. de Oliveira e o Laboratório Marcos Enrietti pela paciência e auxílio nos testes moleculares.

Ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR e todos os residentes e colegas que por aqui passaram nesse período de aprendizado e crescimento.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosangela Locatelli-Dittrich pelos ensinamentos e por acreditar na minha capacidade para adentrar o mundo da patologia clínica veterinária e área laboratorial.

Ao prof. Dr. Nelson Martins pela disponibilidade e prontidão em me receber em seu laboratório na UFMG e partilhar comigo seu tempo e conhecimento.

À Prof. Dra. Erica Costa por aceitar fazer parte do trabalho e a Aila Silva pelo apoio, tempo, prontidão e conhecimento no processamento das amostras encaminhadas à UFMG.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

RESUMO

A presença de Anseriformes especialmente da família *Anatidae* (gansos, patos, marrecos e cisnes) é comum em lagos de parques públicos e áreas recreativas. Devido ao contato direto com aves migratórias, silvestres e seres humanos, seu papel como transmissores de agentes infecciosos potencialmente zoonóticos é questionado. Estudos relacionados à sanidade de populações aviárias presentes em parques públicos que mantêm contato direto com seres humanos são escassos no Brasil. Aves podem ser hospedeiros intermediários e definitivos para agentes parasitários e infecciosos, servindo como potenciais fontes de infecção e disseminadoras, logo, iniciativas de diagnóstico e vigilância epidemiológica são essenciais para que se reduza a ameaça de doenças e para entender os padrões epidemiológicos de diferentes microrganismos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a sanidade de populações de gansos (*Anser* spp.) de três parques públicos da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil e de uma população de *Anser anser* mantida em cativeiro na região metropolitana de Curitiba. O primeiro capítulo intitulado “Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* spp.) from urban parks and captivity” revelou sorologia positiva em 57% dos gansos de parques para algum dos protozoários avaliados, seguido de 26% nos animais cativos, indicando contaminação ambiental nos locais estudados. No segundo capítulo “Serotyping and antimicrobial susceptibility profile of *Escherichia coli* isolated from cloacal swabs of geese (*Anser* spp.) from public parks and Conservationist Institute in Paraná State”, foram obtidos 41 isolados de *E. coli* com 76% de prevalência em um dos parques públicos e 90% no cativeiro, com 86% de sensibilidade aos antimicrobianos testados. No capítulo três, intitulado “Intervalos de referência de hematologia e bioquímica sérica de gansos (*Anser* spp.) de vida livre e cativeiro” foram definidos valores de referência de hematologia e bioquímicos renais, hepáticos e de proteinograma para *Anser* spp. e *A. anser* adultos e saudáveis. Foram verificados valores de AST, LDH e CK maiores e de ácido úrico menores do que os citados na literatura. O último capítulo “Vigilância de Orthoavulavirus aviário 1, Influenza A (H1N1), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em gansos (*Anser* spp.) de parques públicos” não demonstrou identificação molecular para os microrganismos citados, mas sorologicamente 5% dos animais foram positivos para Orthoavulavirus aviário 1 pelo teste de Inibição da Hemaglutinação, demonstrando contato prévio com o agente. Esta tese vem apresentar o estado sanitário dos gansos dos parques públicos, demonstrando que diferentes microrganismos são encontrados nas populações estudadas e visa contribuir com dados para medidas profiláticas e de controle de problemas que afetam a população de aves da cidade de Curitiba, Paraná.

Palavras-chave: Sanidade, Aves aquáticas, Gansos

ABSTRACT

Anseriformes, especially members of the Anatidae family (geese, ducks, mallards, and swans), are commonly living in lakes of public parks and recreational urban areas. Due to their direct contact with migratory birds, wild birds, and humans, their clear role as potential zoonosis carriers is still to be defined. Studies regarding the health of free-ranging birds from public parks, which are in direct contact with human beings, are scarce in Brazil. Birds can play intermediate and definitive hosts for several diseases, and as potential disseminators and/or sources of infections, including them in diagnostic and epidemiological surveillance initiatives is essential not only to understand the epidemiological patterns of different microorganisms but as to prospectively reduce contamination. The objective of the present study is to evaluate the health status of geese (*Anser* spp.) populations from three public parks in the city of Curitiba (Paraná, Brazil), and the health of one *Anser anser* population kept in captivity in the metropolitan region of Curitiba. The first chapter, entitled "Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity" research revealed positive serology for any of the protozoa in 57% of the free-ranging geese, and in 26% of captive-bred animals, indicating environmental contamination in the studied places. The second chapter, "Serotyping and antimicrobial susceptibility profile of *Escherichia coli* isolated from cloacal swabs of geese (*Anser* spp.) from public parks and Conservationist Institute in Paraná State" 41 isolates of *E. coli* were obtained. Prevalence was up to 76% in geese from public parks and 90% in captivity animals, with 86% sensitivity to the tested antimicrobials. Chapter three, entitled "Reference intervals for hematology and serum biochemistry of free-ranging and captive geese (*Anser* spp.)" values for hematology and serum biochemistry of renal and hepatic proteins for *Anser* spp. and *A. anser* healthy adults were made. In this study, AST, LDH, and CK values were higher than those reported in the literature, while uric acid was lower than reported in the literature. Finally, the last chapter was entitled "Surveillance of avian Orthoavulavirus 1, Influenza A (H1N1), *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in geese (*Anser* spp.) from public parks". RT-PCR and PCR results were negative for all microorganisms, although serologically, 5% of the animals were positive for avian Orthoavulavirus 1 by the Hemagglutination Inhibition test, suggesting previous contact with the pathogen. This thesis presents the overall health status of geese living in public parks, evaluates the presence of different microorganisms in the populations studied and aims to contribute with data for prophylactic measures and control of possible issues that affect the bird population in the city of Curitiba, Paraná.

Keywords: Avian health, Waterfowl, Geese

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Taxonomia da ordem Anseriformes.....	16
FIGURE 2. Map showing the location of the study area, including public parks and a breeding center in Paraná, Brazil, and the respective seroprevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Sarcocystis</i> sp., and <i>Neospora caninum</i> at each locality.....	26
FIGURA 3. Reação da Inibição da Hemaglutinação para Orthoavulavirus aviário 1, em microplaca com fundo em “U” com sorologia positiva.	72

LISTA DE TABELAS

TABLE 1. Occurrence of antibodies to <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Sarcocystis</i> sp., and <i>Neospora caninum</i> and their co-infection in geese (<i>Anser</i> sp.) from urban parks and captivity.....	25
TABLE 2. Percentage and absolute numbers of young and adult geese seropositive to <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Sarcocystis</i> sp. and/or <i>Neospora caninum</i> , divided in parks or captivity.	27
TABLE 3. Absolute number (n) and frequency (%) of <i>Escherichia coli</i> isolated from cloacal swabs of 52 geese (<i>Anser</i> spp.) from two public parks and a conservationist institute, Curitiba and metropolitan area.	38
TABLE 4. Absolute (n) and relative (%) resistance to 41 strains of <i>Escherichia coli</i> isolated from geese cloacal swab (<i>Anser</i> spp.) from public parks and conservationist institute from Curitiba and metropolitan area.	39
TABELA 5. Intervalos de referência (IR) hematológicos, proteína plasmática total e relação heterófilo/linfócito de 84 gansos (<i>Anser</i> spp.) adultos e saudáveis provenientes de três parques públicos (Curitiba, Paraná, Brasil).	50
TABELA 6. Intervalos de referência (IR) hematológicos, plasmática total e relação heterófilo/linfócito de 42 gansos (<i>Anser anser</i>) adultos e saudáveis provenientes de um instituto conservacionista na região metropolitana de Curitiba, Paraná.....	52
TABELA 7. Intervalos de referência (IR) de parâmetros bioquímicos séricos de 84 gansos (<i>Anser</i> spp.) adultos e saudáveis provenientes de parques públicos de Curitiba, Paraná.....	55
TABELA 8. Intervalos de referência (IR) de parâmetros bioquímicos séricos de 43 gansos (<i>Anser anser</i>) adultos e saudáveis provenientes de um instituto conservacionista na região metropolitana de Curitiba, Paraná.....	56
TABELA 9. Doenças, tipo de amostra, métodos e resultados de avaliação molecular e sorológica de 88 gansos adultos de três parques públicos	71
TABELA 10. Origem e titulação de gansos (<i>Anser</i> sp.) adultos, saudáveis, soropositivos pelo teste da Inibição da Hemaglutinação para Orthoavulavirus aviário 1 (Doença de Newcastle) provenientes de parques públicos na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil	72

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

APEC	- Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> Aviária Patogênica)
APMV-1	- Avian Paramyxovirus tipo 1
AST	- Aspartato aminotransferase
Ca	- Cálcio
CHGM	- Concentração de Hemoglobina Globular Média
CK	- Creatinoquinase
DAT	- Teste de Aglutinação Direta (Direct Agglutination Test)
DEPC	- Dietil-pirocarbonato
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico (Deoxycribonucleic acid)
DNC	- Doença de Newcastle
DP	- Desvio Padrão
Et al.	- E colegas
ELISA	- Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
Hg	- Hemoglobina
H/L	- Relação Heterófilo Linfócito
Ht	- Hematócrito
IA	- Influenza aviária
IC	- Intervalo de Confiança
IHA	- Indirect Hemagglutination (Hemaglutinação indireta)
IDGA	- Imunodifusão em Gel de Ágar
IFAT	- Reação da Imunofluorescência Indireta (Immunofluorescence Antibody Test)
IgG	- Imunoglobulina G
IH	- Inibição da Hemaglutinação
IN	- Inibição da Neuraminidase
IR	- Intervalo de Referência
Kg	- Quilograma
LDH	- Lactato desidrogenase
LPVA	- Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal
M	- Molar
M ²	- Metro quadrado
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAT - Teste de Aglutinação Microscópica (Microscopic Agglutination Test)

mg/mL - Miligramas por mililitro

MG - *Mycoplasma gallisepticum*

MS - *Mycoplasma synoviae*

mL - Miligrama

n - Número

NaCl - Cloreto de Sódio

NP - Não Paramétrico

OF - Orofaringe

OIE - Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health)

P - Fósforo

Pb - Pares de base

PBS - Tampão Fosfato-salino (Phosphate-buffered Saline)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

pH - Potencial Hidrogeniônico

PPT - Proteína Plasmática Total

PSL - Parque São Lourenço

PTS - Paramétrico Transformado Standard

PTR - Paramétrico Transformado Robusto

RNA - Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)

rpm - Revoluções por minuto

RT-PCR- Reação da Transcriptase Reversa (Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction)

RT-qPCR – Reação Quantitativa da Transcriptase Reversa (Quantitative Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction)

SPF - Specific Pathogen Free

sp. - Espécie

spp. - Espécies

UI - Unidades Internacionais

UI/mL - Unidades Internacionais por Mililitro

UHA - Unidades Hemaglutinantes

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

USA - United States of America

UV - Ultravioleta
VGM - Volume Globular Médio
 μL - Microlitro
 μg - Micrograma
 χ^2 - Qui-quadrado (Chi square)
 $^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

® - marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 OBJETIVO GERAL	18
1.1.1 Objetivos específicos	18
1.2 REFERÊNCIAS	19
2 SEROSURVEY OF <i>TOXOPLASMA GONDII</i>, <i>SARCOCYSTIS</i> SP. AND <i>NEOSPORA CANINUM</i> IN GEESE (<i>ANSER</i> SP.) FROM URBAN PARKS AND CAPTIVITY	20
2.1 ABSTRACT	20
2.2 RESUMO	20
2.3 INTRODUCTION	21
2.4 MATERIAL AND METHODS.....	23
2.4.1 Animals	23
2.4.2 Parks and Conservational Institute.....	23
2.4.3 Laboratory Testing	24
2.4.4 Statistical Analyses	25
2.5 RESULTS	25
2.6 DISCUSSION.....	27
2.7 CONCLUSION	30
2.8 REFERENCES	30
3 SEROTYPE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PROFILES OF <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLATED FROM CLOACAL SWABS OF GEESE (<i>ANSER</i> SPP.) FROM PUBLIC PARKS AND CONSERVATIONIST INSTITUTE IN PARANÁ STATE 34	
3.1 ABSTRACT	34
3.2 RESUMO	34
3.3 INTRODUCTION	35
3.4 MATERIAL AND METHODS.....	36
3.4.1 Study Locations	36
3.4.2 Sampling	36
3.4.3 Isolation and biochemical identification of <i>Escherichia coli</i>	37
3.4.4 Antimicrobial Sensitivity Profile	37
3.4.5 Serotyping.....	37

3.5 3.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	37
3.6 CONCLUSION	42
3.7 REFERENCES	42
4 INTERVALOS DE REFERÊNCIA DE HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE GANSOS (<i>ANSER SPP.</i>) DE VIDA LIVRE E CATIVEIRO.....	45
4.1 RESUMO	45
4.2 ABSTRACT	45
4.3 INTRODUÇÃO.....	46
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.4.1 Locais de coleta	48
4.4.2 Coleta de amostras e procedimentos laboratoriais	48
4.4.3 Estatística	49
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.6 CONCLUSÃO	59
4.7 REFERÊNCIAS	60
5 VIGILÂNCIA DE ORTHOAVULAVIRUS AVIÁRIO 1, INFLUENZA A (H1N1), <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> E <i>MYCOPLASMA SYNOVIAE</i> EM GANSOS (<i>ANSER SPP.</i>) DE PARQUES PÚBLICOS.....	63
5.1 RESUMO	63
5.2 ABSTRACT	63
5.3 INTRODUÇÃO.....	64
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
5.4.1 Locais de estudo.....	66
5.4.2 Animais e coleta de amostras	67
5.4.3 Inibição da hemaglutinação para Influenza Aviária (H1N1)	67
5.4.4 Inibição da hemaglutinação para Doença de Newcastle (APMV-1).....	68
5.4.5 PCR para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i>	69
5.4.6 Extração de RNA	69
5.4.7 RT-PCR para Influenza Aviária (IA)	69
5.4.8 RT-PCR para Doença de Newcastle.....	70
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.6 CONCLUSÃO	78
5.7 REFERÊNCIAS	79
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83

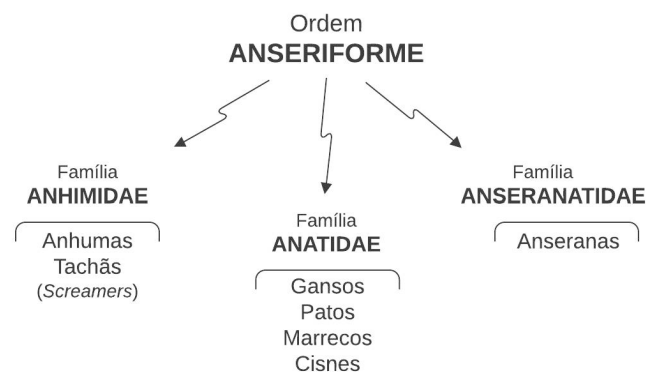
7 REFERÊNCIAS	84
ANEXO 1 – INTERVALOS DE REFERÊNCIA (IR) ABSOLUTOS E RELATIVOS DE HEMATOLOGIA E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL DE 84 GANSOS (<i>ANSER SPP.</i>) ADULTOS E SAUDÁVEIS PROVENIENTES DE PARQUES PÚBLICOS DA REGIÃO DE CURITIBA, PARANÁ	93
ANEXO 2 – INTERVALOS DE REFERÊNCIA (IR) ABSOLUTOS E RELATIVOS DE HEMATOLOGIA E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL DE 43 GANSOS (<i>ANSER SPP.</i>) ADULTOS E SAUDÁVEIS PROVENIENTES UM INSTITUTO CONSERVACIONISTA DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ.....	94
ANEXO 3 – COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL.....	95
ANEXO 4 - AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DOS ANIMAIS DOS PARQUES E BOSQUES DA CIDADE DE CURITIBA, PARANÁ.....	96
ANEXO 5 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA.....	97

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os três países do mundo com a maior riqueza de avifauna, com 1.919 espécies (PIACENTINI et al., 2015). Taxonomicamente, a ordem Anseriforme possui três famílias: Anhimidae (conhecidos como *screamers*), Anseranatidae (com somente uma espécie residente na Austrália e Nova Guiné) e Anatidae que contem o maior número, com aproximadamente 150 espécies de gansos, patos, marrecos e cisnes (Figura 1) (BACKUES, 2015; OLSEN, 2009).

Os Anseriformes são associados a ambientes aquáticos e pantanosos. Tais animais possuem plumagem densa e impermeável, dedos dos pés unidos por uma membrana rudimentar e ossos tarsometatársicos curtos. São ótimos nadadores e mergulhadores, entretanto, não tão eficientes na terra (OLSEN, 2009). São animais chamados de “*waterfowl*” (na tradução: aves aquáticas), muito importantes zootecnicamente e mantidos em cativeiros em zoológicos e coleções privadas, além de encontrados em vida livre no mundo inteiro (BACKUES, 2015).

FIGURA 1. Taxonomia da ordem Anseriformes.



Adaptado de (BACKUES, 2015; OLSEN, 1994)

Devido ao aspecto migratório e natureza social de muitas espécies (domésticas ou silvestres), estes animais estão expostos a diferentes ambientes, potenciais toxinas e agentes infecciosos tendo um papel importante na ecologia e circulação de vírus, bactérias, fungos e hematozoários (BACKUES, 2015; HUBÁLEK, 2004). Nos ambientes urbanos e suburbanos, espécies silvestres endêmicas se adaptaram aos ambientes dominados pelos seres humanos e hibridizaram com espécies domésticas (BACKUES, 2015). A oportunidade de transmissão de

patógenos e o prejuízo às populações silvestres, cativas ou domésticas, ocorre repetidamente e continua a ser uma grande preocupação para a avicultura industrial e também no que diz respeito à conservação (GILBERT; PHILIPPA, 2012)

O estudo das populações cativas é facilitado pela logística devido ao acesso aos animais e, na maioria das vezes, é curativo. No entanto, as abordagens epidemiológicas com intenção de prevenção ou controle, são menos frequentes em situações que não estejam associadas a grandes impactos ou mortalidade. Em contrapartida, estudos com populações de vida livre necessitam de maior investimento estrutural e logístico e geralmente são realizados por estudos visando conservação das espécies, riscos à saúde pública ou riscos de transmissão de patógenos para espécies economicamente importantes (CORRÊA, 2007). Neste caso, estudos microbiológicos e avaliação de potenciais riscos são de extrema importância para reduzir doenças infecciosas emergentes e contribuir com a conservação da biodiversidade (BRACONARO et al., 2015).

Fragmentos de vegetação em meio urbano compõem ecossistemas que mantêm grande variedade de fauna silvestre, propiciando condições favoráveis a populações aviárias (CORRÊA, 2007). Em jardins e parques, as aves interagem com diferentes seres vivos, incluindo pessoas imunocomprometidas. Algumas aves se adaptaram a se alimentar de lixo deixado pelos visitantes, representando um desafio adicional à saúde pública (CONTRERAS et al., 2016). A presença das aves como potenciais transmissores de microrganismos patogênicos e multirresistentes (FALLACARA, 2000) evidenciam a problemática epidemiológica na saúde pública (CONTRERAS et al., 2016)

No Brasil, os estudos de ocorrência e prevalência das doenças ou microrganismos patogênicos em animais de vida livre e em cativeiro também são limitados. Devido à ausência (ou não demonstração) de sinais clínicos em diversas espécies aviárias, muitas podem carrear microrganismos patogênicos, representando riscos a saúde humana e animal, pois a ausência de indicadores clínicos que possibilitariam ações preventivas e distanciamento, dificultam o controle e erradicação das doenças (BARBOSA; MARTINS; MAGALHÃES, 2011). Logo, há iminente necessidade de aumentar o número de espécies e animais avaliados para ampliar a base de dados de ocorrência de doenças e dos microrganismos presentes em tais populações.

Considerando os fatores citados anteriormente, justifica-se verificar a sanidade de anatídeos presentes nos parques urbanos no município de Curitiba, analisando a ocorrência de microrganismos patogênicos em suas populações. Ressalta-se ainda que a transmissão de microrganismos é ampla entre diferentes espécies aviárias, sendo frequente a contaminação de espécies domésticas por aves de vida livre. Por estes motivos, medidas devem ser tomadas para verificação de perfis sanitários visando contribuir principalmente com novos dados de possíveis problemas que afetam a população aviária.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sanidade de populações de gansos (*Anser spp.*) em parques da cidade de Curitiba, Paraná e de um cativeiro na região metropolitana de Curitiba.

1.1.1 Objetivos específicos

Realizar exame físico e anilhamento de *Anser spp.* provenientes de parques públicos e de um cativeiro para correlacionar com dados sanitários;

Realizar exames bioquímicos séricos (perfil hepático, renal e proteinograma) das aves relacionando com os sinais clínicos e presença ou ausência de agentes infecciosos;

Definir valores hematológicos e bioquímicos de gansos de parques públicos e cativeiro no Brasil;

Verificar a ocorrência de hemoparasitas (*Plasmodium*, *Leucocitozoon*, *Haemoproteus*) em esfregaços sanguíneos em *Anser spp.* de parques públicos e de cativeiro;

Verificar a ocorrência de anticorpos para os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis sp.* e *Neospora caninum* pela Reação da Imunofluorescência Indireta;

Verificar a ocorrência de anticorpos para H1N1 e Orthoavulavirus aviário 1 pelo teste da Inibição da Hemaglutinação;

Verificar a presença e prevalência de microrganismos de risco para saúde pública e produção animal mediante swab de orofaringe e cloacal por RT-PCR ou PCR para Orthoavulavirus aviário 1, H1N1, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*;

Isolar, sorotipar e determinar o perfil de resistência bacteriana de *Escherichia coli* provenientes de swab cloacal de *Anser* spp.

1.2 REFERÊNCIAS

- BACKUES, K. A. Anseriformes. In: R. . E. Miller; M. Fowler (Orgs.); **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine**. 8th ed, p.116–126, 2015. St. Louis: Elsevier.
- BARBOSA, A. D.; MARTINS, N. R. S.; MAGALHÃES, D. F. Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 14, n. 1-2-3, p. 1–9, 2011.
- BRACONARO, P.; SAIDENBERG, A. B. S.; BENITES, N. R.; et al. Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 65–72, 2015.
- CONTRERAS, A.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; PATERNA, A.; et al. Epidemiological role of birds in the transmission and maintenance of zoonoses. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 35, n. 3, p. 845–862, 2016.
- CORRÊA, S. H. R. **Estudo epidemiológico de doenças infecciosas em anatídeos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo** Tese de doutorado, 2007.
- FALLACARA, D. **Survey of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* and *Pasteurella multocida* in free-living waterfowl**, 2000. Ohio State University.
- GILBERT, M.; PHILIPPA, J. Avian influenza H5N1 virus: Epidemiology in wild birds, zoo outbreaks. In: M. E. Fowler; E. R. Miller (Orgs.); **Zoo and Wild Animal Medicine, Vol 7**. 7th ed, p.343–348, 2012. St. Louis: Elsevier.
- HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 4, p. 639–659, 2004.
- OLSEN, G. H. Bacterial and Parasitic Diseases of Anseriformes. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 475–490, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2009.07.004>>. .
- OLSEN, J. H. Anseriformes. In: B. W. Ritchie; G. J. Harrison; L. R. Harrison (Orgs.); **Avian Medicine: Principles and Application**. p.1237–1275, 1994. Florida: Wingers Publishing Inc.
- PIACENTINI, V. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Ornithology Research**, v. 23, n. 2, p. 91–298, 2015.

2 SEROSURVEY OF *TOXOPLASMA GONDII*, *SARCOCYSTIS* SP. AND *NEOSPORA CANINUM* IN GEESE (*ANSER* SP.) FROM URBAN PARKS AND CAPTIVITY

2.1 ABSTRACT

Geese, ducks, mallards, and swans are avian species of the Order Anseriformes, which are found in the wild, in zoos and parks, and raised for meat consumption. *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., and *Neospora caninum* are parasite protozoans of several species of animals. Wild and domestic birds can serve as intermediate hosts, disseminators and potential sources of infection of these protozoa to humans through contaminated meat. The aims of this study were: (i) to perform a serological survey of *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. and *N. caninum* in geese (*Anser* sp.) from public parks and from captivity and (ii) to compare seroprevalence between these two locations. Antibodies were detected by Immunofluorescence antibody test using the serum of 149 geese. Antibodies to *Sarcocystis* sp., *T. gondii*, and *N. caninum* were detected in 28.18%, 18% and 0.67% of geese, respectively; 57% of geese from urban parks and 26.53% of geese from captivity were seropositive for at least one protozoa. The results indicate environmental contamination, particularly for the occurrence of antibodies against *T. gondii* – a zoonosis that causes toxoplasmosis and is transmitted through oocyte ingestion. This is the first serological survey of *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. and *N. caninum* in geese from urban parks.

KEYWORDS: Serology, IFAT, waterfowl

2.2 RESUMO

Gansos, patos, marrecos e cisnes são aves da ordem Anseriformes, encontrados em vida livre, zoológicos, parques e criados para consumo da carne. *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. e *Neospora caninum* são protozoários capazes de infectar diversas espécies animais. Aves domésticas e silvestres podem ser hospedeiras intermediárias e servir como disseminadoras e potenciais fontes de infecção para seres humanos por meio da carne. Os objetivos do estudo foram: a) realizar a soroprevalência de *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. e *N. caninum* em gansos (*Anser* sp.) provenientes de parques públicos e de um cativeiro e b) comparar a soroprevalência dos locais estudados. Foi realizada sorologia de 149 *Anser* spp. pelo método da reação de imunofluorescência indireta para os três protozoários. Soropositividade para *Sarcocystis* sp., *T. gondii* e *N. caninum* foram detectados em 28,18%, 18% e 0,67% dos gansos, respectivamente. Nos parques, 57% dos gansos foram soropositivos para algum dos protozoários, seguido de 26,53% nos animais cativos. A ocorrência de anticorpos para tais protozoários indica contaminação ambiental, particularmente pela ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, zoonose que causa a toxoplasmose e é transmitida por ingestão de oocistos. Este é o primeiro trabalho que avaliou sorologicamente gansos provenientes de parques urbanos para os referidos protozoários.

PALAVRAS-CHAVE: Sorologia, RIFI, aves aquáticas

2.3 INTRODUCTION

Geese, ducks, mallards, and swans (Order: Anseriformes, Family: Anatidae) can be found in wildlife, zoos, parks, and they can also be raised in captivity for meat production. According to (CORRÊA, 2007), waterfowl housed in the ponds of zoos and public parks are under constant risk of exposure to the pathogens of migratory birds that visit these places during a certain period every year. Monitoring both the animals and the ecosystem in areas where guest visiting occurs frequently is suggested by (CHASKDA et al., 2018). Due to birds' ability to fly and their wide variety of feeds, these animals have greater exposure to parasitic infections.

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that infects mammals and birds (MOREÉ et al., 2018). Birds can be intermediate hosts for *T. gondii* and can become infected following the ingestion of raw meat of animals harboring tissue cysts, particularly given the cannibalistic or scavenger behavior of some carnivorous species; or after the ingestion of soil, water, or plant material contaminated with sporulated oocysts (TENTER et al., 2000; MURAO et al., 2008).

Birds are important to the biological cycle of *T. gondii* and to the epidemiology of toxoplasmosis. Poultry represent a potential risk of *T. gondii* infection to humans through the consumption of contaminated poultry products, in addition to their valuable role as sentinels since chickens are important hosts in *T. gondii* cycle, infecting animals through consume of their undercooked meat and for being resistant to clinical toxoplasmosis (GARCIA et al., 2000; DUBEY, 2010b). In the wild, birds can also be involved in the zoonotic cycle when used as a source of protein to feed felids and humans, and they may act as natural reservoirs for and sources of infection to other hosts and the ecosystem (VERMA et al., 2016).

Sarcocystis sp. is an obligate intracellular coccidian parasite that requires an intermediate and a definitive host (usually an herbivore and carnivore, respectively) and can affect several species of mammals and birds (EI-MORSEY et al., 2015). The genus is composed of more than 100 species (some of which are zoonotic) that differ in their levels of pathogenicity, host specificity, cyst structure and location (FRANCO et al., 2018).

Neospora caninum is an obligate intracellular parasite that can have domestic and wild canids as definitive hosts (GONDIM et al., 2010). In experimental infections, it has been found that Columbiformes may be susceptible to, and may serve as intermediate hosts of *N. caninum* (McGUIRE et al., 1999). Although the role of birds in

the life cycle of *N. caninum* is unknown, the presence of birds has been correlated with outbreaks of abortion in cattle in Italy (OTRANTO et al., 2003), France (OULD-AMROUCHE et al., 1999) and Netherlands (BARTELS et al., 1999), suggesting that birds may be involved in the sylvatic cycle of the parasite being a mechanical vector or intermediate hosts (DONAHOE et al., 2015).

Sick birds usually mask any clinical signs of diseases (DONELEY, 2016), and they can act as reservoirs for and disseminators of pathogens given their ability to fly and migrate. Epidemiological studies in birds that share spaces with humans (captivity or free life) are extremely important when monitoring diseases with zoonotic potential as they can reduce emerging diseases and assist in biodiversity conservation through assessment of the risk that the microorganisms may pose for the birds themselves (BRACONARO et al., 2015). Characterization of the microorganism and distribution of the disease are essential for formulating actions that aim to prevent infections, reducing the long-term complications and transmission of pathogens (IBRAHIM et al., 2018).

Serological surveys in Anseriformes are usually conducted in slaughterhouses (ABOULAILA et al., 2011; YANG et al., 2012; ZOU et al., 2017) or with migratory birds (PRESTRUD et al., 2007; SANDSTRÖM et al., 2013; VERMA et al., 2016); further studies are necessary and critical for assessing the prevalence of protozoan infections in other areas (MURAO et al., 2008). Serological surveys of *T. gondii*, *Sarcocystis* sp., and *N. caninum* in birds in Brazil are scarce, and there is no information about the seroprevalence of these protozoa in geese. Geese maintain contact with humans and migratory birds, and thus can serve as reservoir hosts and vectors of zoonotic pathogens (CORRÊA, 2007; YAN et al., 2011; CONG et al., 2012; VERMA et al., 2016).

Considering the important epidemiologic role these species may play disseminating these protozoa, the aim of this study is to determine the seroprevalence for *T. gondii*, *Sarcocystis* sp., and *N. caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks. We also hypothesize that wild geese (from parks) are more exposed to protozoans than captive geese (kept in a conservationist institute). Therefore, the secondary aim of this study was to determine the seroprevalence of geese kept in captivity in southern Brazil and to compare the results obtained from animals from urban parks.

2.4 MATERIAL AND METHODS

2.4.1 Animals

The study population comprised 149 geese (*Anser anser* and *Anser cygnoides*) caught between June 2017 until February 2018. One hundred from three public parks in the city of Curitiba, Brazil (52 from Barigui Park, 9 from Tingui Park and 39 from São Lourenço Park) and 49 from a conservational institute in São José dos Pinhais, which is the surrounding metropolitan area of Curitiba, Brazil.

Of the total sample, 130 geese were adults and 19 were young. The young were determined when the animal weight less than 2,5kg, had initial plumage and notched tips of tail feathers. The geese were captured by placing a net on the animal and submitted to individual physical examination (assessment of body condition, examination of eye, beak, oral cavity, feathers, wings and legs, palpation of the abdomen, cardiac and respiratory auscultation and search for ectoparasites). All captured animals were sampled and added to the study population. Blood samples were collected via medial metatarsal venipuncture using 5 mL sterile syringes with 25×7 mm gauge needles. After sampled, a plastic numbered leg band was placed on the left leg of each animal for further evaluation of migratory behavior. This study was approved by the animal ethics committee of the Federal University of Paraná (Protocol number 125/2016) and by the Parks and Squares Committee of Curitiba City Hall.

2.4.2 Parks and Conservational Institute

Barigui Park (25°25'34.52 "S 49°18'27.03" W) has an area of 1,4000.000 m² located on the banks of the Barigui River. Flocks of geese (*A. anser* and *A. cygnoides*) are commonly sighted cohabiting with ducks, caracaras, capybaras, preas, agoutis, opossums, and different species of passerines. These geese feed mostly on grass and food provided by park visitors (e.g., popcorn, corn, and bread).

Tingui Park (25°23'36.05 "S 49°18'21.71" W) is also located on the banks of the Barigui River and has an area of 380,000 m². Approximately 10 geese cohabit with a large diversity of birds, reptiles, and mammals and feed on grass and various foods provided by visitors.

São Lourenço Park (25°23'2.400"S 49°15'55.440"W) has an area of 204,000 m², it is located on the banks of the Belem River and is home to flocks of up to 70

individuals of geese (*A. anser* and *A. cygnoides*). Geese receive daily feeds of corn by park employees, but they also receive bread and popcorn from park visitors. A large amount of birds (raptors, ducks, galliformes, and passerines) and mammals are seen in the vicinity of the park.

The conservationist institute (25°35'17.624"S 49°10'49.184"W) is located in São José dos Pinhais, surrounding the metropolitan area of Curitiba, Brazil. It is home to several species of mammals and birds, including 49 domestic geese (*A. anser*). The geese are kept in two large open enclosures (approximately 3000m² each) containing artificial lakes, and they cohabit with ducks and swans. They have had their wings clipped and are fed on grass, commercial food, fruits, and vegetables. Due their monitored feeding and environment, they were considered as a "captivity control" in comparison to wild animals (from urban parks).

2.4.3 Laboratory Testing

Blood samples were immediately conditioned in tubes without anticoagulant and transported at room temperature to the laboratory. Samples were centrifuged for 5 minutes at 5,000 rpm to obtain the serum and then stored at -20°C until serological analysis. Detection of specific *T. gondii*, *S. neurona* and *N. caninum* antibodies were carried out by an immunofluorescent antibody test (IFAT). Slides were prepared with tachyzoites of the *N. caninum* NC-1 strain, tachyzoites of the *T. gondii* RH strain, and merozoites of the *S. neurona* SN37R strain with carbonate-buffered glycerin (pH 9.5) and a coverslip. All the strains were from in vitro culture in Vero cells at the Laboratory of Veterinary Clinical Pathology of Federal University of Paraná. Geese serum samples were diluted in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) at a concentration of 1:25 (MARTINS et al., 2011), and conjugated anti-Duck immunoglobulin (Ig)G (KPL®, Milford, MA, USA) was used as a secondary antibody at 1:50 dilution. Dog sera positive for *N. caninum* and *T. gondii* were used to validate a positive control of positive geese sera, which was used for further analysis. A positive serum sample obtained from a bird of prey was used as a positive control for *Sarcocystis* sp. Only samples that exhibited fluorescence of the entire parasitic surface were considered to be positive (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016). Endpoint titers were determined by serial dilutions from 1:25 to 1:150.

2.4.4 Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using EZR 1.37 (KANDA, 2013), which is a graphical interface for R commander (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, version 3.4.4). Association between age (adult or young), collection point, and the presence of antibodies against each protozoa were analyzed using a chi-squared test. Statistical significance was set at $P < 0.05$ for all analyses.

2.5 RESULTS

Antibodies to either *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. and/or *N. caninum* were detected in 70 of 149 geese (Table 1). Antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected in 42 samples, *T. gondii* in 27 samples, and *N. caninum* in one sample. Co-infection with *T. gondii* and *Sarcocystis* sp. was reported in 8% (12 of 149) of geese – one young and 11 adults.

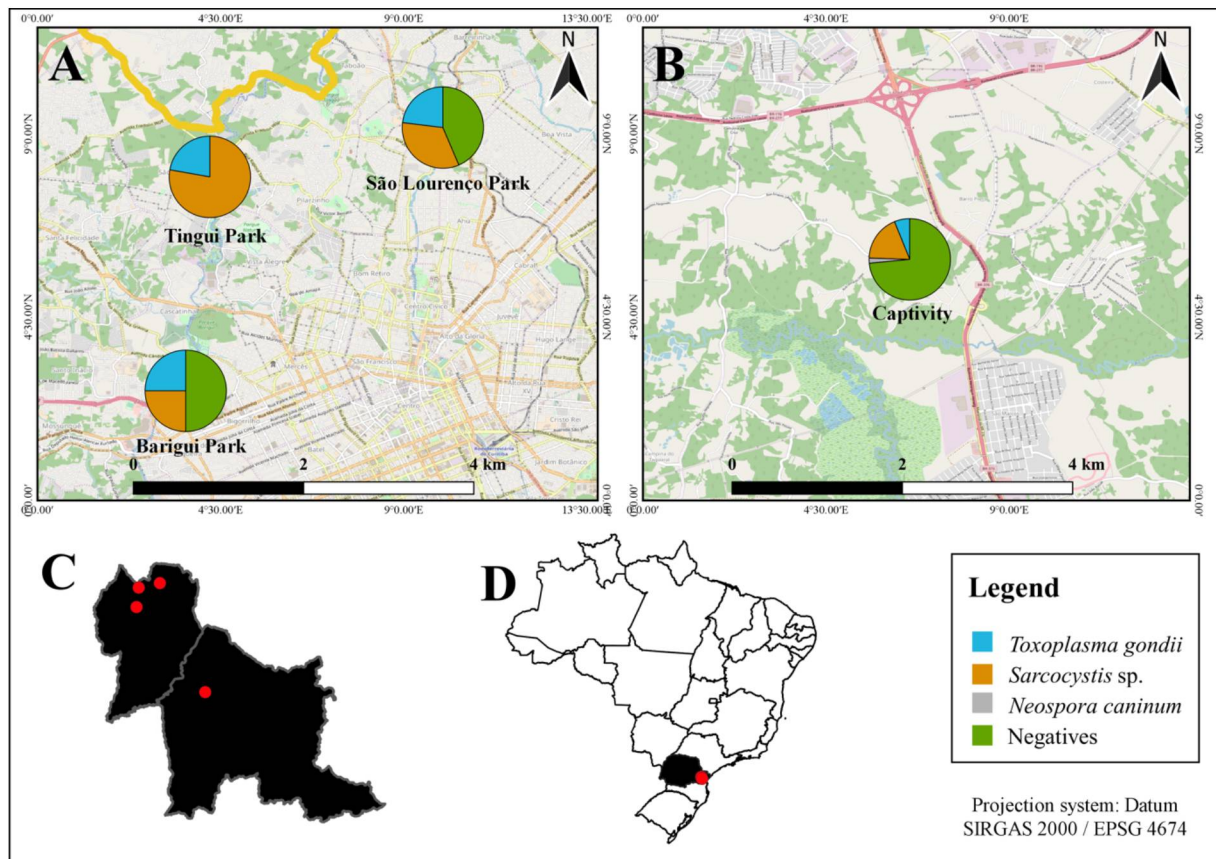
TABLE 1. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., and *Neospora caninum* and their co-infection in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity.

	Public Parks			Captivity
	Barigui (n=52)	Tingui (n=9)	São Lourenço (n=39)	Captivity (n=49)
<i>T. gondii</i>	13 (25%)	2 (22.2%)	9 (23%)	3 (6.1%)
<i>Sarcocystis</i> sp.	13 (25%)	7 (77.7%)	13 (33.3%)	9 (18.3%)
<i>N. caninum</i>	0	0	0	1 (2.04%)
Total	26 (50%)	9 (100%)	22 (56%)	13 (26%)
Co-infection*	5	2	4	1

n = total number of animals from each park and captivity). *Co-infection: Seropositivity for both *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* sp.

Seropositive animals were found in all places where this study was performed. Antibodies to *N. caninum* were detected in only one animal, which was kept in captivity (conservationist institute) (Figure 2). The detection of *T. gondii* antibodies was significantly higher in animals from urban parks ($X^2=5.9303$; $P=0.015$) than in animals from captivity, although significant differences were not observed for neither *N. caninum* ($X^2=0.1336$; $P=0.715$) nor *Sarcocystis* sp. ($X^2=2.7932$; $P=0.095$).

FIGURE 2. Map showing the location of the study area, including public parks and a breeding center in Paraná, Brazil, and the respective seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., and *Neospora caninum* at each locality



(A) Location of public parks and the respective seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., and *Neospora caninum*; (B) Location of the conservationist institute with seroprevalence of *T. gondii*, *Sarcocystis* sp., and *N. caninum*; (C) Map of Curitiba and the surrounding area, pinpointing the location of urban parks and the breeding center; (D) Map of Brazil showing the location of Paraná state and Curitiba city.

Serum antibodies titers ranged from 1:25 to 1:150. Antibodies to *T. gondii* were detected at 1:25 titer in 25 animals (all locations) and at 1:50 titer in two animals from Barigui Park. Antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected at 1:25 titer in 22 animals (all locations), at 1:50 titer in 17 animals (all locations), at 1:100 titer in two animals (from captivity) and at 1:150 titer in one animal (from captivity). Antibodies to *N. caninum* were detected at 1:25 titer in one animal from captivity.

Age was not significant for the detection of *T. gondii* ($X^2=0.36151$; $P=0.548$), *N. caninum* ($X^2=5.9761e-30$; $P=1$), and *Sarcocystis* sp. ($X^2=0.0062$; $P=0.937$) antibodies. 63 adults and seven young animals were seropositive to at least one of the protozoa (Table 2).

TABLE 2. Percentage and absolute numbers of young and adult geese seropositive to *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and/or *Neospora caninum*, divided in parks or captivity.

Protozoa	Young	Parks	Captivity	Adult	Parks	Captivity
<i>T. gondii</i>	1 (5.6%)	1 (5.6%)	0	26 (20%)	23 (17.6%)	3 (2.3%)
<i>Sarcocystis</i> sp.	6 (31.5%)	6 (31.5%)	0	36 (27.6%)	27 (20.7%)	9 (6.9%)
<i>N. caninum</i>	0	0	0	1 (0.76%)	0	1 (0.76%)
Total	7 (36.8%)	7 (36.8%)	0	63 (48.4%)	50 (38.4%)	13 (10%)

2.6 DISCUSSION

The occurrence of antibodies to *Sarcocystis* sp. and to *T. gondii* was 28% and 18% of all geese, respectively. The percentage of seropositive animals for *N. caninum* was low, accounting for 0.74% of the total population.

Antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected in geese from all urban parks and from captivity. Most of the geese (90%) in which antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected were considered healthy at clinical examination (without any changes in evaluated parameters). Four animals seropositive to *Sarcocystis* sp. exhibited nonspecific clinical signs at physical examination, such as cloacal prolapse, diarrhea, and the presence of crackles on chest auscultation. Clinical signs in *Sarcocystis* sp. infection are more evident in old-world psittacines, and they are usually related to neurological and respiratory disorders (CRAY et al., 2005; ARCA-RUIBAL, 2016).

Antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected in geese from all urban parks and from captivity. Anseriformes are intermediate hosts of at least four species of *Sarcocystis*: *S. rileyi*, *S. anasi*, *S. albifrons*, and *S. wobeseri* (PRAKAS et al., 2014). However, there are no studies reporting the detection of antibodies to *Sarcocystis* sp. in geese. Antibodies to *Sarcocystis* sp. have been detected in psittacines either with no clinical signs or with nonspecific signs, suggesting that seroconversion did not represent an active infection in these birds but might be related to exposure to the parasite or subclinical infections (CRAY et al., 2005). Diagnosis of sarcosporidiosis is usually performed by post-mortem examinations (KUTKIENÉ et al., 2010, 2012; PRAKAS et al., 2014), and ante mortem examinations are performed by muscle biopsies (CRAY et al., 2005), being therefore underdiagnosed.

Due to the wide variety of *Sarcocystis* species, and the wide variety of definitive and intermediate hosts (FRANCO et al., 2018; PRAKAS & BUTKAUSKAS, 2012), it is difficult to identify the source of goose contamination. Waterfowl that inhabit and feed in shallow waters are more commonly infected than those that inhabit deeper waters

(CHEN et al., 2015), suggesting that the infection occurs most commonly in shallow and marshy waters. This result indicates that the population of geese are exposed to *Sarcocystis* sp. in both public parks and captivity probably infected with sporocysts naturally excreted from original host.

The seroprevalence of *T. gondii* in geese in the present study was 18%. There are no previous reports of serological surveys of *T. gondii* antibodies in *Anser* sp. in Brazil. In Europe, seroprevalence ranges from 4.8%–43% (BARTOVÁ et al., 2009; MAKSIMOV et al., 2011; SANDSTRÖM et al., 2013) and from 4.7%–17% in Asia (MURAO et al., 2008; YAN et al., 2011; YANG et al., 2012; RONG et al., 2014). Geese populations from these studies comprised wild, domestic, and hunted animals.

Several serological tests have been employed to detect antibodies to *T. gondii* in anseriformes, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (MURAO et al., 2008; MAKSIMOV et al., 2011; IBRAHIM et al., 2018), direct agglutination test (DAT) (PRESTRUD et al., 2007), indirect hemagglutination (IHA) (HARFOUSH & TAHOON, 2010; RONG et al., 2014; NUNES, 2016), and modified agglutination test (MAT) (YANG et al., 2012; MANCIANTI et al., 2013; SANDSTRÖM et al., 2013; VERMA et al., 2016). However, there is still disagreement regarding the ideal method for detecting antibodies due to the variability of antigenic proteins, as well as differences in the sensitivity, and quality of commercial kits (SANTOS, 2012).

In two serological surveys of geese in Europe, IFAT was also employed: Maksimov et al. (2011) detected antibodies to *T. gondii* in 25.2% of samples and Bartová et al. (2009) detected them in 43% of samples. It is important to emphasize that these studies were performed on animals from production farms, which are intended for meat consumption. This information is important since *T. gondii* is a zoonosis, the consumption of raw or undercooked meat is one of the main routes of infection (YAN et al., 2011).

Contamination of water by protozoa has also been acknowledged as an important source of infection. The presence of an aquatic environment is one of the few similarities featured in different studies that document seropositive animals from different environments and continents (BARTOVÁ et al., 2009). *T. gondii* oocysts were shown to be viable in the aquatic environment for several months (DUBEY et al., 2003; 2007); hence, surveys of waterfowl infection can serve as good indicators of water and environmental contamination (DUBEY, 2010a; WAAP et al., 2008). Infection of *T. gondii* possibly occurred due to the ingestion of sporulated oocysts in contaminated

pasture and water. Oocysts are shed by definitive hosts (felines), as free-roaming cats have unconditional access to urban parks and they have also been sighted in the conservationist institute.

Waterfowls can be a source of toxoplasmosis infection to humans and domestic animals (MURAO et al., 2008), particularly in places where these animals are hunted and consumed, such as in Canada, Europe, and the United States. The presence of visible muscular cysts (macrocyts) is not common in geese, enabling the meat to be consumed without suspicion of contamination (WOBESER et al., 1981). According to park employees from the urban parks documented in this study, it is not unusual for geese to disappear from parks, which may be due to predation by animals and humans.

A serological survey of *T. gondii* antibodies in capybaras from Tingui Park revealed the presence of antibodies to *T. gondii* in 62.5% of animals (TRUPPEL et al., 2010). In the present study, 22% of geese were seropositive for *T. gondii* and 77.7% were seropositive for *Sarcocystis* sp., endorsing the need to monitor environmental contamination in Curitiba's urban parks.

Nunes (2016) performed a serological survey of *T. gondii* antibodies in ducks (*Cairina moschata*) sent to a slaughterhouse in Pará, Brazil, and verified a seroprevalence rate of 16.28%, similar to the results of the present study (18%). According to Nunes (2016), the risk of infection is higher in animals raised in extensive systems, a fact that was also supported by the findings of our study, where we found seropositivity to *T. gondii* to be higher in animals from public parks.

The role of birds in the *N. caninum* cycle is still unknown. It has been suggested that they might participate as intermediate hosts, particularly since the report of an immune response to and the presence of parasite DNA in raptors and passerines (GONDIM et al., 2010; DARWICH et al., 2012; MOLINA-LOPEZ et al., 2012). Rocchigiani et al. (2017) reported seropositivity in 34.5% of ducks and mallards (*Anas* sp.) via IFAT in Italy, and suggested that birds that feed on pasture or water plants (like waterfowl) can ingest oocysts and contribute to the transmission of the parasite in the sylvatic cycle as a potential source of infection. In the present study, antibodies to *N. caninum* were detected in only one goose (from captivity). It is possible that the low occurrence of antibodies to *N. caninum* in this study might take place due to the low rate of seroconversion for *N. caninum* in *Anser* sp. or due to different types of feed.

There was no significant difference between the age of the animals and the detection of antibodies to any of the protozoa ($P>0.05$), however, Sandström et al. (2013) evaluated the occurrence of *T. gondii* in geese in the Arctic and in temperate areas and reported that seroprevalence increases with age, suggesting that these birds undergo rapid seroconversion. This author also suggests that juveniles must be sampled in greater numbers to directly link the site of infection with the environment; since the study population in the present study had few samples from young animals (13% of total), further studies are encouraged to evaluate seroconversion in juvenile geese exposed to urban parks in Curitiba.

2.7 CONCLUSION

In conclusion, we observed that wild animals have a higher occurrence of antibodies to *T. gondii* than animals kept in captivity. Waterfowl are considered good indicators of water and environmental contamination (DUBEY et al., 2012; WAAP et al., 2008), suggesting that urban parks are more contaminated with oocysts in water and soil. *Anser anser* and *A. cygnoides* presented with high seropositivity to *T. gondii* and *Sarcocystis* sp., indicating they may have been exposed to these protozoa in urban parks, and that they may serve as a potential source of infection to other animals. This is the first serological survey of *T. gondii*, *N. caninum*, and *Sarcocystis* sp. in geese from urban parks.

2.8 REFERENCES

- ABOULAILA, M. et al. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* in ducks from Behera Governorate, Egypt. *Journal of Protozoology Research*, v. 21, p. 45–49, 2011.
- ARCA-RUIBAL, B. Systemic diseases. In: SAMOUR, J. (Ed.). *Avian Medicine*. 3rd. ed. St. Louis: Elsevier, 2016. p. 359–433.
- BARTELS, C. J. M.; WOUDE, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*, v. 52, p. 247–257, 1999.
- BÁRTOVÁ, E.; SEDLÁK, K.; LITERÁK, I. Serologic survey for toxoplasmosis in domestic birds from the Czech Republic. *Avian Pathology*, v. 38, n. 4, p. 317–320, 2009.
- BRACONARO, P. et al. Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. *Microbial Pathogenesis*, v. 88, p. 65–72, 2015.
- CHASKDA, A. A. et al. Assessment of potential sources of protozoan contamination between two avian feeding guilds in a conservation area. *Ostrich*, v. 89, n. 1, p. 25–32, 2018.

- CHEN, J. C.; TSAI, Y. J.; WU, Y. L. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild birds in Taiwan. *Research in Veterinary Science*, v. 102, p. 184–188, 2015.
- CONG, W. et al. First report of *Toxoplasma gondii* infection in market-sold adult chickens, ducks and pigeons in northwest China. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.
- CORRÊA, S. H. R. **Estudo epidemiológico de doenças infecciosas em anatídeos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo**. Tese de doutorado. 2007.
- CRAY, C. et al. Serologic Diagnosis of Sarcocystosis in Psittacine Birds: 16 Cases. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 19, n. 3, p. 208–215, 2005.
- DARWICH, L. et al. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 377–381, 2012.
- DONAHOE, S. L. et al. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216–238, 2015.
- DONELEY, B. The physical examination. In: DONELEY, B. (Ed.). **Avian medicine and surgery in practice: companion and aviary birds**. 2nd. ed. Florida: CRC Press, 2016. p. 63–70.
- DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 275–296, 2003.
- DUBEY, J. P. et al. Isolation and Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* From Striped Dolphin (*Stenella coeruleoalba*) From Costa Rica. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 710–711, 2007.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 60–73, 2010a.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010b.
- DUBEY, J. P. et al. **Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology**. [s.l: s.n.]. v. 139
- EL-MORSEY, A. et al. Morphologic and molecular characteristics of *Sarcocystis atraii* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) infecting the common coot (*Fulica atra*) from Egypt. **Acta Parasitologica**, v. 60, n. 4, p. 691–699, 2015.
- FRANCO, C.; SCHNITTGER, L.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. *Sarcocystis*. In: M, F.-C.; L, S. (Eds.). **Parasitic protozoa of farm animals and pets**. Switzerland: Springer, 2018. p. 103–124.
- GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do Norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 123–127, 2000.
- GONDIM, L. S. Q. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1–2, p. 121–124, 2010.
- HARFOUSH, M.; TAHOON, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic ducks, free-range chickens, turkeys and rabbits in Kafr El-Sheikh Governorate, Egypt. **J Egypt Soc Parasitol**, 2010.
- IBRAHIM, H. M. et al. *Toxoplasma gondii*: Prevalence of natural infection in pigeons and ducks from middle and upper Egypt using serological, histopathological, and immunohistochemical diagnostic methods. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, n. December 2017, p. 45–49, 2018.

- KUTKIENE, L. et al. The mallard duck (*Anas platyrhynchos*) as intermediate host for *Sarcocystis wobeseri* sp. nov. from the barnacle goose (*Branta leucopsis*). **Parasitology Research**, v. 107, n. 4, p. 879–888, 2010.
- KUTKIENE, L. et al. Description of *Sarcocystis anasi* sp. nov. and *Sarcocystis albifrons* sp. nov. in birds of the order Anseriformes. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 1043–1046, 2012.
- LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3–4, p. 215–221, 2006.
- MAKSIMOV, P. et al. Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 140–149, 2011.
- MANCIANTI, F. et al. *Toxoplasma gondii* in Waterfowl: The First Detection of this Parasite in *Anas crecca* and *Anas clypeata* from Italy. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 561–563, 2013.
- MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 349–351, 2011.
- MCGUIRE, A. M. et al. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1525–1529, 1999.
- MOLINA-LÓPEZ, R. et al. High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the Common raven (*Corvus corax*) in the Northeast of Spain. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 300–302, 2012.
- MORÉ, G. et al. *Toxoplasma*. In: FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. (Eds.). **Parasitic protozoa of farm animals and pets**. [s.l.] Springer, 2018. p. 149–168.
- MURAO, T. et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in wild waterfowl in Chukotka, Kamchatka, Russia and Hokkaido, Japan. **J Parasitol**, v. 94, n. 4, p. 830–833, 2008.
- NUNES, G. L. **Soroprevalência da infecção pelo *T. gondii* em patos de corte em feiras livres no município de Belém-PA**. [s.l.] UEPA, 2016.
- OTRANTO, D. et al. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 1–2, p. 7–18, 2003.
- OULD-AMROUCHE, A. et al. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. **Veterinary Research**, v. 30, n. 5–6, p. 531–538, 1999.
- PRAKAS, P. et al. Identification and Intraspecific Genetic Diversity of *Sarcocystis rileyi* from Ducks, *Anas* spp., in Lithuania and Finland. **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 5, p. 657–661, 2014.
- PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, v. 58, n. 1, p. 45–58, 2012.
- PRESTRUD, K. W. et al. Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1–2, p. 6–12, 2007.
- RIBEIRO, M. J. M. et al. Soroepidemiologia de *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora* spp. Em Equinos no Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 142–150, 2016.
- ROCCHIGIANI, G. et al. *Neospora caninum* in wild waterfowl: occurrence of parasite DNA and low antibody titers. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 142–145, 2016.

- RONG, G. et al. Seroprevalence, risk factors and genotyping of *Toxoplasma gondii* in domestic geese (*Anser domestica*) in tropical China. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–4, 2014.
- SANDSTRÖM, C. A. M. et al. Latitudinal variability in the seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in non-migrant and Arctic migratory geese. **Veterinary Parasitology**, v. 194, n. 1, p. 9–15, 2013.
- SANTOS, M. **Frequência da infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas caipira e frangos de corte em regiões dos Estados do Rio Grande do Norte e Paraíba** **Frequência da infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras e frangos de corte em regiões dos estados do Rio**. [s.l.: s.n.].
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, 2000.
- TRUPPEL, J. H. et al. *Toxoplasma gondii* in Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) antibodies and DNA detected by IFAT and PCR. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 141–146, 2010.
- VERMA, S. K. et al. Toxoplasmosis in geese and detection of two new atypical *Toxoplasma gondii* strains from naturally infected Canada geese (*Branta canadensis*). **Parasitology Research**, v. 115, n. 5, p. 1767–1772, 2016.
- WAAP, H. et al. Epidemiological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in urban pigeons from the area of Lisbon (Portugal). **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3–4, p. 306–309, 2008.
- WOBESER, G.; LEIGHTON, F. A.; CAWTHORN, R. J. Occurrence of Sarcocystis Lankester, 1882, in wild geese in Saskatchewan. **Canadian Journal of Zoology**, v. 59, n. 8, p. 1621–1624, 1981.
- YAN, C. et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in the domestic goose (*Anser domestica*) in Southern China. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 4, p. 299–302, 2011.
- YANG, N. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Slaughtered Pigs and Cattle in Liaoning Province, Northeastern China. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 2, p. 440–441, 2012.
- ZOU, Y. et al. First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in poultry meat intended for human consumption in eastern China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, n. August, p. 172–174, 2017.

3 SEROTYPE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PROFILES OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM CLOACAL SWABS OF GEESE (*ANSER SPP.*) FROM PUBLIC PARKS AND CONSERVATIONIST INSTITUTE IN PARANÁ STATE

3.1 ABSTRACT

The presence of waterfowls is frequent in parks and recreational areas with watercourses; these animals are in close contact with people, being possible carriers of bacteria with the potential to cause zoonosis. There is a lack of data on *Escherichia coli* serogroups isolated from these animals and their role in the spread of bacterial resistance. Thus, the present study is aimed at isolating, serotyping and determining the antimicrobial susceptibility profile of *E. coli* from 52 geese (*Anser spp.*) cloacal swabs from public parks in the city of Curitiba and a conservationist institute of the metropolitan area of Curitiba, State of Paraná, Brazil. Forty-one isolates of *E. coli* (78.84%) were obtained, with higher prevalence in one of the parks (76.92%) and in the conservationist institute (90%). No isolates were reactive to the serogroups tested (O26, O55, O111 and O119) nor showed self-agglutination. Of the 41 isolates submitted to 11 antimicrobials, 35 (86.3%) were sensitive to all the principles used (Amikacin, Ampicilin, Amoxicilin+clavulanic acid, Gentamicin, Ceftazidime, Ceftriaxone, Cefepime, Ciprofloxacin, Nalidixic acid, Norfloxacin and sulfa+trimethoprim). Only one (2.43%) showed resistance to ampicillin and six (14.63%) to sulfa + trimethoprim. Analysis of a larger number of samples for phenotypic pattern definition is indicated, expanding the genotypic investigations of these serogroups. Results indicate advisable the adequate distancing of visitors to the aquatic birds and provide a first and preliminary evaluation of *E. coli* strains obtained from geese in southern Brazil.

KEY WORDS: Waterfowl, Antibiotics, Enterobacteria

3.2 RESUMO

A presença de anseriformes é frequente em parques e áreas recreativas com cursos d'água e esses animais estão em contato com as pessoas, sendo possíveis carreadores de bactérias com potencial de causar zoonose. Há falta de dados sobre os sorogrupos de *Escherichia coli* isolados desses animais e seu papel na disseminação de resistência bacteriana. Dessa forma, o presente estudo objetivou isolar, sorotipar e determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *E. coli* provenientes de swabs cloacais de 52 gansos (*Anser spp.*) de parques públicos da cidade de Curitiba e de um mantenedouro em São José dos Pinhais, Região Metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná, Brasil. Foram obtidos 41 isolados de *E. coli* (78,84%), com maior prevalência em um dos parques (76,92%) e no mantenedouro (90%). Nenhum isolado foi reagente aos sorogrupos testados (O26, O55, O111 e O119) ou apresentou auto aglutinação. Dos 41 isolados submetidos aos 11 antimicrobianos, 35 (86,3%) foram sensíveis a todos os princípios utilizados (Amikacina, Ampicilina, Amoxicilina+ácido clavulânico, Gentamicina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefepime, Ciprofloxacina, Ácido nalidíxico, Norfloxacina e Sulfa+trimetoprim). Apenas um (2,43%) apresentou resistência à ampicilina e seis (14,63%) à sulfa+trimetoprim. Indica-se análise de um maior número de amostras para

definição de padrão fenotípico, ampliando as investigações genotípicas destes sorogrupos. Os resultados auxiliam a compreender a disseminação e caracterizar os fatores de virulência e potencial zoonótico dessas cepas. Os resultados indicam o distanciamento adequado dos visitantes das aves aquáticas e fornecem a primeira e preliminar avaliação de cepas de *E. coli* obtidas de gansos no sul do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Aves aquáticas, Antibióticos, Enterobactérias

3.3 INTRODUCTION

Waterfowls (geese, ducks and swans) are commonly found in zoos and parks in urban centers, being potential carriers of bacteria that cause zoonosis (ELMBERG et al., 2017). Humans in direct or indirect contact with animals in parks have been the focus of research, due the possible relation of contamination of surface water used for recreation and disease outbreaks worldwide (HRUDEY et al., 2002; YODER et al., 2008). Analysis of faecal contamination indicator bacteria such as *Escherichia* has provided information on recreational water quality and although studies have shown contamination of these sources by bird droppings (BOEHM et al., 2003; STANDRIDGE et al., 1979; STOECKEL et al., 2004) there are still few studies on the origin of bacterial contamination.

E. coli is one of the most investigated bacteria as it is a component of the intestinal microbiota of some avian Order (WOBESER, 2006), however pathogenic strains pose a risk to human and animal health. Waterfowls may play a role so far underestimated as they contaminate the environment with faeces (EWERS et al., 2009). Because it is a highly diverse bacterium concerning surface antigens, such phenotypic identification is important for monitoring the major serogroups associated with particular hosts (SOUZA et al., 2007).

Another way to phenotypically characterize *E. coli* strains is to determine the antimicrobial susceptibility profile, as the emergence of resistant microorganisms is a major threat to global public health (THAKUR; GRAY, 2019). Agnew et al. (2016) verified the role of wild birds as reservoir and diffusers of resistant strains.

It is believed that with low exposure of wildlife to antibiotics, antimicrobial resistance levels are also low, however, with the interaction of animals with humans and farm animals, changes in their original microbiota occur, which may influence resistance mechanisms (DIAS; TORRES; FONSECA, 2015).

Free-living bird populations, such as geese, may eventually transmit pathogens to humans through direct or indirect contact through water used for

plantation consumption, recreation or irrigation (COLE et al., 2005) and immunosuppressed people are particularly susceptible to infections; therefore, routine outdoor activities may present opportunities for contact with zoonotic pathogens and ingestion or contact with contaminated water may result in indirect exposure to animal urine and feces (TREVEJO; BARR; ROBINSON, 2005).

The objectives of the present study were to isolate, serotype and determine the antimicrobial susceptibility profile of *E. coli* isolates from cloaca swabs of geese (*Anser* spp.) from two Curitiba public parks and a conservationist institute in the metropolitan area of Curitiba, in the state of Paraná, Brazil.

3.4 MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Paraná (protocol number 125/2016) and by the Parks and Squares Committee of the Curitiba City Hall.

3.4.1 Study Locations

Tingui Park (25 ° 23'36.05 "S 49 ° 18'21.71" W) is situated on the banks of the Barigui River and São Lourenço Park (SLP) (25 ° 23'2,400 "S 49 ° 15'55,440 "W) on the banks of the Belém river and both shelter a great diversity of fauna and flora. Both parks are used by families for recreational activities and are surrounded by residential area and the animals evaluated live in watercourses of rivers in the city of Curitiba.

The Anami (conservationist institute) is a wildlife keeper located in São José dos Pinhais (Curitiba metropolitan area) (25 ° 35'17.624 "S 49 ° 10'49.184" W) and holds several mammal and bird species captive, including domestic geese (*Anser anser*). The animals are provided with artificial lakes as habitat.

3.4.2 Sampling

Cloacal swab samples from 52 geese (*Anser anser*, *Anser cygnoides* and hybrids) of both sexes were collected between June 2017 and February 2018 in the two public parks (nine animals from Tingui Park and 13 from São Lourenço Park) and 30 from the Anami conservationist institute. The animals were captured in nets, with feeding bait to perform the procedures. The birds were individually identified by numbered leg bands and subjected to individual physical examination. Samples were

collected using Cary-Blair sterile swabs, identified and kept refrigerated for up to six hours for analysis.

3.4.3 Isolation and biochemical identification of *Escherichia coli*

From the cloacal content samples, the streaking was performed using a nickel-chromium loop in MacConkey agar Petri plates. The plates were incubated at 37°C for 24 to 48 hours and lactose-fermenting colonies suggestive of *E. coli* were subjected to complementary biochemical tests using the enterobacteriaceae identification kit (LABORCLIN®). *E. coli* strain ATCC 25922 was used as a control.

3.4.4 Antimicrobial Sensitivity Profile

E. coli isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing by the disk diffusion method, according to Bauer et al. (1966) on Mueller-Hinton agar plates, according to the Brazilian Antimicrobial Susceptibility Testing Committee (BrCAST). Disks were used and quality control was performed with *E. coli* strain ATCC 25922. The antimicrobials used and their concentrations were: amikacin (30µg), ampicillin (10µg), amoxicillin + clavulanic acid (30µg), gentamicin (10µg), ceftazidime (30µg), ceftriaxone (30µg), cefepime (30µg), ciprofloxacin (5µg), nalidixic acid (30µg), norfloxacin (10µg) and sulfa + trimethoprim (25µg). Interpretive criteria were performed according to BrCAST standards, except for the ceftazidime disk, which used the interpretative criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016) because of its concentration.

3.4.5 Serotyping

Somatic O antigens were identified by using the slide agglutination technique utilizing the PROBAC kit. *E. coli* colonies grown on blood agar were mixed with the aid of a nickel-chromium loop, a drop of NaCl Solution (0.85% NaCl) and a drop of polyvalent serum against O26, O55, O111 and O119 antigens.

3.5 3.4 RESULTS AND DISCUSSION

E. coli isolation was obtained from 41 samples (78.84%), on the 52 swabs collected from the geese (*Anser spp.*) from both public parks and the conservationist institute (Table 3).

TABLE 3. Absolute number (n) and frequency (%) of *Escherichia coli* isolated from cloacal swabs of 52 geese (*Anser* spp.) from two public parks and a conservationist institute, Curitiba and metropolitan area.

LOCATIONS	n total	n (%) Positives
Tingui	9	4 (44,4%)
São Lourenço	13	10 (76,92%)
Anami Institute	30	27 (90%)
TOTAL	52	41 (78,84%)

Similar studies with geese in Brazil are nonexistent. In Ceará (Brazil), a study was performed on ducks (*Cairina moschata*), and 5% of *E. coli* from feces and cloacal swabs of privately-owned animals were identified (SILVA et al., 2014). In the United States, 447 (301) *E. coli* isolates from 447 free-living Anatidae specimens residing in six public parks were isolated from faecal specimens and according to Fallacara et al. (2001) the difference in isolation rate may be related to contamination and/or exposure of animals, and fluctuation in the frequency of isolation may be due to different sources of contaminated water. In other countries and with other Anatidae species (*Branta canadensis*, *Anas platyrhynchos*, *Anser canagicus* and *Anser anser*) there was also a high occurrence of isolation, with 75.5% in Poland (LITERAK et al., 2010), 100% in Germany (GUENTHER et al., 2010), 93% in the Netherlands (KUCZKOWSKI et al., 2016), 93% in Alaska (RAMEY et al., 2017), 72.6% in Canada (VOGT et al., 2019).

In the present study there was isolation and growth of *E. coli* in all collection sites, with higher prevalence in the São Lourenço Park and in the maintainer. The high prevalence of isolated *E. coli* in SLP may be due to the presence of residential sewage. In the maintenance area, the prevalence is probably related to the presence of standing water in the artificial lakes, where bacteria from the faeces of the birds themselves may proliferate, due to non-filtration and/or treatment of the water in which they live.

In a study of the prevalence of *E. coli* in 393 fecal samples of Canadian geese collected during 11 months in the United States, Kullas et al. (2002) determined the prevalence of *E. coli* in 37% of samples with 2% variations in the cold periods and 94% in the warm periods along the year. Also in the United States, Ishii et al., (2007) in determining the origin of *E. coli* present in water, sand and beach sediments, found that waterfowls are the major responsible for the contamination of this microorganism on the beaches in the summer months. Therefore, identification of the contaminating source of *E. coli* from watercourses is important to establish proper procedures for assessment and reduction of aquatic contamination.

The importance of knowing the susceptibility profile of *E. coli* present in the microbiota of healthy geese is emphasized, and there may be comparison and definition of resistance patterns in cases of colibacillosis. These same authors concluded that while few people come into direct contact with park geese, many often come into contact with faeces or water and grass contaminated by animal faeces, so the risks of faecal contamination of the environment have been questioned for its potential role of this animal species for health (CONOVER; CHASKO, 1985; COOPER; KEEFE, 1997).

In the present study, of the 41 isolates submitted to the 11 antimicrobials tested, 35 (86.3%) were sensitive to all the tested principles. One isolate (2.43%) showed resistance to ampicillin and six (14.63%) to sulfa + trimethoprim (Table 4).

In urban or suburban areas endemic wild species have adapted to human dominated environments and mixed with domestic species. According to Backues (2015) there is a great concern regarding the risk of transmission of potential pathogens, harmful to wild, captive and domestic populations. In this study it is possible that the low rate of antimicrobial resistance may have been influenced by the non-migration or movement of these animals between city parks. This is the first study of the *E. coli* sensitivity profile of geese from public parks in southern Brazil.

TABLE 4. Absolute (n) and relative (%) resistance to 41 strains of *Escherichia coli* isolated from geese cloacal swab (*Anser* spp.) from public parks and conservationist institute from Curitiba and metropolitan area.

ANTIMICROBIAN	PARK AND CAPTIVE RESISTANCE			
	Tingui	São Lourenço	Anami Institute	Total
Amikacin	-	-	-	-
Ampicillin	-	1 (2,43%)	-	1 (2,43%)
Amoxicillin + Clavulanic acid	-	-	-	-
Gentamicin	-	-	-	-
Ceftazidime	-	-	-	-
Ceftriaxone	-	-	-	-
Cefepime	-	-	-	-
Ciprofloxacin	-	-	-	-
Nalidixic Acid	-	-	-	-
Norfloxacin	-	-	-	-
Sulfa + Trimetoprim	-	1 (2,43%)	5 (12,19%)	6 (14,63%)

Studies in public parks in Brazil regarding antimicrobial resistance are nonexistent. However, in other countries similar studies and data regarding sulfa + trimethoprim resistance were performed in the United States and Poland (FALLACARA et al., 2004; LITERAK et al., 2010) with cloacal samples obtained from Canadian geese and ducks (*A. platyrhynchos*).

Results with higher resistance indices were found by Kim et al. (2016) in duck slaughterhouses in Korea. When analyzing the cecal content of 400 ducks from 40 farms, of the 364 isolates, 90.9% were resistant to more than two antimicrobials. The strains resistance to sulfa + trimethoprim and ampicillin was also higher than the present study, with 61.5% and 48.6% resistance, respectively. Results very similar to the present study were found by Vogt et al. (2019) in Canada, where *B. canadensis* swabs isolated 72.6% *E. coli* with resistance to the same class of antimicrobials: 5% ampicillin and 4.3% to Sulfafurazole (Sulfa and Oxazole)

In a study carried out in Zimbabwe by Dube & Mbanga (2018) 41% (12/29) of *E. coli* strains were isolated from cloacal swabs of geese with different bacterial resistance patterns than those observed here, having 75% resistance to ampicillin. The authors also found indices of resistance to other antimicrobials such as 10% for ciprofloxacin, 30% for nalidixic acid and 10% for gentamicin, in which in this study were all sensitive.

Agnew et al. (2016) by analyzing the antimicrobial resistance profile of enterobacteriaceas isolated from migratory geese faeces, found such animals as reservoirs and disseminators of resistance genes in ecosystems throughout the migratory range, as they often forage and defecate in public areas, presenting a risk potential for human health.

The *E.coli* strains isolated from waterfowls have high similarity to strains isolated from water and sewage as verified by Ahmed et al. (2008) where in order to compare different sources of *E. coli* (pond water, sewage and chicken droppings, waterfowls and dogs) and to identify genetic pattern among the strains, it was demonstrated that those obtained from waterfowls showed high similarity with strains isolated in water and sewage, identifying them as potential sources of environmental contamination.

Working with feces and swabs from 162 Canadian geese, a large difference in resistance patterns was observed depending on the habitat of the sampled animals. There was a higher prevalence of antimicrobial resistance in animals in direct contact

with agricultural residues and little or no resistance observed in animals without such contact, as also found in our study, suggesting that geese may be potential vectors of zoonotic pathogens, including resistant strain variants (COLE et al., 2005). Many resistance genes come from commensal bacteria in the gastrointestinal tract (ANDREMONT, 2003) where microorganisms exist at a high density allowing horizontal transfer of resistance genes between strains of one or more species (or genera).

Given these different sensitivity profiles among *E. coli* isolates in waterfowls, constant monitoring of this phenotypic trait is suggested to evaluate a possible spread of resistance genes over time.

Concerning the study of the present article, regarding serotyping of isolates, none was reactive to the serotypes tested (O26, O55, O111, O119), which are more commonly related to childhood diarrhea. However, Kullas et al. (2002) in the United States found that 24.5% of *E. coli* isolates from urban geese feces were compatible with those associated with disease in humans. In this study, 147 isolates of *E. coli* were submitted to a panel of 181 monovalent O antisera, the serotype O8 being the most prevalent. There are currently 174 known *E. coli* O antigens (DEBROY; ROBERTS; FRATAMICO, 2011) in addition to a large number of nontypeable strains as verified by Wang et al. (2010) where it was not possible to type 20 isolates out of a total of 254 pathogenic *E. coli* strains isolates from ducks.

The lack of research on geese serogroups in Brazil and the scant studies in other countries (CHENG et al., 2008; JIN et al., 2008; WANG et al., 2010; YU et al., 2008) emphasize the need to identify the somatic antigens present in the microbiota of this animal species in order to understand the pathogenesis in cases of outbreaks of colibacillosis.

Importantly, the serogroups tested are not requirements for Anatidae, therefore, negative serogroups do not exclude the risk of pathogenic strains (or APEC - Avian Pathogenic *Escherichia coli*) for avian colibacillosis or zoonotic strains. Therefore, the expansion of the panel to serogroups more related to waterfowl is suggested.

The lack of natural predators, the sharing of environments with different hosts and the easy adaptation to different niches make large waterfowl populations to settle in the urban environment. As many lakes are often visited by people with recreational purposes, they question the role of birds as transmitters of diseases to the public

(BÖNNER et al., 2004; ZHI et al., 2015). Information on seasonal behavior, population distribution patterns, environmental conditions, prevalence of virulent strains in geese as well as recreational patterns of humans in parks are important for estimating the likelihood that people may encounter virulent bacterial strains (KULLAS et al., 2002).

3.6 CONCLUSION

We provide preliminary results on the characterization and resistance of *E. coli* obtained from geese of public parks. As scarce previous data is available, genotyping of strains are planned, for mapping their epidemiology, dispersal dynamics and environmental impact.

3.7 REFERENCES

- AGNEW, A. et al. Insights into antimicrobial resistance among long distance migratory East Canadian High Arctic light-bellied Brent geese (*Branta bernicla hrota*). **Irish Veterinary Journal**, v. 69, n. 1, p. 1–5, 2016.
- AHMED, W. et al. Population similarity analysis of indicator bacteria for source prediction of faecal pollution in a coastal lake. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 8, p. 1469–1475, 2008.
- ANDREMONT, A. Commensal Flora May Play Key Role in Spreading Antibiotic Resistance. **Asm News**, v. 69, n. 12, p. 601–607, 2003.
- BACKUES, K. A. Anseriformes. In: MILLER, R. . E.; FOWLER, M. (Eds.). . **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine**. 8th. ed. St. Louis: Elsevier, 2015. p. 116–126.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, 1966.
- BOEHM, A. B. et al. Tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach: Case study at Avalon Bay, Catalina Island, California. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 673–680, 2003.
- BÖNNER, B. M. et al. Do Canada geese (*Branta canadensis* Linnaeus, 1758) carry infectious agents for birds and man? **European Journal of Wildlife Research**, v. 50, n. 2, p. 78–84, 2004.
- CHENG, D.-R. et al. Isolation and Identification of *Escherichia coli* from Goose. **Progress in Veterinary Medicine**, v. 10, p. 41–44, 2008.
- COLE, D. et al. Free-living Canada Geese and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 935–938, 2005.
- CONOVER, M. R.; CHASKO, G. G. Nuisance Canada goose problems in the eastern United States. **Wildlife Society Bulletin**, v. 13, n. 3, p. 228–233, 1985.
- COOPER, J. A.; KEEFE, T. Urban Canada goose management: procedures and policies. **Wildl. and NAt. Res. Conf. Trans.**, v. 62, p. 412–430, 1997.
- DEBROY, C.; ROBERTS, E.; FRATAMICO, P. M. Detection of O antigens in *Escherichia coli* . **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 169–185, 2011.

- DIAS, D.; TORRES, R. T.; FONSECA, C. Assessment of antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates and screening of *Salmonella* spp. in wild ungulates from Portugal. **Research in Microbiology**, p. 1–10, 2015.
- DUBE, N.; MBANGA, J. Molecular characterization and antibiotic resistance patterns of avian fecal *Escherichia coli* from turkeys, geese, and ducks. **Veterinary World**, v. 11, n. 6, p. 859–867, 2018.
- ELMBERG, J. et al. Potential disease transmission from wild geese and swans to livestock, poultry and humans: a review of the scientific literature from a One Health perspective. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 7, n. 1, p. 1300450, 2017.
- EWERS, C. et al. Mallard ducks – a waterfowl species with high risk of distributing *Escherichia coli* pathogenic for humans. **Environmental Microbiology Reports** (2009), v. 1, n. 6, p. 510–517, 2009.
- FALLACARA, D. M. et al. Fecal Shedding and Antimicrobial Susceptibility of Selected Bacterial Pathogens and a Survey of Intestinal Parasites in Free-Living Waterfowl. **Avian Diseases**, v. 45, n. 1, p. 128–135, 2001.
- FALLACARA, D. M. et al. Survey of Parasites and Bacterial Pathogens from Free-Living Waterfowl in Zoological Settings Survey of Parasites and Bacterial Pathogens from Free-Living Waterfowl in Zoological Settings. **Avian Diseases**, v. 48, p. 759–767, 2004.
- GUENTHER, S. et al. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1–2, p. 219–225, 2010.
- HRUDEY, S. E. et al. Walkerton: Lessons learned in comparison with waterborne outbreaks in the developed world. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 1, n. 6, p. 397–407, 2002.
- INSTITUTE, C. AND L. S. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. [s.l.: s.n.].
- ISHII, S.; MEYER, K. P.; SADOWSKY, M. J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5703–5710, 2007.
- JIN, W. JIE et al. Distribution of Virulence-Associated Genes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates in China. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 12, p. 1511–1515, 2008.
- KIM, H. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from ducks in Korea. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 2, p. 91–95, 2016.
- KUCZKOWSKI, M. et al. Virulence Genes and the Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli*, Isolated from Wild Waterbirds, in the Netherlands and Poland. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 8, p. 528–536, 2016.
- KULLAS, H. et al. Prevalence of *Escherichia coli* serogroups and human virulence factors in faeces of urban Canada geese (*Branta canadensis*). **International Journal of Environmental Health Research**, v. 12, n. 2, p. 153–162, 2002.
- LITERAK, I. et al. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Bacteria, Including Strains with Genes Encoding the Extended-Spectrum Beta-Lactamase and QnrS, in Waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 24, p. 8126–8134, 2010.
- RAMEY, A. M. et al. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Migratory Birds Inhabiting Remote Alaska. **EcoHealth**, v. 15, n. 1, p. 72–81, 2017.

- SILVA, E. E. et al. Pesquisa de enterobactérias em patos domésticos (*Cairina moschata*) de propriedades localizadas em quatro municípios do Ceará , Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 16–21, 2014.
- SOUZA, C. et al. Caracterização sorológica dos antígenos de superfície em cepas de *Escherichia coli* isoladas de suínos com diarreia no estado do paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 51–55, 2007.
- STANDRIDGE, J. H. et al. Effect of waterfowl (*Anas platyrhynchos*) on indicator bacteria populations in a recreational lake in Madison, Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 547–550, 1979.
- STOECKEL, D. M. et al. Comparison of seven protocols to identify fecal contamination sources using *Escherichia coli*. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 22, p. 6109–6117, 2004.
- THAKUR, S.; GRAY, G. C. The mandate for a global “one health” approach to antimicrobial resistance surveillance. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 2, p. 227–228, 2019.
- TREVEJO, R. T.; BARR, M. C.; ROBINSON, R. A. Important emerging bacterial zoonotic infections affecting the immunocompromised. **Veterinary Research**, v. 36, p. 493–506, 2005.
- VOGT, NA. A. et al. Carriage of *Campylobacter*, *Salmonella*, and Antimicrobial-Resistant, Non-specific *Escherichia coli* by Waterfowl Species Collected from Three Sources in Southern Ontario, Canada. **Journal of wildlife diseases**, v. 55, n. 4, p. 000–000, 2019.
- WANG, Y. et al. Distribution of serotypes and virulence-associated genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from ducks. **Avian Pathology**, v. 39, n. 4, p. 297–302, 2010.
- WOBESER, G. A. **Essential of Disease in Wild Animals**. 1st. ed. [s.l.] Blackwell, 2006.
- YODER, J. et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance for Waterborne Disease and Outbreaks Associated with Recreational Water Use and Other Aquatic Facility-Associated Health Events — United States , 2005 – 2006 and Surveillance for Waterborne Disease and Ou. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 57, n. 9, p. 39–63, 2008.
- YU, X.-H. et al. Serotype Identification and Virulence-associated Genes Analysis of Pathogenic *E.coli* Isolated from Ducklings. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, n. 01, p. 53–59, 2008.
- ZHI, S. et al. Assessing host-specificity of *Escherichia coli* using a supervised learning logic-regression-based analysis of single nucleotide polymorphisms in intergenic regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 92, p. 72–81, 2015.

4 INTERVALOS DE REFERÊNCIA DE HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE GANSOS (*ANSER SPP.*) DE VIDA LIVRE E CATIVEIRO

4.1 RESUMO

Anseriformes (gansos, patos e cisnes) são aves adaptadas a diferentes ambientes e são comumente mantidas em zoológicos e parques de centros urbanos. A hematologia é considerada parte fundamental no diagnóstico laboratorial na medicina aviária sendo indispensável para avaliar a sanidade dos indivíduos, monitorar o progresso de doenças, avaliar respostas terapêuticas e estabelecer prognósticos. O objetivo do presente estudo foi definir intervalos de referência e comparar médias hematológicas e bioquímicas de *Anser spp.* adultos e saudáveis de vida livre e cativeiro. Amostras de sangue de 84 *Anser spp.* de parques públicos e 42 *A. anser* de cativeiro foram coletadas da veia metatársica medial para estabelecimento de valores hematológicos e bioquímicos séricos (ácido úrico, AST, CK, LDH, albumina, globulina, proteína total, glicose, colesterol, cálcio e fósforo) e presença de hemoparasitas. Os parâmetros eritrocitários foram similares a literatura, bem como de glicose, albumina, globulina, proteína total, cálcio e fósforo. Nos parques, o leucócito predominante foi o linfócito e no cativeiro, os heterófilos, sendo verificada a presença de um pequeno número de bastonetes em animais saudáveis. Os valores de AST, LDH e CK foram maiores do que a literatura, provavelmente devido ao tempo entre a captura e a coleta. Os valores de ácido úrico foram mais baixos em *A. anser* do que nos demais anseriformes encontrados na literatura. Este é o primeiro trabalho a definir IR hematológicos e bioquímicos séricos em *Anser spp.* adultos e saudáveis provenientes de parques e de um cativeiro no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Anseriformes, sangue, parâmetros hematológicos, sanidade

4.2 ABSTRACT

Anseriformes (geese, ducks, and swans) are avian species adapted to different environments, commonly kept in zoos and urban parks. Hematology is considered an essential segment of laboratory diagnosis in avian medicine, for its key role in assessing the individual's health, monitoring diseases' progress, evaluating therapeutic responses, and aid in establishing prognosis. The aim of this study is to characterize the reference intervals (RI) and compare the hematological and biochemical averages of free-living *Anser spp.* adults and ones kept in captivity. Blood samples from 84 *Anser spp.* from public parks and 42 captive *A. anser* were collected from the medial metatarsal vein. Serum hematological and biochemical values were measured (uric acid, AST, CK, LDH, albumin, globulin, total protein, glucose, cholesterol, calcium, and phosphorus) and presence of hemoparasites was evaluated. The peripheral blood erythrocyte parameters were similar to the literature, as well as glucose, albumin, globulin, total protein, calcium, and phosphorus. Lymphocytes were the predominant leukocyte in wild geese, while heterophiles were predominant in geese kept in captivity. A small number of band cells were detected in healthy animals. The values of AST, LDH, and CK were higher than described in the literature, which might be explained due to the stress between the time of capture and sample collection. The uric acid values were lower in *A. anser* than in the other Anseriformes reported in the literature. This is the first study that defines serum hematological and biochemical RI in healthy *Anser spp.* adults from urban parks vs in captivity in Brazil.

KEY-WORDS: Anseriformes, Blood, Hematology, Avian health

4.3 INTRODUÇÃO

Anseriformes (gansos, patos, marrecos e cisnes) são aves adaptadas a diversos ambientes, geralmente, mas não exclusivamente aquáticos, e são comumente mantidas em zoológicos e parques urbanos (ELMBERG et al., 2017; ROUTH; SANDERSON, 2009). Populações de aves de vida livre, como os gansos, podem eventualmente transmitir patógenos para os seres humanos por contato direto ou indireto por meio da água utilizada para consumo, recreação ou irrigação de plantações (COLE et al., 2005).

Ao longo da evolução, as aves desenvolveram alternativas para enfrentar situações como má nutrição, desidratação, migrações e manutenção da reprodução (HARR, 2002). Os anatídeos são susceptíveis a agentes etiológicos virais, bacterianos, fúngicos e parasitários, sendo necessária a vigilância epidemiológica de forma preventiva (KAPPERUD *et al.*, 1983; DRAWN *et al.*, 2004).

A hematologia é considerada parte integral do diagnóstico laboratorial na medicina aviária. A avaliação sanguínea é uma ferramenta indispensável para avaliar a sanidade dos indivíduos, monitorar o progresso de doenças, avaliar respostas terapêuticas e estabelecer prognósticos (SAMOUR, 2006). Diferenças anatômicas e funcionais entre aves e mamíferos afetam os valores da bioquímica sanguínea e sua interpretação (HARR, 2002).

Os valores normais dos parâmetros hematológicos de cada espécie aviária possuem ampla variedade devido as influências intrínsecas e extrínsecas. Os valores estão sujeitos a grande variabilidade, resultado de diferentes ambientes e práticas de manejo pois afetam as respostas fisiológicas (CAMPBELL, 2012). Quando em conjunto com outras informações clínicas e laboratoriais, a bioquímica sérica é útil para detecção de doenças dos sistemas gastrointestinal, hepático, renal, respiratório, cardiovascular, hematopoiético, endócrino e imunológico (RAIDAL, 2020).

Quando intervalos de referência (IR) são estabelecidos em uma população saudável, tais dados permitem um melhor entendimento da homeostase e interpretação de possíveis sinais clínicos e mudanças patofisiológicas (VAZ et al.,

2016). Devido a dificuldade de coleta de um grande número de amostras relacionadas ao tamanho, procedência (vida livre ou cativeiro) e estado do animal, diretrizes foram criadas para validação de IR com diferentes números amostrais (FRIEDRICHS et al., 2012).

Decisões de prosseguir um diagnóstico ou iniciar um tratamento geralmente são baseadas em valores fora dos IR, logo, a coleta e análise dos valores de referencia devem ser obtidos com cuidado (FRIEDRICHS et al., 2012). Não existem parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Anser* spp. na literatura, obtidos em mais de 31 animais (JAHANTIGH; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, 2016). Para outras espécies de anseriformes existem determinações de IR inclusive em diferentes períodos do ano (BHATTACHERJEE et al., 2018; BOLLINGER et al., 1989; CHARLES-SMITH et al., 2014; DOLKA et al., 2014; ELARABANY, 2018; MILANI et al., 2012; SHAVE; HOWARD, 1976).

Determinar o IR hematológico e bioquímico de *Anser* spp. adultos residentes nos parques urbanos é importante para monitorar parâmetros de saúde individuais e populacionais e definir dados de normalidade. Pela proximidade aos seres humanos, gansos urbanos e suburbanos podem se infectar com zoonoses e a realização da monitoração sanitária dessa população é importante para a saúde pública (CHARLES-SMITH et al., 2014). O objetivo do presente trabalho foi definir intervalos de referências e comparar as médias hematológicas e bioquímicas para *Anser* spp., adultos e saudáveis de vida livre e de cativeiro bem como verificar presença de hemoparasitas.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas das amostras biológicas foram realizadas em três parques públicos da cidade de Curitiba, Paraná (Parque Tingui, São Lourenço e Barigui) e em um criadouro conservacionista em São José dos Pinhais (Instituto ANAMI), região metropolitana de Curitiba com aprovação do comitê de ética (Protocolo 125/2016) e pela prefeitura de Curitiba, no período de julho de 2017 a fevereiro de 2018. Os critérios de inclusão para determinação dos parâmetros hematológicos foram animais saudáveis (determinado por exame físico completo com definição de escore corporal, pesagem, avaliação de olhos, bico, cavidade oral e plumagem, palpação de asas e membros pélvicos, palpação abdominal e auscultação cardiorrespiratória) e idade (sendo os adultos definidos por peso maior que 2,5kg e plumagem completa).

4.4.1 Locais de coleta

O Parque Barigui (25°25'34.52 "S 49°18'27.03" W) está localizado as margens do rio Barigui e grupos de gansos (*Anser anser*, *Anser cygnoides* e híbridos) são observados coabitando com patos, rapinantes, passeriformes e mamíferos.

O Parque Tingui (25°23'36.05 "S 49°18'21.71" W) também está localizado as margens do Rio Barigui e aproximadamente 10 gansos coabitam com grande variedade de aves, répteis e mamíferos nativos.

O Parque São Lourenço (25°23'2.400"S 49°15'55.440"W) está localizado as margens do rio Belém e possui cerca de 70 gansos, em contato com diversas outras espécies. Nos parques públicos os animais se alimentam de grama e comida fornecida pelos visitantes (como milho, pipoca e pão).

O Instituto ANAMI (25°35'17.624"S 49°10'49.184"W) é um criadouro conservacionista situado em São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba. Possui grande quantidade de espécies de mamíferos e aves, incluindo 49 gansos domésticos (*Anser anser*). Os animais são mantidos em dois grandes recintos (com aproximadamente 3000m²cada) com lagos artificiais e coabitam com patos e cisnes e são alimentados com ração comercial, frutas, vegetais e grama.

4.4.2 Coleta de amostras e procedimentos laboratoriais

Foram coletadas amostras de sangue de 84 (*Anser anser*, *Anser cygnoides* e híbridos) e 42 gansos (*Anser anser*) adultos e saudáveis (atestado após exame físico completo) nos parques e cativeiro, respectivamente. A captura nos parques foi realizada com auxílio de armadilhas de rede e tecido com presença de alimento. Após a captura, a contenção física foi realizada para exame físico. A logística de coleta foi diferenciada em cada parque e os períodos de espera entre a captura (fechamento nas armadilhas) e coleta de sangue foi variável, sendo no máximo de três horas. No cativeiro, os animais foram fechados em locais de cambiamento (local onde os animais dormem) para aguardar o exame físico e coleta de amostras e o tempo de espera foi de no máximo de seis horas.

Amostras de sangue foram coletadas da veia metatarsal medial utilizando seringas estéreis de 5mL com agulhas 25x7 que foram distribuídas em dois tubos: um microtubo com heparina de sódio e um tubo sem anticoagulante para obtenção do

soro. Duas extensões sanguíneas de amostras de sangue de cada animal foram realizadas no momento da coleta, sem anticoagulante.

As amostras foram enviadas refrigeradas ao laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A contagem de eritrócitos e leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer (*“Improved Neubauer chamber”*) no sangue previamente diluído em azul de cresil a 0,01% (ZINKL, 1986). O hematócrito foi realizado pela técnica de microhematócrito, em tubos capilares de vidro centrifugados a 12.000g por cinco minutos. A proteína plasmática total (PPT) foi realizada por refratometria (refratômetro óptico). A hemoglobina foi mensurada pela técnica de cianometahemoglobina (colorimétrico), utilizando reagente da marca Bioclin[®], e a leitura foi realizada no equipamento semi-automatizado BA-88a (Mindray[®]). Os índices hematimétricos VGM e CHGM foram obtidos por cálculo (THRALL, 2012). As extensões sanguíneas foram coradas com May-Grunwald-Giemsa para contagem diferencial de leucócitos (100 leucócitos) e pesquisa de hemoparasitas. A relação heterofilo/linfócito (H/L) foi calculada dividindo-se a porcentagem de heterofilos pelo número de linfócitos (GROSS; SIEGEL, 1983), após a leitura da extensão sanguínea.

As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas a 3.000 rpm por cinco minutos para obtenção do soro. No soro foram realizados os parâmetros em analisador bioquímico automatizado BS-200 (Mindray[®]), utilizando *kits* Bioclin (Belo Horizonte – Minas Gerais - Brasil). Os seguintes parâmetros e métodos foram: ácido úrico (método da uricase/peroxidase), aspartatoaminotransferase (AST) (cinético-UV), creatina quinase (CK) (UV otimizado), lactato desidrogenase (LDH) (cinético-UV), proteína total (método do biureto), albumina (verde de bromo cresol), globulinas (calculadas reduzindo os níveis de albumina do valor das proteínas totais), colesterol (hidrólise enzimática e oxidação), cálcio (Arsenazo III) e fósforo (método UV). A glicose foi analisada em sangue total por glicosímetro (*Accu-CheckPerforma*).

4.4.3 Estatística

Os IR foram determinados utilizando o programa *Reference Value Adviser* (versão 2.1) seguindo instruções da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (GEFFRÉ, 2012) com o teste de normalidade de Anderson-Darling com transformação Box-Cox. A estatística descritiva (média, mediana, desvio padrão, valores mínimo e máximo) foi realizada no programa *Sigmaplot 12*. Os testes de

Dixon-Reed e Tukey foram utilizados para detectar *outliers*, que foram mantidos quando suspeitos, e removidos quando discrepantes. O IR foi calculado de acordo com a distribuição dos dados de referência, obtidos por métodos paramétricos e robustos, tendo ou não sofrido transformação, conforme realizado por Vaz et al. (2016).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os intervalos de referências (IR) para os parâmetros hematológicos dos gansos de parques públicos estão apresentados na Tabela 5. Na literatura consultada, até o presente momento, foram encontrados dados hematológicos e bioquímicos para *Anser anser*, realizado em 31 animais de ambos os sexos, no Irã (JAHANTIGH; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, 2016). No presente estudo, não foi possível separar os animais por espécie nos parques pela constante hibridização entre *Anser anser* e *Anser cygnoides*. Já no cativeiro, todos os animais eram da espécie *Anser anser*.

TABELA 5. Intervalos de referência (IR) hematológicos, proteína plasmática total e relação heterófilo/linfócito de 84 gansos (*Anser spp.*) adultos e saudáveis provenientes de três parques públicos (Curitiba, Paraná, Brasil).

Parâmetros	Média	DP	Mediana	Min	Max	IR	Lim. Inferior (90% IC)	Lim. Superior (90% IC)	Método
Eritrócitos (10 ⁶)	2,4	0,32	2,44	1,31	4,6	1,9-3,2 (R)	1,84-1,97	3,04-3,37	PTS
Hemoglobina (g/dL)	11,13	4,02	9,85	5,3	23,9	7,20-12,5 (R)	6,78-7,64	12,04- 12,95	PUS
Hematócrito (%)	43,95	4,97	44	25	54	34-53,9 (S)	32,6-35,5	52,4-55,4	PUS
VGM (µm ³)	179,24	32,9	180,85	93,13	319,39	114,74- 246,36 (S)	97,75- 128,77	231,89- 260,41	PUR
CHGM (%)	25,34	8,34	23,71	11,63	47,29	13,96-47,2 (S)	13,19- 15,02	41,19- 55,07	PTR
Leucócitos (10 ³ /µL)	14,25	7,42	12	3	32	3,95-33,95 (S)	3495,3- 4643,5	29668,4- 38644	PTS
Heterófilos (%)	39,72	14,22	40	3	77	11,8- 68,7(S)	7,5-16	64,1-73,4	PTS
Bastonetes (%)	0,26	0,73	0	0	3	0-3	0	2-3	NP
Linfócitos (%)	50,27	15,94	49,5	16	88	18,4-82,2	13,9-23	77,2-86,9	NP
Eosinófilos (%)	3,8	3,29	3	0	16	0-14,8	0	9,9-16	NP
Monócitos (%)	1,91	2,31	1	0	13	0-12	0	5-13	NP
Basófilos (%)	1,91	2,31	4	0	13	0-11,9	0	8,9-13	NP

PPT (g/dL)	5,01	0,64	5	3,8	8,6	4-6,58	3,8-4,2	6-8,6	NP
H/L	1,0	0,76	0,8	-	-	-	-	-	-

DP: Desvio padrão IR: Intervalo de referência. IC: Intervalo de confiança. VGM: Volume globular médio. CHGM: Concentração de hemoglobina globular média. PPT: proteína plasmática total (S) outliers suspeitos (R) outliers removidos NP: Não paramétrico PTS: paramétrico transformado standard PTR: paramétrico transformado robusto

Não foram encontrados hemoparasitas nas extensões sanguíneas. *Hemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Plasmodium* já foram relatados em anseriformes (FIORELLO, 2020; HERMAN; BARROW; TARSHIS, 1975; KLOSS; FEDYNICH; BALLARD, 2003) com morbidade e mortalidade confirmada nestes animais. Em trabalho com *B. canadensis*, somente 3% (4/146) animais apresentaram *Hemoproteus*, que é citado como comum e geralmente não patogênico (CHARLES-SMITH et al., 2014).

O número de eritrócitos e o hematócrito (Ht) de aves são influenciados por fatores como espécie, idade, sexo, hormônios, doenças e fatores ambientais e tais valores costumam aumentar conforme a idade da ave. De forma geral, o Ht de muitas espécies varia entre 35% e 55% (CAMPBELL, 2012), valor próximo ao encontrado no presente estudo. Variações sazonais, idade e espécie afetam os parâmetros eritrocitários de anseriformes e variações desses parâmetros em patos e gansos adultos geralmente refletem efeitos sazonais associados a mudanças hormonais e nutricionais, causadas pela migração e fotoperíodo (CAMPBELL; SMITH; ZIMMERMAN, 2010).

De maneira geral, os parâmetros hematológicos da série vermelha (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VGM e CHGM) foram mais elevados nos animais cativos (Tabela 6), mas ambos os valores demonstraram resultados similares com outros anseriformes, como ganso-doméstico (*A. anser*) (JAHANTIGH; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, 2016), ganso-canadense (*B. canadensis*) (CAMPBELL; SMITH; ZIMMERMAN, 2010), marrecos (*Anas platyrhynchos*) (ZUCHOWSKA, 1993) e ganso-da-cabeça-listrada (*Anser indicus*), com exceção da hemoglobina (Hg) (GULLAND; HAWKEY, 1990).

TABELA 6. Intervalos de referência (IR) hematológicos, plasmática total e relação heterofilo/linfócito de 42 gansos (*Anser anser*) adultos e saudáveis provenientes de um instituto conservacionista na região metropolitana de Curitiba, Paraná

Parâmetro	Média	DP	Mediana	Min	Max	IR	Lim. Inferior (90% IC)	Lim. Superior (90% IC)	Método
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	2,92	0,72	2,9	1,64	5,49	1,378-4,33	0,932-1,77	3,95-4,79	PUR
Hemoglobina (g/dL)	11,923	1,26	12,1	7,3	13,7	7,34-13,69	7,3-10,34	13,31-13,77	NP
Hematócrito (%)	46,18	2,8	46	40	52	40,5-51,9	39,2-41,6	50,7-53,1	PUS
VGM (μm ³)	167,49	42,6	156,62	81,96	286,58	75,38-255,22 (S)	56,66-94,87	232,57-276,88	PUR
CHGM (%)	25,82	2,45	26,34	17,38	29,5	21,39-31,53	19,89-23,15	29,68-32,88	PUR
Leucócitos (10 ³ /μL)	14	6,7	13	2	29	2,2-28	2-5	26,9-29	NP
Heterófilos (%)	50,16	17,22	52	14	84	15-85,3	8,1-22,2	77,7-92,6	PUS
Bastonetes (%)	0,27	0,82	0	0	4	0-3,9	0	1,9-4	NP
Linfócitos (%)	40,55	18,92	36	10	80	11,8-88,1	9,2-15,5	74,9-102,4	PTS
Eosinófilos (%)	2,27	3,08	1	0	13	0-12,9	0	7-13	NP
Monócitos (%)	3,11	2,15	3	0	10	0-9,7	0-0,1	6-10	NP
Basófilos (%)	3,6	2,87	3	0	10	0-10	0	8-10	NP
PPT (g/dL)	5,59	0,91	5,4	3,8	8,2	3,73-7,46	3,36-4,11	7,05-7,84	PUS
H/L	1,8	1,5	1,46	-	-	-	-	-	-

DP: Desvio padrão IR: Intervalo de referência. IC: Intervalo de confiança. VGM: Volume globular médio. CHGM: Concentração de hemoglobina globular média. H/L: Relação heterofilo linfócito. PPT: proteína plasmática total (S) outliers suspeitos (R) outliers removidos NP: Não paramétrico PTS: paramétrico transformado standard PTR: paramétrico transformado robusto

Resultados de médias de eritrócitos e Ht similares e maiores de Hb (14,5g/dL) foram encontradas em ganso-das-neves (*Anser caerulescens*) e em ganso-canadense (*Branta canadensis*) (WILLIAMS; TRAINER, 1971), que não encontraram diferenças hematológicas relacionadas ao sexo em tais espécies de gansos, reforçado recentemente por Jahantigh e Zamani-Ahmadmahmud (2016). Entretanto, Williams & Trainer (1971) verificaram que a sazonalidade influencia diretamente o número de eritrócitos, aumentando no inverno e diminuindo no verão.

Por outro lado, nossos dados diferem dos encontrados em cisne-branco (*Cygnus olor*) adultos (DOLKA et al., 2014) que possuem menor número de eritrócitos e Ht mas com Hb mais alta. Existem diferenças espécie-específicas dentro da ordem anseriformes, como no caso dos patos e marrecos: *A. platyrhynchos* possui maior

número de eritrócitos e de Ht no inverno e no período reprodutivo quando comparados a outras espécies de marrecos (*Aythya* spp. e *Oxyura jamaicensis*) enquanto *Aythya* spp. possui maior VGM durante o mesmo período (CAMPBELL, 2012; SHAVE; HOWARD, 1976).

As médias de leucócitos aqui verificadas, diferiram consideravelmente de *A. anser*, que apresentou média maior ($19,45 \times 10^3/\mu\text{L}$) bem como de *B. canadensis* (CHARLES-SMITH et al., 2014) e cisne-pequeno (*Cygnus colombianus*) (MILANI et al., 2012). Williams & Trainer (1971) citam que não há sazonalidade leucocitária (total ou diferencial) como verificado em *A. caerulescens* e *B. canadensis*.

Apesar do número de leucócitos totais terem médias semelhantes ($14 \times 10^3/\mu\text{L}$) nos parques e no cativeiro, a proporção leucocitária não foi a mesma. Nos parques, o leucócito predominante foi o linfócito (50,2%) seguido pelos heterófilos segmentados (39,7%), eosinófilos (3,8), monócitos (1,9%) e basófilos (1,9%). Corroborando com a literatura, onde os anseriformes geralmente apresentam os linfócitos como leucócitos predominantes (CAMPBELL, 2012) e não heterófilos como em outras espécies aviárias, informação confirmada em *A. anser* (JAHANTIGH; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, 2016), *B. canadensis* (CAMPBELL; SMITH; ZIMMERMAN, 2010; CHARLES-SMITH et al., 2014), *A. platyrhynchos* (ZUCHOWSKA, 1993), *B. sanvicens* (JENNINGS, 1996) e *Cygnus olor* (DOLKA et al., 2014).

No cativeiro, com a espécie *A. anser* o leucócito predominante foi o heterófilo segmentado (50,1%) seguido pelos linfócitos (40,5%), basófilos (3,6%), monócitos (3,1%) e eosinófilos (2,2%) conforme observado em cisne-pequeno (*Cygnus colombianus*) e marrecos (*Anas clypeata* e *A. crecca*) (ELARABANY, 2018; MILANI et al., 2012)

É interessante levar em consideração o eosinófilo, sendo o leucócito menos predominante no cativeiro. Eosinófilos participam de reações de hipersensibilidade tardia em aves, o que geralmente não é visto em mamíferos (CAMPBELL, 2012). Porém a exata função do eosinófilo nas aves ainda é desconhecida; eosinofilia em aves mantidas como *pets* é rara, mas tem sido associada a infecções parasitárias ou dano tecidual (DONELEY, 2016). O aumento do número de eosinófilos em animais de vida livre seria justificável pela grande possibilidade de contaminação parasitária, fator esse com menor probabilidade no cativeiro, já que os animais são acompanhados por médicos veterinários que fazem protocolos de medicina preventiva regularmente.

Heterófilos imaturos (bastonetes) foram encontrados em 14% das aves (parque e cativeiro) com números variando de 1 a 4%, com valores absolutos máximos de 560/ μ L (Anexos 1 e 2), o que pode ser considerado normal. Em nenhum dos estudos com anseriformes foi relatada a presença de bastonetes no sangue periférico dos animais avaliados. A presença de bastonetes pode indicar leve resposta inflamatória (CLARK; RAIDAL, 2009) mas foi considerada normal no presente estudo. A interpretação de tais resultados é dificultada por ter sido uma coleta pontual e pelos poucos estudos realizados com tais espécies. Além disso, os animais que apresentaram bastonetes estavam saudáveis no exame físico e tiveram média leucocitária total de 14 e $14,25 \times 10^3/\mu$ L nos parques e cativeiro, respectivamente. A influência da concentração de heterófilos em casos de doenças ou fatores externos (como estado reprodutivo, horário do dia e dados populacionais) não está completamente descrita para aves (CLARK; RAIDAL, 2009), principalmente devido a biodiversidade da classe.

A relação H/L média nos parques foi de 1,0 e no cativeiro de 1,8. A relação H/L é uma ferramenta importante para determinar estresse em algumas espécies de aves, devendo ser menor que 1 (CAMPBELL; SMITH; ZIMMERMAN, 2010; GROSS; SIEGEL, 1983). Tal relação pode aumentar em decorrência de doença, stress ou parasitismo e varia conforme a idade e estado reprodutivo do animal (DEHNHARD; QUILLFELDT; HENNICKE, 2011; FIORELLO, 2020; GROSS; SIEGEL, 1983). Nossos resultados nos parques foram similares a estudo com patos, que demonstraram relação H/L de 1,07 (LEVENGOOD et al., 2000). Acredita-se que pela diferença de métodos de contenção e tempo utilizado entre a captura e coleta, a proporção H/L tenha sido mais alta no cativeiro, visto que os animais foram mantidos fechados por até seis horas para realização da coleta de sangue e conforme Fiorello (2020), aumentos de relação H:L em anseriformes podem ser relacionados a contenção e procedimentos de coleta de amostras.

Dolka et al (2014) citam um fato que se assemelha ao Brasil, com a presença de animais em parques: a população de cisnes tem crescido na Europa já que os animais “perderam” seus instintos selvagens, habitando cidades pela facilidade de conseguir alimento. Essa situação pode ser comparada ao Brasil, onde gansos, patos e marrecos são vistos comumente em lagos no meio urbano, especialmente em parques, para observação e recreação.

Nas tabelas 7 e 8, encontram-se os valores de IR dos parâmetros bioquímicos avaliados dos animais dos parques e cativeiro, respectivamente.

TABELA 7. Intervalos de referência (IR) de parâmetros bioquímicos séricos de 84 gansos (*Anser spp.*) adultos e saudáveis provenientes de parques públicos de Curitiba, Paraná

Parâmetro	Média	DP	Mediana	Min	Max	IR	Limite Inferior (90% IC)	Limite Superior (90% IC)	Método
AST (U/L)	32,31	26,46	27,2	12,4	238,3	14,91-74,26 (R)	13,72-16,36	57,98-104,46	PTS
LDH (U/L)	532,99	291,94	513	137,2	1702	152,35-1272,51 (R)	140-177,98	1087,99-1447,44	PTS
Colesterol (mg/dL)	148,04	26,47	149,8	22,4	193,8	112,39-189,43 (R)	106,5-118,53	182,96-195,64	PUS
PT (g/dL)	4,45	0,75	4,5	2,8	7	3,16-6,19	2,98-3,33	5,84-6,58	PTS
Albumina (g/dL)	1,82	0,18	1,8	1,2	2,3	1,38-2,21	1,2-1,5	2,1-2,3	NP
Globulina (g/dL)	2,65	0,69	2,6	1,6	5,6	1,69-4,43	1,6-1,8	3,92-5,6	NP
Glicose (mg/dL)	221,18	49,36	215	147	336,2	141,4-343,43 (R)	131,92-152,1	316,87-375,41	PTS
CK (U/L)	465,12	695,18	253,1	81,6	5413	85-1613,99	78-97,64	1216,32-2082,42	PTS
Ácido úrico (mg/dL)	3,34	1,2	3,1	0,8	7,5	1,44-5,86 (R)	1,22-1,68	5,37-6,4	PTS
Cálcio (mg/dL)	9,4	1,99	9,1	6,7	21,7	7,74-10,58 (R)	7,52-7,98	10,34-10,81	PUS
Fósforo (mg/dL)	4,38	2,36	3,8	1,7	19,7	1,97-9,39 (R)	1,75-2,2	7,67-11,87	PTR

DP: desvio padrão Min: mínimo Max: máximo IR: intervalo de referência IC: intervalo de confiança (S) outliers suspeitos, (R) outliers removidos NP: Não paramétrico, PTS: paramétrico transformado standard, PTR: paramétrico transformado robusto AST: aspartato aminotransferase LDH: lactato desidrogenase PT: proteína total CK: creatinaquinase

A média dos valores de AST (32,31 U/L), LDH (532,9 U/L) e CK (465,12 U/L) foram mais altos nos animais de cativeiro do que nos gansos dos parques. Isso pode ter ocorrido por influencia do tempo entre o fechamento dos animais no cambeamento até a coleta de amostra, pois conforme Williams & Thorne (1996) devido a miopatia de captura causada por capturas ativas ou prolongadas, as enzimas CK, LDH e AST podem aumentar. Devido ao metabolismo anaeróbico durante intensa atividade muscular (pela resistência a contenção, por exemplo), o alto nível de ácido lático muscular aumenta a permeabilidade da membrana celular, ocorrendo lise e liberando tais enzimas na corrente sanguínea (CHALMERS; BARRET, 1982). Nossos

resultados, quando comparados a trabalho com *A. anser* (JAHANTIGH; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, 2016) demonstraram AST e LDH elevadas e CK duas e quatro vezes mais alta nos parques e cativeiro, respectivamente.

Os metabólitos plasmáticos mensurados nos exames de bioquímica sérica são produtos intermediários do metabolismo e refletem o estado fisiológico do organismo (ARTACHO et al., 2007). O processo de captura dos gansos nos parques envolveu o fechamento dos animais em cercados feitos de redes ou tecidos para a coleta de amostras (devido a grande extensão dos parques e presença de lagos, impossibilitando a captura individual) e espera de até três horas para a coleta de sangue e seis horas no cativeiro (pela facilidade de cambeamento de todo o grupo). Em grous (*Grus canadensis tabida*) há aumento da CK, AST e LDH em até uma hora pós captura, com pico máximo três dias após a contenção (BUSINGA; LANGENBERG; CARLSON, 2007).

TABELA 8. Intervalos de referência (IR) de parâmetros bioquímicos séricos de 43 gansos (*Anser anser*) adultos e saudáveis provenientes de um instituto conservacionista na região metropolitana de Curitiba, Paraná

Parâmetros	Média	DP	Mediana	Min	Max	IR	Limite Inferior (90% IC)	Limite Superior (90% IC)	Método
AST (U/L)	52,51	23,04	53,7	24,1	127,9	21,05-113,03(R)	17,28-25,95	97,5-130,44	PTS
LDH (U/L)	893,05	282,84	897,6	355,3	1872,5	273,45-1425,35	122,34-436,43	1268,16-1604,33	PUR
Cholesterol (mg/dL)	145,51	38,05	145,55	72,2	233,3	67,76-223,27 (R)	52,42-83,93	206,25-239,58	PUS
PT (g/dL)	4,72	0,84	4,6	3,2	6,2	2,99-6,45	2,65-3,35	6,07-6,81	PUS
Albumina (g/dL)	1,91	0,21	1,9	1,4	2,5	1,52-2,39	1,44-1,59	2,28-2,52	PTS
Globulina (g/dL)	2,85	0,79	2,8	1,5	4,6	1,24-4,47	0,92-1,57	4,12-4,81	PUS
Glicose (mg/dL)	182,35	31,22	173,5	141	266	140,5-298,4	125,7-146,3	246,4-448,5	PTS
CK (U/L)	1307,9	1432,62	786,7	62,6	6509	91,9-6550,42	54,39-1470,91	4202,51-1040,70	PTR
Ácido úrico (mg/dL)	2,03	0,96	1,9	0,4	4,5	0,47-4,35	0,32-0,7	3,8-4,91	PTS
Cálcio (mg/dL)	11,59	3,26	10,4	0,4	17,3	7,95-17,28 (R)	7,9-9,3	16,68-17,3	NP
Fósforo (mg/dL)	3,69	1,02	3,5	2	5,7	1,46-5,73	0,88-1,86	5,12-6,24	PUR

DP: desvio padrão Min: mínimo Max: máximo IR: intervalo de referência IC: intervalo de confiança (S) outliers suspeitos, (R) outliers removidos. NP: Não paramétrico, PTS: paramétrico transformado standard, PTR: paramétrico transformado robusto AST: aspartato aminotransferase LDH: lactato desidrogenase PT: proteína total CK: creatinaquinase

Bollinger et al. (1989) verificaram que mesmo com três diferentes tentativas de captura e contenção (dois tipos de armadilhas e puçá) de marrecos (*A. platyrhynchos*), em todos os casos houve aumento de AST (46 a 67 U/L) e em maior nível de CK (3024 a 6968 U/L), principalmente com o uso de puçá (método onde os animais ficaram contidos por mais tempo), relacionando a elevação enzimática ao tipo e a duração da contenção. No presente estudo não foi utilizado puçá para captura, porém, o tempo de espera para a coleta de sangue dos animais pode ter influenciado principalmente a mensuração de CK. Entretanto, mesmo com o tempo de espera, nossos resultados de CK e AST foram mais baixos do que em marrecos. É provável que tenha ocorrido algum nível de miopatia de captura nos animais do presente estudo, porém, o método de captura provou ser eficaz para avaliação de tais parâmetros já que nossos valores de CK nos parques e no instituto conservacionista (465,1 U/L e 1307,9 U/L respectivamente) foram mais baixos do que os relatados pelo referido autor.

A glicose sérica dos animais aqui avaliados (média de 221mg/dL) nos parques foi similar a de gansos-domésticos de parques no Irã (222mg/dL)(JAHANTIGH; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, 2016) e ganso-canadense (210 mg/dL) (CAMPBELL; SMITH; ZIMMERMAN, 2010). No gansos de cativeiro a glicose (média de 182 mg/dL) foi similar a cisne-pequeno (141mg/dL) (MILANI et al., 2012) e cisne-branco (168 mg/dL) (DOLKA et al., 2014). Lipídios, proteínas e glicose são regulados pela dieta e metabolismo, servindo como indicador do estado nutricional das aves, o que é relacionado diretamente ao estado sanitário (ARTACHO et al., 2007).

O metabolismo do colesterol das aves é similar ao dos mamíferos, porém existem diferenças nas apresentações clínicas de animais com valores anormais. Por serem ovíparos, durante a vitelogênese as aves apresentam valores maiores de colesterol plasmático (HARR, 2002). Mesmo recebendo dieta desequilibrada nos parques (consistindo de pão e milho, fornecido pelos visitantes), de forma geral, nossos valores foram similares entre os locais coletados e também em relação a gansos-domésticos (135mg/dL) (JAHANTIGH; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, 2016) e ganso-canadense (CAMPBELL; SMITH; ZIMMERMAN, 2010) e maior do que em cisnes-pequenos (116mg/dL) (MILANI et al., 2012) e maior do que cisnes-brancos (98mg/dL). A presença de animais selvagens em ambientes urbanos gera a necessidade de explorar recursos alimentares antropogênicos, sendo eles fornecidos intencional ou involuntariamente (MCKINNEY, 2002). Pelo constante fornecimento de

alimentos indevidos pelos visitantes dos parques, a hipótese era de colesterol mais elevado em gansos de vida livre, em comparação aos animais de cativeiro, que possuem uma dieta balanceada, entretanto, tal hipótese não foi confirmada. Atualmente, ainda é desconhecida a sobrevivência das populações de animais silvestres com colesterol elevado (TOWNSEND; STAAB; BARKER, 2019).

A concentração da proteína total (PT) fornece informações sobre o estado imune e nutricional do animal (FIORELLO, 2020). Os valores PT e suas frações (albumina e globulina) foram similares entre os animais de parques e cativeiro (4,45 g/dL e 4,72 g/dL, respectivamente) e a literatura avaliada para gansos (CAMPBELL, 2012; JAHANTIGH; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, 2016) e maior do que cisnes (MILANI et al., 2012). A albumina é a proteína de fase aguda mais abundante no plasma (O'REILLY; ECKERSALL, 2014) e funciona como fonte de energia, é um *pool* de aminoácidos para síntese proteica e atua transportando metabólitos (OTS; MURUMÄGI; HÖRAK, 1998). A redução da PT juntamente da albumina é indicador de diversos estados patológicos, como desnutrição, inflamação e problemas hepáticos (ARTACHO et al., 2007). A maior parte da globulina é produzida no fígado, com exceção das imunoglobulinas, que são produzidas pelos tecidos linfoides (ALLISON, 2012). Existem diferenças nos métodos de avaliação de albumina, onde em pinguins, o método mais recomendado para análise é a eletroforese, e não o verde de bromo cresol (CRAY; WACK; ARHEART, 2011).

O metabolismo do cálcio está intimamente ligado ao fósforo e a vitamina D, e para que o cálcio fique disponível, as quantidades desses elementos devem ser adequadas. Nos parques, a relação Ca:P foi de 2,1:1, e no cativeiro 3,1:1. Em aves, a relação Ca:P deve ser 2:1 (com variações de 0,5:1 a 2,5:1) (SAKAS, 2002). O valor de cálcio total é maior nas aves quando comparado aos mamíferos e mudanças drásticas são verificadas em fêmeas reprodutivamente ativas pelo transporte de cálcio induzido pelo estrógeno (SIMKISS, 1967). Como a sexagem não foi possível no presente trabalho, pode ter havido interferência caso o número de fêmeas seja muito elevado, sendo esse um dos possíveis motivos do maior valor de Ca (em comparação ao P, nos animais do cativeiro). Quando comparado com outros anseriformes, *A. anser* possuem maior concentração de Ca e P (JAHANTIGH; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, 2016) dado este que não foi verificado no presente estudo, com valores médios de Ca e P menores nos parques do que dos referidos autores, mas com relação Ca:P maior.

O valor de ácido úrico nos gansos dos parques, *Anser* spp. foi de 3,34mg/dL, muito similar ao encontrado por Jahantigh e Zamani-Ahmadmahmud (2016) de 3,26 mg/dL em *A. anser* que cita que o valor de ácido úrico é menor nos gansos (*A. anser*), porém a média do cativeiro foi muito inferior ao encontrado na literatura (2,03mg/dL) para gansos e outros anseriformes. O ácido úrico é o principal componente nitrogenado excretado pelas aves, sendo sintetizado em sua maioria no fígado pelo metabolismo das purinas (HARR, 2002). A alimentação influencia diretamente nos níveis de ácido úrico, como por exemplo, aves carnívoras apresentam níveis mais altos e animais mais jovens apresentam níveis mais baixos (DONELEY, 2016). Sugere-se que a alimentação dos parques seja mais proteica, devido à possibilidade de alimentação de plantas aquáticas e outros compostos nitrogenados.

4.6 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a definir IR hematológicos e bioquímicos séricos em *Anser* spp. adultos e saudáveis provenientes de parques e de um cativeiro no Brasil. A determinação dos parâmetros para gansos é importante para estudos de sanidade futuros, onde tais valores podem ser utilizados como base para avaliação de saúde destes animais.

Foram verificados parâmetros eritrocitários similares aos estudos com outros anseriformes, média leucocitária menor do que a verificada para gansos-domésticos e definida a população leucocitária diferencial com predominância de linfócitos nos animais dos parques e heterófilos no cativeiro, e a presença de heterófilos bastonetes na circulação de animais saudáveis. Em nenhum animal foi verificada a presença de hemoparasitas. Os valores de AST, LDH e CK foram mais elevados do que nos animais citados na literatura, mas a técnica de captura e contenção foi eficiente já que os valores aqui encontrados foram mais baixos do que os verificados em outros estudos com diferentes métodos de contenção. O ácido úrico foi mais baixo em *Anser anser* do que nos demais animais pertencentes a ordem anseriforme e os demais parâmetros foram similares aos encontrados na literatura.

4.7 REFERÊNCIAS

- ALLISON, R. Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In: THRALL, M. A. et al. (Eds.). . **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2nd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012. p. 460–475.
- ARTACHO, P. et al. Blood biochemistry reveals malnutrition in black-necked swans (*Cygnus melanocoryphus*) living in a conservation priority area. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, n. 2, p. 283–290, 2007.
- BHATTACHERJEE, A. et al. Haematological and morphometrical analysis of blood cells of Khaki Campbell duck (*Anas platyrhynchos*) in different age groups with respect to sexual dimorphism. **Comparative Clinical Pathology**, v. 27, n. 6, p. 1465–1472, 2018.
- BOLLINGER, T. et al. Concentration of creatine kinase and aspartate aminotransferase in the blood of wild mallards following capture by three methods for banding. **Journal of wildlife diseases**, v. 25, n. 2, p. 225–231, 1989.
- BUSINGA, N. K.; LANGENBERG, J.; CARLSON, L. Successful Treatment of Capture Myopathy in Three Wild Greater Sandhill Cranes (*Grus canadensis tabida*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 21, n. 4, p. 294–298, 2007.
- CAMPBELL, T. W. Hematology of Birds. In: THRALL, M. A. et al. (Eds.). . **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2nd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012. p. 238–276.
- CAMPBELL, T. W.; SMITH, S. A.; ZIMMERMAN, K. L. Hematology of waterfowl and raptors. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.). . **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th. ed. [s.l.] Blackwell, 2010. p. 978–979.
- CHALMERS, G. A.; BARRET, M. W. Capture myopathy. In: HOFF, L. G.; DAVIS, J. W. (Eds.). . **Noninfectious Diseases of Wildlife**. [s.l.: s.n.]. p. 84–94.
- CHARLES-SMITH, L. E. et al. Hematologic Parameters and Hemoparasites of Nonmigratory Canada Geese (*Branta canadensis*) From Greensboro , North Carolina, USA. **Journa of avian medicine and surgery**, v. 28, n. 1, p. 16–23, 2014.
- CLARK, P.; RAIDAL, S. R. Haematological indicators of inflammation exhibited by Australian Falconiformes. **Comparative Clinical Pathology**, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2009.
- COLE, D. et al. Free-living canada geese and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 935–938, 2005.
- CRAY, C.; WACK, A.; ARHEART, K. L. Invalid Measurement of Plasma Albumin Using Bromocresol Green Methodology in Penguins (*Spheniscus* species). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 25, n. 1, p. 14–22, 2011.
- DEHNHARD, N.; QUILLFELDT, P.; HENNICKE, J. C. Leucocyte profiles and H/L ratios in chicks of Red-tailed Tropicbirds reflect the ontogeny of the immune system. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 181, n. 5, p. 641–648, 2011.
- DOLKA, B. et al. Hematological parameters in relation to age, sex and biochemical values for mute swans (*Cygnus olor*). **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 2, p. 93–100, 2014.
- DONELEY, B. Interpreting diagnostic tests. In: DONELEY, B. (Ed.). . **Avian Medicine and Surgery in Practice - Companion and Aviary Birds**. 2nd. ed. Florida: CRC Press, 2016. p. 117–144.
- ELARABANY, N. A comparative study of some haematological and biochemical parameters between two species from the Anatidae family within migration season. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 79, n. 1, 2018.

- ELMBERG, J. et al. Potential disease transmission from wild geese and swans to livestock, poultry and humans: a review of the scientific literature from a One Health perspective. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 7, n. 1, p. 1300450, 2017.
- IORELLO, C. Seabirds and Waterfowl. In: HEATLEY, J.; RUSSEL, K. (Eds.). . **Exotic Animal Laboratory Diagnosis, First Edition**. 1st. ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2020. p. 585–606.
- FRIEDRICH, K. R. et al. ASVCP reference interval guidelines: Determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 4, p. 441–453, 2012.
- GEFFRÉ, A. Reference guide for Reference Value Advisor v2 . 1 February 2012. n. February, p. 1–17, 2012.
- GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte Ratio as a Measure of Stress in Chickens. **Avian Diseases**, v. 27, n. 4, p. 972, 1983.
- GULLAND, F. M. D.; HAWKEY, C. M. Avian Hematology. **Vet Annual**, v. 30, p. 26–136, 1990.
- HARR, K. E. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, n. 3, p. 140–51, jan. 2002.
- HERMAN, C. M.; BARROW, J. H.; TARSHIS, I. B. Leucocytozoonosis in Canada geese at the Seney National Wildlife Refuge. **Journal of wildlife diseases**, v. 11, n. 3, p. 404–411, 1975.
- JAHANTIGH, M.; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, M. Hematology and serum biochemistry values in greylag geese (*Anser anser*) in Southeast Iran. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 4, p. 671–675, 2016.
- JENNINGS, I. B. Hematology. In: BEYNON, P. H.; FORBES, N. A.; HARCOURT-BROWN, N. (Eds.). . **Manual of Raptors, Pigeons and Waterfowl**. 1st. ed. [s.l.] BSAVA, 1996. p. 68–78.
- KLOSS, C. L.; FEDYNICH, A. M.; BALLARD, B. M. Survey of Blood Parasites in Ross' and White-Fronted Geese in Southern Texas. **The Southwestern Naturalist**, v. 48, n. 2, p. 286–289, 2003.
- LEVENGOOD, J. M. et al. Influence of diet on the hematology and serum biochemistry of zinc-intoxicated mallards. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 1, p. 111–123, 2000.
- MCKINNEY, M. Urbanization, Biodiversity and Conservation. **BioScience**, v. 52, n. 10, 2002.
- MILANI, J. F. et al. Hematology, Plasma Chemistry, and Bacteriology of Wild Tundra Swans (*Cygnus columbianus*) in Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 1, p. 212–215, 2012.
- O'REILLY, E. L.; ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins: A review of their function, behaviour and measurement in chickens. **World's Poultry Science Journal**, v. 70, n. 1, p. 27–43, 2014.
- OTS, I.; MURUMÄGI, A.; HÖRAK, P. Haematological health state indices of reproducing Great Tits: Methodology and sources of natural variation. **Functional Ecology**, v. 12, n. 4, p. 700–707, 1998.
- RAIDAL, S. Laboratory diagnostics for birds. In: HEATLEY, J.; RUSSELL, K. (Eds.). . **Exotic animal laboratory diagnosis**. [s.l.] Wiley Blackwell, 2020. p. 429–436.
- ROUTH, A.; SANDERSON, S. Waterfowl. In: TULLY, T. N.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. (Eds.). . **Handbook of Avian Medicine**. 2nd. ed. New York: Saunders, 2009. p. 275–308.

- SAKAS, P. Nutritional diseases. In: SAKAS, P. (Ed.). . **Essentials of Avian Medicine: A Guide for Practitioners**. 2nd. ed. [s.l.] American Animal Hospital Association Press, 2002. p. 173–181.
- SAMOUR, J. Diagnostic Value of Hematology. **Clinical Avian Medicine Volume II**, p. 587–598, 2006.
- SHAVE, H. J.; HOWARD, V. A hematologic survey of captive waterfowl. **Journal of wildlife diseases**, v. 12, p. 195–200, 1976.
- SIMKISS, K. **Calcium in reproductive physiology: a comparative study of vertebrates**. New York: Reinhold Publishing Corp, 1967.
- THRALL, M. A. Classification of and diagnostic approach to anemia. In: THRALL, M. A. et al. (Eds.). . **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2nd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012. p. 75–80.
- TOWNSEND, A. K.; STAAB, H. A.; BARKER, C. M. Urbanization and elevated cholesterol in American Crows. **Condor**, v. 121, n. 3, p. 1–10, 2019.
- VAZ, F. F. et al. Reference intervals for biochemical analytes of captive Black-Fronted Piping-Guan (*Aburria jacutinga*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 2, p. 347–351, 2016.
- WILLIAMS, E. S.; THORNE, E. T. Exertional myopathy (capture myopathy). In: FAIRBROTHER, A.; LOCKE, L. N.; HOFF, G. L. (Eds.). . **Noninfectious Diseases of Wildlife**. Iowa: Iowa State University Press, 1996. p. 181–193.
- WILLIAMS, J. I.; TRAINER, D. O. A hematological study of snow, blue, and Canada geese. **Journal of wildlife diseases**, v. 7, n. 4, p. 258–265, 1971.
- ZUCHOWSKA, E. **Some blood parameters in zoo birds**. Proc Euro Conf Avian Med Surg. **Anais...**1993

5 VIGILÂNCIA DE ORTHOAVULAVIRUS AVIÁRIO 1, INFLUENZA A (H1N1), *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* E *MYCOPLASMA SYNOVIAE* EM GANSOS (*ANSER SPP.*) DE PARQUES PÚBLICOS

5.1 RESUMO

A interação de aves de vida livre com seres humanos é um fator a ser considerado no papel destes animais na epidemiologia de diversas doenças. No Brasil, Anseriformes (especialmente anatídeos) são mantidos em parques públicos ou como aves ornamentais e em criações de subsistência, em contato direto com aves domésticas, silvestres e migratórias, logo, estudos são necessários a respeito do papel destes animais como potenciais reservatórios de agentes infecciosos zoonóticos e para estabelecimento de medidas de controle e profilaxia. O objetivo do estudo foi verificar a presença de Orthoavulavirus aviário 1 (APMV-1), Influenza A (H1N1), *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) por métodos moleculares e sorológicos em gansos (*Anser spp.*) de parques públicos de Curitiba, Paraná. Foi realizado exame físico, coleta de sangue e swabs de orofaringe e cloaca de 88 gansos provenientes de três parques públicos. A sorologia para APMV-1 e H1N1 foi realizada pelo método da Inibição da hemaglutinação (IH). Já os testes moleculares foram realizados por PCR para *M. gallisepticum* e *M. synoviae* e RT-PCR para APMV-1 e H1N1. Todos os testes foram negativos exceto a IH para APMV-1 onde cinco animais foram soropositivos com titulações variando de 1:20 a 1:160. Devido a ter sido uma coleta pontual, não é possível afirmar a ausência de H1N1, MG ou MS nas populações dos parques. Este é o primeiro estudo epidemiológico de IA, H1N1, MG e MS com gansos de parques públicos no sul do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Newcastle, Influenza, Micoplasmose, Anseriformes

5.2 ABSTRACT

Free-living birds and their interaction with human beings are relevant factors to be considered in the epidemiology of various diseases. In Brazil, Anseriformes (especially anatids) are commonly found living in public parks, or kept in captivity in subsistence farms or as ornamental birds. They are in direct contact with domestic, wild, and migratory birds, outlying the need for studies evaluating their role as potential carriers of zoonosis, and to establish control and prophylaxis measures. The aim of this study is to assess the presence of avian Orthoavulavirus 1 (APMV-1), Influenza A (H1N1), *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) in free-living geese (*Anser spp.*) from urban parks of Curitiba (Paraná, Brazil), using molecular and serological techniques. Eighty-eight geese from three public parks were captured and submitted to physical examination, oropharynx and cloaca swabs, and blood collection. Serology for APMV-1 and H1N1 was performed using the hemagglutination inhibition (HI) method. PCR was performed to detect *M. gallisepticum* and *M. synoviae*, and RT-PCR was performed for APMV-1 and H1N1 detection. Five animals were seropositive for APMV-1 in the HI assay, with titers ranging from 1:20 to 1:160. The remaining tests were all negative. However, considering it was a punctual collection, it is not possible to state the absence of H1N1, MG or MS in the populations of the parks. This is the first epidemiological study of AI, H1N1, MG, and MS in geese from public parks in southern Brazil.

KEYWORDS: Newcastle disease, Influenza, Mycoplasmosis, Anseriformes

5.3 INTRODUÇÃO

No Brasil, gansos são comumente criados como aves ornamentais e vivem soltos em chácaras, coabitando com galinhas (CAMPIONI, 2009) ou em parques públicos, onde há contato direto com seres humanos e com fauna silvestre (KONELL et al., 2019). O número de Anatídeos em contato direto com seres humanos, animais de vida livre e próximos a granjas tem crescido, criando conflitos com a avicultura e levantando questões a respeito do papel destes animais como potenciais vetores de zoonoses (ELMBERG et al., 2017).

Conflitos entre seres humanos e animais de vida livre frequentemente ocorrem em áreas urbanas e suburbanas, quando um grande número de pessoas e animais silvestres coabitam um determinado espaço. Gansos podem causar problemas nos ambientes urbanos, danos na vegetação e contaminar cursos d'água (WASHBURN; SEAMANS, 2012). Em certas épocas do ano grandes bandos de gansos selvagens habitam lagos e cursos d'água onde animais de vida livre vivem e de onde água pode ser extraída para uso humano ou mesmo para recreação. A maior parte das populações de gansos selvagens são altamente móveis (sazonal ou diariamente), tornando-os potenciais vetores de microrganismos (ELMBERG et al., 2017). Thomazelli et al. (2012) citam que é importante manter medidas rigorosas de biossegurança e é necessário incluir em programas de vigilância epidemiológica animais de criações não comerciais de pequeno porte.

Apesar da distância evolutiva entre seres humanos e aves, tais animais podem se infectar com uma imensa variedade de microrganismos zoonóticos (CONTRERAS et al., 2016). A interação de aves de vida livre (residentes ou não) com seres humanos é um fator a ser considerado no papel de tais animais na epidemiologia de diversas doenças. Estudos são necessários para estabelecimento de medidas de controle e profilaxia.

O vírus da Influenza Aviária (IA) pertence a família Orthomyxoviridae, gênero influenza vírus A. Três gêneros virais são conhecidos: A, B e C, mas somente a Influenza A infecta aves. Os sinais clínicos são variáveis e dependentes do tipo de hospedeiro, cepa viral, da imunidade do hospedeiro e presença de infecções secundárias (SWAYNE; BROWN, 2018). A prevalência da IA dentre as diferentes

espécies varia de grupo taxonômico, gênero e espécie (MUNSTER et al., 2007) e os Anseriformes (gansos, marrecos, patos e cisnes) e os Charadriiformes (gaivotas, andorinhas-do-mar e outras aves aquáticas) são considerados os reservatórios naturais mais importantes da IA (STALLKNECHT; BROWN, 2007). A transmissão para mamíferos ocorre pela via fecal-oral, por secreções do sistema respiratório e digestivo, bem como fômites (STYLES; NADLER, 2019). A IA pode ser transmitida em água não tratada, o que pode representar uma das maiores formas de transmissão de aves migratórias para aves domésticas, de vida livre, comerciais ou para o homem (SIVANANDAN et al., 1991). Os sinais clínicos em aves nem sempre estão presentes, mas citam-se perda de peso, apatia, secreção ocular e nasal, tosse, blefarite, aerossaculite, pneumonia, dispneia, cianose, diarreia e morte (ALEXANDER et al., 1981; DAOUST et al., 2011; NIQUEUX et al., 2014; SWAYNE; BROWN, 2018).

O Orthoavulavirus aviário 1 (APMV-1) ou doença de Newcastle (DNC) é uma importante zoonose aviária. Assim como a IA, a DNC possui diversas estirpes de patogenicidade variável, e variam conforme as espécies acometidas (FIORELLO, 2020). DNC é uma das doenças mais importantes no quesito econômico na avicultura mundial e está inclusa, junto a IA, dentre as 15 doenças infecciosas mais importantes economicamente para o comércio internacional de animais e produtos, pela Organização Mundial da Saúde (LEIGHTON; HECKERT, 2007). Existem 10 tipos de APMV, sendo considerados cinco patotipos baseado nos sinais clínicos: velogênico viscerotrópico (causando hemorragia intestinal), velogênico neurotrópico (sinais respiratórios, neurológicos e alta mortalidade), mesogênico (sinais respiratórios, ocasionalmente neurológicos mas com baixa mortalidade), lentogênico (sinais respiratórios) e assintomático (infecção intestinal subclínica) (AFONSO et al., 2018).

No norte do Brasil, o vírus da DNC foi isolado em aves mantidas em fundo de quintal e pequenas fazendas de locais remotos, com pouca ou nenhuma interferência humana que sugerissem infecção causada por ações antrópicas, logo, é possível inferir que aves silvestres, migratórias ou não, criadas de forma não comercial (especialmente Anseriformes) agem como carreadores ou reservatórios de cepas de DNC não patogênicas (THOMAZELLI et al., 2012). Segundo Elmberg et al. (2007), gansos e cisnes tem um papel importante na transmissão do vírus da IA, porém, não se tem evidências de seu papel na transmissão da DNC.

A Micoplasmose é causada por diversas espécies do gênero *Mycoplasma* sp., que afetam diferentes espécies de aves e com sinais muito variáveis

(FERGUSON-NOEL, 2020). *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) são as espécies consideradas mais importantes, sendo listadas pela OIE (Organização Mundial para a Saúde Animal) devido ao impacto na indústria avícola pela redução da produção de carne e ovos. Os sinais clínicos da infecção por MG variam de infecções respiratórias subclínicas até coriza, conjuntivite, tosse, espirros, dispneia e sinusite. Já MS causa sinovite, claudicação, retardo no crescimento e sinais respiratórios brandos (KLEVEN; BRADBURY, 2018). Em gansos já foi comprovada a transmissão vertical de MG e MS, além destes animais se contaminarem com outras espécies de *Mycoplasma* (BENÖINA; TADINA; DORRER, 1988).

Em Curitiba, capital do estado do Paraná, é comum a presença de aves em parques públicos, já que tais locais são ecossistemas importantes para a fauna aquática e refúgio para aves migratórias (STRAUBE et al., 2014; VALLEJOS et al., 2011). A implantação dos parques na cidade ocorreu nos anos 70, e tais ambientes no meio urbano possibilitam a existência de muitas espécies que provavelmente não sobreviveriam em somente uma área isolada (STRAUBE et al., 2014). Em 1878, em expedições realizadas para avaliação de avifauna em Curitiba, Bigg-Wither (1878) já encontrou gansos selvagens, patos e aves aquáticas em abundância, região essa que Straube et al. (2014) citaram sendo o atual centro da cidade. A avifauna de Curitiba apresenta uma grande riqueza de aves aquáticas e a cidade conta com duas áreas para a conservação de aves migratórias neárticas (VALLEJOS et al., 2011). De setembro a dezembro (primavera), milhares de aves migratórias coabitam com a fauna residente nos arredores de parques que possuem grandes ambientes aquáticos (STRAUBE et al., 2014), logo, é de extrema importância a vigilância epidemiológica de aves residentes na cidade.

O objetivo do presente estudo foi verificar a presença de Orthoavulavirus aviário 1, Influenza A (H1N1), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em gansos (*Anser* spp.) de vida livre dos parques de Curitiba, Paraná por métodos moleculares e sorológicos.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Locais de estudo

As amostras foram coletadas de gansos de três parques públicos, na cidade de Curitiba, Paraná: Parque Barigui, Parque São Lourenço e Parque Tingui.

O Parque Barigui (25°25'34.52 "S 49°18'27.03"W) e o Parque Tingui (25°23'36.05 "S 49°18'21.71" W) estão localizados às margens do rio Barigui. O Parque São Lourenço (25°23'2.400"S 49°15'55.440"W) está localizado às margens do rio Belém, e em todos os locais estudados, grupos de gansos (*Anser anser*, *Anser cygnoides* e híbridos) conviviam com diversas espécies de aves, répteis e mamíferos de vida livre e domésticos. Nos parques públicos os animais se alimentam de grama e comida fornecida pelos visitantes, tendo contato direto com aves migratórias.

5.4.2 Animais e coleta de amostras

Amostras de orofaringe e cloaca de 88 gansos adultos foram coletadas no período de julho de 2017 a fevereiro de 2018, durante exame físico e coleta de sangue para avaliação da sanidade dos animais. Amostras de sangue foram coletadas da veia metatarsal medial utilizando seringas estéreis de 5mL com agulhas 25x7 e foram acondicionados em tubos sem anticoagulante.

Após a coleta de sangue, foram coletados dois *swabs* de orofaringe e de cloaca por animal, acondicionados em *ependorf* seco, encaminhados refrigerados ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR e posteriormente congelados a -80 °C. O sangue foi encaminhado ao laboratório em temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 5000 rpm para obtenção do soro, que foi utilizado para a técnica de inibição de hemaglutinação. Para o RT-PCR de H1N1 e APMV-1 foi utilizado um *pool* contendo um *swab* individual de orofaringe e um de cloaca, e para PCR de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* também foi feita a extração de *swab* de orofaringe e cloaca.

5.4.3 Inibição da hemaglutinação para Influenza Aviária (H1N1)

A estirpe do vírus da IA (cepa A/Puerto Rico/8/1934 H1N1), foi cedida pelo Laboratório de Doença das Aves da Universidade Federal de Minas Gerais. O vírus foi diluído a 10^{-3} com adição de Penicilina (2000 UI/mL), Gentamicina (0,50 mg/mL) e Anfotericina B (1000UI/mL). Para obtenção do antígeno, foi inoculado na cavidade cório-alantóica de ovos embrionados de galinhas SPF (*Specific Pathogen Free*), 0,1mL da solução (OIE, 2015). Os ovos inoculados foram incubados a 37 °C e 60% de umidade (IP70D, Premium Ecológica, Belo Horizonte, Brasil) por sete dias e resfriados a 4 °C *overnight* para recuperação do fluido alantóico e posterior teste e titulação da atividade de hemaglutinação.

Para obtenção do soro controle positivo do vírus da IA, três galinhas SPF foram inoculadas por via intramuscular (0,5mL) com o vírus inativado por formalina 0,1% (Puerto Rico/8/1934 H1N1) emulsificada em adjuvante *Freund's complete* (SIGMA, Estados Unidos). Três inoculações foram feitas com intervalos de 10 dias, e foram coletadas amostras de sangue, centrifugadas para separar o soro e os anticorpos foram detectados por imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (OIE, 2015).

Todos os soros reagentes em IDGA foram testados em IH e o antígeno verificado em retro-titulação, para assegurar o uso de quatro unidades hemaglutinantes (4UHA) em cada teste.

Para a titulação do antígeno a ser usado, a prova de hemaglutinação, foi executada em placas plásticas com 96 poços e fundo em “U” e 4 UHA. Para a reação, foi utilizado sangue de galinhas SPF com volume igual de solução Alsever e lavado três vezes com PBS (0,01M e pH 7,2) e diluídas para uma suspensão a 0,5%.

Diluições de base 2 foram realizadas nos poços. 25 µL de PBS foram colocados em cada poço ao longo da placa de microtitulação e 25 µL da suspensão viral foram adicionadas no primeiro poço e diluídas sucessivamente com pipeta multicanal. Para a correta determinação da UHA a leitura é realizada inclinando-se a placa, que força os botões de hemácias não aglutinadas a escorrerem livres, formando uma linha de escorrimento, enquanto as hemácias não aglutinadas não escorrem e ficam retidas no botão (OIE, 2015). O título da IH é indicado pela maior diluição do soro que cause a inibição de 4 UHA do antígeno.

Para a inibição da hemaglutinação, controle positivo e negativo foram adicionados em todas as placas. Diluições de base dois foram realizadas no soro ao longo da placa em 25 µL de PBS até a diluição 1280 e adicionado 25 µL do antígeno. Viral inativado a 4 UHA em cada poço. Após 30 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado 25 µL da suspensão de sangue de galinhas SPF a 1% em cada poço da placa. A leitura foi realizada após 40 minutos em temperatura ambiente e o título da IH foi considerada a maior diluição do soro que causou inibição completa de hemaglutinação, produzindo uma corrente quando inclinada a placa.

5.4.4 Inibição da hemaglutinação para Doença de Newcastle (APMV-1)

Todos os procedimentos para obtenção da suspensão de hemácias até a obtenção do soro foram idênticos ao tópico anterior, mas a cepa do vírus utilizada foi do vírus da doença de Newcastle inativado, estirpe Ulster inativado com 1% de formol,

cedido pelo Laboratório de Doença das Aves da UFMG. Os demais procedimentos para o teste de IH para a DNC também foram realizados conforme explicado anteriormente (item 5.4.3).

Somente animais com titulação acima de 1:16 foram considerados positivos, conforme Leighton & Heckert (2007).

5.4.5 PCR para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*

Os procedimentos foram realizados no Centro Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME). Foram adicionados 25µL de água ultrapura aos *ependorfs* contendo os *swabs* de orofaringe e homogeneizados em vórtex por cinco minutos para a retirada do *swab*. O DNA foi extraído pelo método de fervura (NASCIMENTO et al., 1991).

Os *primers* utilizados para *M. gallisepticum* foram MG-f (GGATCCCATCTCGACCACGAGAAA) e MG-r (CTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA) (NASCIMENTO et al., 1991) com amplificação do fragmento 732pb e para *M. synoviae* MS-f (GAGAAGCAAAATAGTGATTCA) e MS-r (CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA) (LAUERMAN et al., 1993) com amplificação do fragmento 207pb. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) e uma escada de 100pb (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, RS) foram utilizadas como marcadores.

5.4.6 Extração de RNA

O RNA foi extraído dos *swabs* de orofaringe e de cloaca pelo método do TRIzol® (Invitrogen) seguindo instrução dos fabricantes. Para transcrição reversa do RNA das amostras extraídas e PCR foi utilizado *kit One Step Superscript III* (Invitrogen) seguindo-se recomendações do fabricante com os oligonucleotídeos específicos para regiões dos vírus Influenza e Newcastle. Os controles negativos utilizados foram de amostras negativas para ambos os vírus previamente testadas.

5.4.7 RT-PCR para Influenza Aviária (IA)

Foram utilizados *primers* M52C (5-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3) e M253R (5- AGGGCATTTTGGACAAAGCGTCTA-3) (FOUCHIER et al., 2000) que amplifica a região M do vírus.

Para reação de RT-PCR foram utilizados 5 µL de RNA, 12,5 µL de Tampão mix 2x, 3, 74 µL de MgSO₄, 0,6 µL de *Taq platinum*, 1 µL de cada primer a 10 pmol e

1, 16 µL de água ultrapura DEPC. As temperaturas da ciclagem foram 45°C por 30 minutos, 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 45 segundos e 68°C por 45 segundos, seguidos de 68°C por cinco minutos. O controle positivo utilizado foi RNA de amostra positiva proveniente de isolamento viral e cedido pelo Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) e uma escada de 100pb foram utilizadas como marcadores.

5.4.8 RT-PCR para Doença de Newcastle

Foram utilizados *primers* NDVF (CCTTGGTGAITCTATCCGIAG) e NDVR (GCCACTGCTAGTTGIGATAATCC) (SEAL; KING; BENNETT, 1995) que amplificam parte da proteína de fusão (F) do vírus.

Para reação de RT-PCR foram utilizados 5 µL de RNA, 12,5 µL de Tampão mix 2x, 2 µL de MgSO₄, 1 µL de taq platinum, 1,5 µL de cada primer a 10 pmol e 1,5 µL de água ultrapura DEPC.

As temperaturas da ciclagem foram 45°C por 30 minutos, 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos e 68°C por 45 segundos, seguidos de 68°C por 7 minutos. O controle positivo utilizado foi RNA de amostra vacinal (New-Vacin La Sota, Biovet) extraído por TRIzol®.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) e uma escada de 100pb foi utilizada como marcador.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao exame físico, dos 88 gansos, um apresentou sinais de diarreia, 5,6% (5/88) apresentaram na auscultação estertores em sacos aéreos abdominais caudais e 52% (46/88) apresentaram ectoparasitas. Os resultados dos exames realizados nos gansos estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9. Doenças, tipo de amostra, métodos e resultados de avaliação molecular e sorológica de 88 gansos adultos de três parques públicos

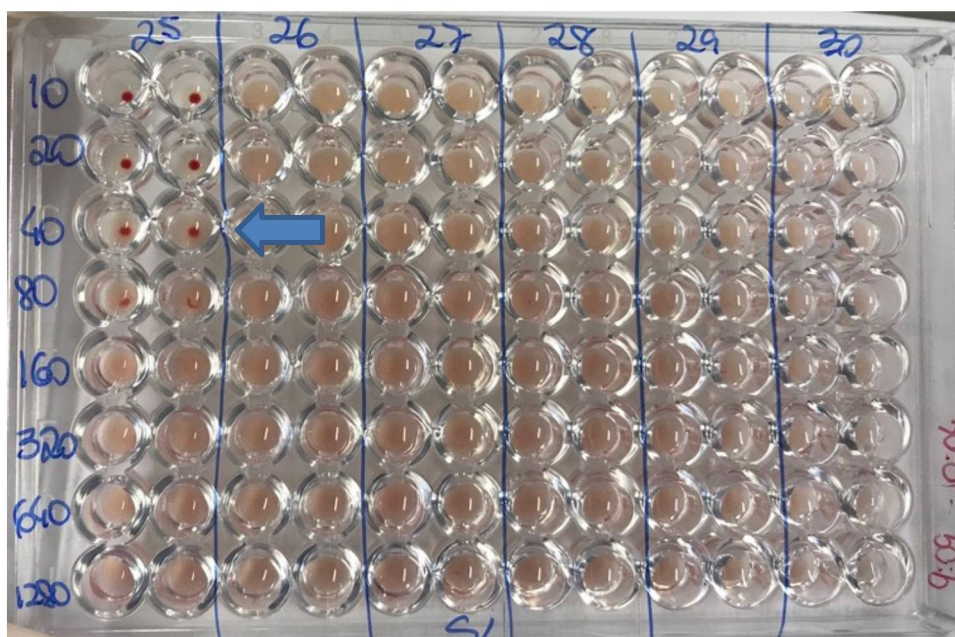
Doenças	Amostras	Métodos	Resultados
Influenza A (H1N1)	Swab de OF e cloaca	RT-PCR (FOUCHIER et al., 2000)	Negativo
Influenza A (H1N1)	Soro	IH (OIE, 2015)	Negativo
Newcastle (APMV-1)	Swab de OF e cloaca	RT-PCR (SEAL; KING; BENNETT, 1995)	Negativo
Newcastle (APMV-1)	Soro	IH (OIE, 2015)	5,6%
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Swab de OF e cloaca	PCR (NASCIMENTO et al., 1991)	Negativo
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Swab de OF e cloaca	PCR (LAUERMAN et al., 1993)	Negativo

APMV-1 - Avian Paramyxovirus tipo 1 OF: Orofaringe. RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. IH: Inibição da Hemaglutinação. PCR: Polymerase Chain Reaction

A PCR das 88 amostras para *M. gallisepticum* e *M. synoviae* foram negativas. A RT-PCR para Influenza Aviária e Doença de Newcastle das 88 amostras foram negativas.

Em relação ao teste sorológico de IH, todas os soros foram negativos para IA e 5,6% (5) animais foram positivos para DNC um proveniente do Parque São Lourenço (Figura 3) e quatro do Parque Barigui (Tabela 10). Nenhum dos animais soropositivos apresentou alterações no exame físico.

FIGURA 3. Reação da Inibição da Hemaglutinação para Orthoavulavirus aviário 1, em microplaca com fundo em "U" com sorologia positiva.



Teste de seis animais (números superiores: 25, 26, 27, 28, 29 e 30) do Parque São Lourenço. A seta indica animal positivo (25) na titulação de 1:40 onde há inibição completa da hemaglutinação nos dois poços (amostra em duplicata). Os demais animais são considerados negativos pela ausência do botão nos poços.

TABELA 10. Origem e titulação de gansos (*Anser* sp.) adultos, saudáveis, soropositivos pelo teste da Inibição da Hemaglutinação para Orthoavulavirus aviário 1 (Doença de Newcastle) provenientes de parques públicos na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil

Parques	Soropositivos	Titulação
Barigui	10% (4/40)	1:20; 1:40; 1:40; 1:160
Tingui	- 0/9)	-
São Lourenço	2,5% (1/39)	1:80

No presente estudo não foram verificados animais positivos pela técnica de PCR para DNC. Não existe histórico de morte súbita ou presença de sinais clínicos aparentes nos animais dos parques, ao que se tem conhecimento. Devido a falta de controle do número exato de indivíduos, migração entre parques e controle de nascimentos, certos dados não são passíveis de comparação. Não foram encontrados dados a respeito de Anseriformes de parques no Brasil.

No Brasil, no estado de São Paulo, estudo epidemiológico com passeriformes que habitavam áreas próximas a granjas comerciais, não houve detecção molecular de DNC, IA ou *M. gallisepticum* (GUIMARÃES et al., 2016). Devido a utilização de vacinas na avicultura comercial, a presença de aves em constante contato com tais

animais é preocupante. A interpretação de resultados de IH em aves que dividem o ambiente com animais de avicultura comercial apresenta certas limitações, demonstrando que a presença de anticorpos no soro das aves indicam que a DNC ocorre a campo ou no caso de animais que convivem com aves da avicultura, pode haver inalação ou ingestão de partículas virais das vacinas (SILVA et al., 2006). Em São Paulo em estudos com pombos domésticos, não foram encontrados animais positivos para DNC (CARRASCO et al., 2015).

No nordeste do país, A DNC foi verificada em 22% (5/22) *pools* de aves migratórias por isolamento viral (ARAÚJO et al., 2004). Já no Norte, Thomazelli et al. (2012) avaliaram 1022 aves assintomáticas domésticas e selvagens e demonstraram por RT-qPCR 0,7% (7) animais positivos para cepas de baixa patogenicidade de DNC, sendo que 70% dos animais avaliados foram anseriformes. Dos sete positivos, cinco foram patos mantidos em pequenas fazendas e dois foram maçaricos (Charadriiformes) de vida livre.

Na China há relatos de surtos de DNC em gansos em 1997 e acometeram cerca de 200 bandos com incidência de 40 a 100% e taxa de mortalidade de 30 a 100% com animais de todas as idades sendo acometidos, mas com maior morbidade e mortalidade em jovens (LIU et al., 2008).

Em relação a sorologia, dos 88 animais cinco foram soropositivos para DNC. Não existem estudos sorológicos no sul do país com Anseriformes para DNC. No presente estudo, somente animais com titulação maior que 1:16 foram considerados positivos (LEIGHTON; HECKERT, 2007). No estado do Rio de Janeiro, um ganso (*A. anser*) foi positivo para DNC com título de 1:8 (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2003). No Zoológico do Rio de Janeiro e arredores, 3,2% (8/253) aves (rapinantes e galiformes) foram soropositivas para o vírus da DNC com titulações variando de 1:8 a 1:128 (BELLUCI et al., 1999). No nordeste do Brasil, Silva et al. (2006) verificaram sorologicamente a circulação de cepas lentogênicas de DNC em galinhas domésticas.

A IH é muito utilizada internacionalmente pela sua simplicidade e facilidade de interpretação. O soro de galinhas (utilizado para a primeira parte do teste) raramente revela resultados inespecíficos positivos, logo, não é necessário o tratamento do soro. Resultados são considerados positivos se houver inibição da hemaglutinação na diluição inicial de 1:16 ou mais, com 4 UHA do antígeno (LEIGHTON; HECKERT, 2007).

Em relação aos animais negativos na PCR e soropositivos, no caso da DNC a sorologia positiva é um indicativo de contato prévio com o agente, porém não é necessariamente indicativo de doença. A presença de gansos soropositivos para DNC infere o estado sorológico populacional momentâneo devido ao caráter intermitente de eliminação do vírus (AWAN; OTTE; JAMES, 1994), falhas em testes moleculares podem ocorrer. Os mesmos autores citam que o grande número de espécies aviárias, presença de portadores, introdução de aves suscetíveis e heterogeneidade de estirpes virais são fatores que mantêm o agente nas populações. As infecções por DNC em aves selvagens aparentemente causam pouca ou nenhuma doença, mas resultam em uma resposta imune humoral detectável, bem como replicação e excreção do vírus entre as populações aviárias. Dentre as espécies mais acometidas estão o corvo-marinho e os pombos-domésticos, já os anseriformes selvagens se infectam com cepas de baixa virulência (LEIGHTON; HECKERT, 2007).

Em estudo vacinal com a cepa Ulster DNC com gansos (*A. cygnoides*) em São Paulo, os animais mostraram-se sensíveis a infecção experimental com a estirpe patogênica, porém, refratários aos sinais clínicos. O mesmo estudo demonstrou tais gansos como fonte disseminadora do vírus para galinhas que coabitavam com os animais (CAMPIONI, 2009).

No presente estudo, os gansos foram negativos molecular e sorologicamente para IA, e não há relatos da doença em Anseriformes no estado do Paraná. Existem poucos estudos a respeito da IA em gansos no Brasil, sendo os patos mais estudados pela sua constante manutenção em criações de subsistência. Os Anseriformes são reservatórios naturais do vírus da IA, uma das mais importantes doenças zoonóticas de aves e além de diversas cepas, diversos são os métodos para detectar infecção e exposição ao vírus (FIORELLO, 2020). Ao contrário do verificado no presente estudo, gansos (*A. anser*) positivos para IA já foram verificados na Europa (FOUCHIER et al., 2003; SINNECKER et al., 1983; SÜSS et al., 1994). As alterações causadas pelos seres humanos no uso de terra e lagos aumenta a densidade de anseriformes em determinados locais, causa estresse e leva a aproximação de espécies domésticas, podendo aumentar a transmissão de IA entre os bandos e entre espécies (VANDEGRIFT et al., 2010). Lugarini et al (2018) verificaram por RT-PCR somente um passeriforme positivo para IA dentre 529 amostras, no sul do Brasil.

A subfamília Anatinae, gênero *Anas* constitui o maior reservatório natural de IA não patogênica (STALLKNECHT; BROWN, 2007; WALLENSTEN et al., 2007). De

acordo com a Instrução Normativa nº50 de 24 de setembro de 2013 a IA faz parte da lista de doenças erradicadas ou nunca registradas no Brasil, que requerem notificação imediata de caso suspeito ou diagnóstico laboratorial (MAPA, 2013) logo, a ausência de animais positivos tanto na sorologia quanto no RT-PCR pode indicar que as aves dos referidos parques não tiveram contato ou se infectaram com o vírus. Golono (2009) em estudo epidemiológico por PCR e *GeneScan* em todas as regiões do Brasil em um período de três anos, encontrou 2,7% (18/671) aves positivas para IA sendo sete de patos (*Cairina moschata*) provenientes de granjas comerciais e fundo de quintal nos estados do Pará e da Bahia, oito de aves aquáticas (pinguins e trinta-réis) em São Paulo e no Pará. As demais aves positivas (galinhas e perus) foram encontradas também no Pará. Já em estudo sorológico por IH realizado em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul com galinhas e patos, 0,85% (6/704) dos animais foram positivos, sendo cinco galinhas e um pato para o subtipo H1 de IA, indicando uma baixa atividade viral no Brasil (CASTRO FILHO et al., 2018).

Por enquanto, somente cepas de baixa patogenicidade de IA foram isoladas em aves silvestres (SILVA et al., 2006). No estado do Rio Grande do Sul, exames sorológicos evidenciaram a presença de diferentes subtipos de IA em aves migratórias e residentes (Ministério da Saúde, 2006). Já no estado do Rio Grande do Norte, IA foi verificada em 59% (13/22) dos *pools* de aves migratórias e residentes (ARAÚJO et al., 2004). Em São Paulo, 27% (10/37) aves migratórias foram positivas por RT-PCR para IA (KAWAMOTO et al., 2005). Diferentes subtipos de IA foram identificados em aves migratórias nos estados do Pará e Pernambuco e em aves de subsistência nos estados do Amazonas, Pará, Pernambuco, Rio Grande do Sul e Santa Catarina com risco sanitário associado as aves silvestres e de subsistência em áreas próximas a granjas comerciais (MOTA et al., 2013)

Na América do Sul, em estudo sorológico com aves aquáticas selvagens na Argentina, detectou 33% (176/540) de animais positivos, incluindo patos e marrecos, sugerindo que a IA é endêmica nas aves aquáticas selvagens da América do Sul (BROWN et al., 2010a). Já na Europa, 4876 gansos da espécie *Anser* spp. foram avaliados por RT-PCR para IA com positividade de 2% (101) com a maior parte referente ao subtipo H6 (H6N1, H6N2 e H6N8) (MUNSTER et al., 2007).

É importante salientar um ponto da coleta e armazenamento de amostras do presente trabalho. Segundo Swayne & Brown (2018) os *swabs* devem ser mantidos em solução de PBS com antibióticos e meio de transporte viral. Quando não for

possível realizar o processamento, as amostras podem ser mantidas congeladas a -80°C havendo possibilidade de redução de carga viral. As amostras aqui coletadas foram mantidas congeladas -80 °C em tubo tipo *ependorf* estéril e seco. Devido ao período de congelamento pode ter havido redução ou degradação do DNA/RNA presente na amostra, podendo haver um resultado falso negativo por este fator.

O motivo pelo qual os testes sorológicos da avicultura não são frequentemente utilizados em aves selvagens é a baixa sensibilidade (CHUA et al., 2007; SWAYNE; BROWN, 2018). A sorologia é um método de vigilância amplamente utilizado na avicultura comercial e tais vantagens representam um complemento aos métodos mais avançados (como métodos moleculares) na medicina de aves, já que adicionam diferentes perspectivas da infecção. Tais informações auxiliam na interpretação de resultados de isolamento viral além de servirem como um método de menor custo e tempo para identificar populações alvo (BROWN et al., 2010b).

Atualmente, um teste sorológico (IDEXX *FlockCheck AI Multi-Screen Antibody Test Kit*) revelou-se mais sensível para anseriformes do que a IDGA, comumente utilizada para animais de produção (BROWN et al., 2010b). Outro teste comumente utilizado na avicultura comercial além da IH é a inibição da neuraminidase (IN). Ambos são testes sorológicos e podem ser sensíveis, tendo aplicações na triagem de subtipos específicos ou na caracterização de animais conhecidamente soropositivos. Entretanto, a IH e IN não são adequados para triagem geral de animais expostos previamente a IA em aves selvagens pela grande quantidade de testes específicos de subtipos que precisariam ser realizados em cada amostra (BROWN et al., 2010b).

Os motivos que podem ter influenciado os resultados negativos de DNC e IA foram a coleta de *swab* sem meio para estabilização do RNA (STALLKNECHT; BROWN, 2007), período limitado de excreção viral das doenças estudadas (MUNSTER et al., 2007) e o número de amostras no caso da IA, pois conforme Hurtado et al. (2016) é sugerido um número amostral maior que 100, assim como em estudo realizado por Lugarini et al. (2017). Segundo El Zowalaty et al. (2011) a presença de infecções mistas de IA e DNC ocorre, e deve ser removida a influência do orthoavulavirus aviário 1 para que se tenha uma prevalência correta da IA, pois em tal estudo nos Estados Unidos com Anseriformes, grande quantidade de amostras de *swabs* cloacais foram positivas para IA e DNC por RT-PCR, mas foram negativas para IA quando inoculadas em ovos embrionados.

O conhecimento da ecologia da transmissão incluindo aspectos ambientais devido a globalização são muito importantes para minimizar o impacto da IA nas populações selvagens e em relação a saúde pública (VANDEGRIFT et al., 2010). Na Amazônia, 1093 aves migratórias foram avaliadas por RT-PCR e 0,82% (9) dos animais foram positivos, com presença de estirpes virais com estreitas relações genéticas com as estirpes da América do Norte, evidenciando a influência da migração entre as populações (HURTADO, 2013). O monitoramento de aves deve ser frequente visto a possibilidade de introdução do vírus por aves migratórias ou mesmo pela possibilidade de recombinação genética pela convivência de diversas espécies em um mesmo ambiente (GOLONO, 2009).

Pela presença de aves migratórias na cidade de Curitiba (STRAUBE et al., 2014) devido aos grandes ambientes aquáticos na cidade, é frequente a coabitação da fauna residente com tais animais. Assim, mesmo que as aves marinhas tenham uma menor prevalência de infecção por IA do que os patos durante a migração, o potencial de distribuição global dos vírus e o fluxo de genes virais pode ser afetado pelos movimentos destas aves. Ainda que raro, as consequências de uma disseminação mediada por aves marinhas podem ser importantes, pois estas migram por distâncias muito maiores que os anseriformes e conectam várias regiões geográficas, coisa que os anseriformes não fazem. Existem evidências a respeito da mudança de padrões de migração durante a infecção e eliminação do vírus da IA e a identificação das espécies carreadoras do vírus prevenirá o contato com espécies domésticas reduzindo a propagação do vírus (VANDEGRIFT et al., 2010).

No presente trabalho, não foram detectados *Mycoplasma gallisepticum* ou *M. synoviae* dos animais. Gansos, marrecos e patos demonstram sensibilidade a diversas espécies de *Mycoplasma*, como *M. anatis*, *M. anseris*, *M. cloacale* e *M. sp. 1220*, causando infecções de trato respiratório e sistema nervoso. A co-ocorrência de diversas espécies de *Mycoplasma* em Anseriformes é frequente mas a identificação desses microrganismos em laboratórios microbiológicos é difícil pela sua similaridade morfológica, de cultura e bioquímica (GRÓZNER et al., 2019).

Em São Paulo em estudos com pombos domésticos, não foram encontrados animais positivos para MG ou MS (CARRASCO et al., 2015). No mesmo estado, passeriformes que habitavam locais próximos a granjas comerciais não demonstraram positividade molecular para MG (GUIMARÃES et al., 2016). Em Pernambuco, estudo

com frangos de corte e poedeiras comerciais demonstrou positividade para MG e MS em amostras de aves com sinais respiratórios (BARROS et al., 2014).

Na China, *Mycoplasma* sp. foi detectado por PCR em 1% de amostras de fígado de patos criados em fundo de quintal (LIU et al., 2018). MG foi isolado de swabs de esôfago, traqueia, cloaca e sêmen de gansos sem contato direto ou indireto com galinhas ou perus (conhecidamente hospedeiros de MG e MS) na França, apesar de haver possibilidade de contaminação por aves silvestres (BUNTZ et al., 1986). Os mesmos autores citam que o fato de gansos poderem ser hospedeiros de *Mycoplasma* sp. identificam uma potencial fonte de infecção para aves que coabitam com galinhas e perus.

É evidente o crescimento do número de animais em meios urbanos na cidade de Curitiba. Straube et al. (2014) cita que é provável que algumas espécies tenham aumentado seu contingente pela constante oferta de alimentos em residências e parques, situação esta confirmada durante o presente estudo onde foi verificada a constante interação com os gansos e munícipes que vão ao parque com a única intenção de alimentar os animais diariamente.

Devido a presença de aves migratórias na cidade de Curitiba na primavera, sugerem-se coletas em períodos mais específicos e com maior frequência para entender como os vírus da IA e DNC se comportam nas populações de gansos dos parques, além de definir sua patogenicidade.

5.6 CONCLUSÃO

Os gansos dos parques públicos da cidade de Curitiba foram negativos pelos métodos moleculares para Influenza A, Orthoavulavirus aviário 1 e *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*. Sorologicamente, os animais foram negativos para Influenza A e 5,6% foram positivos para Orthoavulavirus aviário. A presença de sorologia positiva para DNC em uma coleta pontual demonstra o contato prévio dos animais com o vírus, devendo haver investigações a respeito de sua patogenicidade e eliminação nestes grupos.

Devido ao caráter pontual não é possível afirmar a ausência de IA, MG ou MS nas populações dos parques de Curitiba devido a diversos fatores poderem influenciar na ausência de resposta imune ou ausência da detecção de DNA/RNA dos microrganismos nas amostras.

5.7 REFERÊNCIAS

- AFONSO, C. L. et al. New Castle Disease (Infection with New Castle Disease Virus). In: **OIE Terrestrial Manual**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 964–983.
- ALEXANDER, D. J. et al. Isolation of influenza A viruses from commercial ducks on a farm in Norfolk between August 1979 and March 1980. **Avian Pathology**, v. 10, n. 3, p. 263–272, 1981.
- ARAÚJO, F. et al. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus do Nilo Ocidental e outros vírus. **Boletim Eletônico Epidemiológico**, v. 4, n. 2, p. 1–12, 2004.
- AWAN, M. A.; OTTE, M. J.; JAMES, A. D. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: A review. **Avian Pathology**, v. 23, n. 3, p. 405–423, 1994.
- BARROS, M. R. et al. Occurrence of *Mycoplasma synoviae* on commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 953–956, 2014.
- BELLUCI, M. S. P. et al. Avaliação sorológica do vírus da doença de Newcastle em aves silvestres Serological survey of Newcastle disease virus in wild birds. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 6, n. 2, p. 66–68, 1999.
- BENÖINA, D.; TADINA, T.; DORRER, D. Natural infection of geese with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and egg transmission of the mycoplasmas. **Avian Pathology**, v. 17, n. 4, p. 925–928, 1988.
- BIGG-WITHER, T. P. **Pioneering in South Brazil: three years of forest and prairie life in the Province of Paraná**. London: [s.n.].
- BROWN, J. D. et al. Antibodies to type A influenza virus in wild waterbirds from Argentina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1040–1045, 2010a.
- BROWN, J. D. et al. Prevalence of antibodies to type A influenza virus in wild avian species using two serologic assays. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 896–911, 2010b.
- BUNTZ, B. et al. Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from geese. **Avian Pathology**, v. 15, p. 615–617, 1986.
- CAMPIONI, J. M. **Estudo de parâmetros clínicos, imunitários e do proteinograma sérico da vacinação contra a doença de Newcastle em gansos-da-China (*Anser cygnoides*): pesquisa do estado portador do vírus e sua importância epidemiológica**. [s.l.] UNESP, 2009.
- CARRASCO, A. DE O. T. et al. Levantamento Sorológico de *Mycoplasma* spp, *Salmonella* sp. e Doença de Newcastle em Pombos Domésticos (*Columba livia*) de Vida Livre. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 1, p. 23–28, 2015.
- CASTRO FILHO, R. P. L. et al. Serological Diagnosis of Influenza S Subtype H1 on Family Poultry of Belo Horizonte, Minas Gerais and Santa Maria, Rio Grande Do Sul, in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 20, n. 4, p. 811–816, 2018.
- CHUA, T.-H. et al. Performance Evaluation of Five Detection Tests for Avian Influenza Antigen with Various Avian Samples. **Avian Diseases**, v. 51, p. 96–105, 2007.
- CONTRERAS, A. et al. Epidemiological role of birds in the transmission and maintenance of zoonoses. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 35, n. 3, p. 845–862, 2016.
- DAOUST, P. Y. et al. Replication of low pathogenic avian influenza virus in naturally infected mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) causes no morphologic lesions. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 2, p. 401–409, 2011.

- EL ZOWALATY, M. E. et al. Selective isolation of Avian influenza virus (AIV) from cloacal samples containing AIV and Newcastle disease virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 2, p. 330–332, 2011.
- ELMBERG, J. et al. Potential disease transmission from wild geese and swans to livestock, poultry and humans: a review of the scientific literature from a One Health perspective. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 7, n. 1, p. 1300450, 2017.
- FERGUSON-NOEL, N. Mycoplasmosis -. In: SWAYNE, D. E. (Ed.). . **Diseases of Poultry**. 14th. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2020. p. 907–965.
- FIORIELLO, C. Seabirds and Waterfowl. In: HEATLEY, J.; RUSSEL, K. (Eds.). . **Exotic Animal Laboratory Diagnosis, First Edition**. 1st. ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2020. p. 585–606.
- FOUCHIER, R. A. M. et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4096–4101, 2000.
- FOUCHIER, R. A. M. et al. Influenza A Virus Surveillance in Wild Birds in Northern Europe in 1999 and 2000. **Avian Diseases**, v. 47, n. s3, p. 857–860, 2003.
- GOLONO, M. A. **Epidemiologia e caracterização molecular de vírus da Influenza em aves residentes e migratórias no Brasil**. [s.l.] USP, 2009.
- GRÓZNER, D. et al. Detection of *Mycoplasma anatis*, *M. anseris*, *M. cloacale* and *Mycoplasma* sp. 1220 in waterfowl using species-specific PCR assays. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–14, 2019.
- GUIMARÃES, M. B. et al. Surveillance for newcastle disease virus, avian influenza virus and *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds near commercial poultry farms surrounded by atlantic rainforest remnants, southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ciencia Avicola**, v. 18, n. 3, p. 387–394, 2016.
- HURTADO, R. et al. Avian Influenza in Wild Birds from South America: Review, Implications and Perspectives. **Exploratory Research and Hypothesis in Medicine**, v. 1, p. 62–74, 2016.
- HURTADO, R. F. **Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves migratórias na região costeira da Amazônia**. [s.l.: s.n.].
- KAWAMOTO, A. H. N. et al. Investigation of influenza in migrating birds, the primordial reservoir and transmitters of influenza in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 88–93, 2005.
- KLEVEN, S. H.; BRADBURY, J. M. Avian Mycoplasmosis. In: **OIE Terrestrial Manual**. 3.3.5.: [s.n.]. p. 844–859.
- KONELL, A. L. et al. Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 221–228, 2019.
- LAUERMAN, L. H. et al. Development and Application of a Polymerase Chain Reaction Assay for *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, v. 37, n. 3, p. 829, 1993.
- LEIGHTON, F. A.; HECKERT, R. A. Newcastle disease and related avian paramyxoviruses. In: THOMAS, N. J.; B, H. D.; ATKINSON, C. T. (Eds.). . **Infectious Diseases of Wild Birds**. [s.l.] Blackwell, 2007. p. 3–16.
- LIU, H. et al. Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from Waterfowl in China. **Avian Diseases**, v. 52, n. 1, p. 150–155, 2008.
- LIU, R. et al. Microbiological Identification and Analysis of Waterfowl Livers Collected from Backyard Farms in Southern China. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2018.
- MAPA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA No 50, DE 24 DE SETEMBRO DE 2013**, 2013.

- MOTA, M. A. et al. Ações de vigilância para influenza aviária desenvolvida no Brasil, no período de 2004 e 2007. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1265–1273, 2013.
- MUNSTER, V. J. et al. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. 0630–0638, 2007.
- NASCIMENTO, E. R. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 35, n. 1, p. 62–69, 1991.
- NIQUEUX, É. et al. Quantitative transmission characteristics of different H5 low pathogenic avian influenza viruses in Muscovy ducks. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 1, p. 78–87, 2014.
- OIE, W. O. FOR A. H. Avian Influenza (Infection with Avian Influenza Viruses). **OIE Terrestrial manual**, p. 1–20, 2015.
- OLIVEIRA JUNIOR, J. G. DE et al. Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 381–383, 2003.
- SAÚDE, M. DA. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do parque nacional da lagoa do peixe/RS para detecção do vírus da febre do nilo ocidental e outros vírus. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. 5, p. 1–8, 2006.
- SEAL, B. S.; KING, D. J.; BENNETT, J. D. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2624–2630, 1995.
- SILVA, J. S. A. et al. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of the Agreste region of the state of Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciencia Avicola**, v. 8, n. 2, p. 125–129, 2006.
- SINNECKER, R. et al. Surveillance of pelagic birds for influenza A viruses. **Acta Virologica**, v. 27, p. 75–79, 1983.
- SIVANANDAN, V. et al. Isolation of H13N2 Influenza A Virus from Turkeys and Surface Water. **Avian Diseases**, v. 35, n. 4, p. 974, 1991.
- STALLKNECHT, D. E.; BROWN, J. D. Wild birds and the epidemiology of avian influenza. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3 SUPPL., p. 15–20, 2007.
- STRAUBE, F. C. et al. **Aves de Curitiba - Coletânea de Registros**. 2nd. ed. Curitiba: [s.n.]. v. 53
- STYLES, D. K.; NADLER, Y. Avian Influenza: A Brief Overview of the Pathobiology and Current Status in Domestic and Nondomestic Species. In: MILLER, E. R.; LAMBERSKI, N.; CALLE, P. (Eds.). **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, Volume 9**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 262–266.
- SÜSS, J. et al. Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. **Archives of Virology**, v. 135, n. 1–2, p. 101–114, 1994.
- SWAYNE, D.; BROWN, I. Avian Influenza (Infection with avian influenza viruses). In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. [s.l.: s.n.]. p. 821–843.
- THOMAZELLI, L. M. et al. Molecular surveillance of the Newcastle disease virus in domestic and wild birds on the north eastern coast and Amazon biome of Brazil. **Revista Brasileira de Ciencia Avicola**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2012.
- VALLEJOS, M. A. V et al. Parque Regional do Iguaçu e adjacências. In: VALENTE, R. M.; SILVA, J. M. C.; STRAUBE, F. C. (Eds.). **Conservação de aves migratórias neárticas no Brasil**. Belem: [s.n.]. p. 292–297.

- VANDEGRIFT, K. J. et al. Ecology of avian influenza viruses in a changing world. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1195, n. May, p. 113–128, 2010.
- WALLENSTEN, A. et al. Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in northern Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 404–411, 2007.
- WASHBURN, B. E.; SEAMANS, T. W. Foraging preferences of Canada geese among turfgrasses: Implications for reducing human-geese conflicts. **Journal of Wildlife Management**, v. 76, n. 3, p. 600–607, 2012.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os gansos aqui estudados são residentes na cidade de Curitiba, habitando parques públicos e estando em contato direto com a fauna nativa, migratória e seres humanos. Tais animais podem ser considerados sentinelas de muitos microrganismos potencialmente patogênicos e estudos a respeito do estado sanitário de populações que mantem este estreito contato são encorajados. Para possibilitar comparação entre populações, gansos provenientes de um criadouro conservacionista na cidade também foram estudados.

Mais da metade dos gansos dos parques públicos aqui avaliados apresentaram sorologia positiva para um dos três protozoários testados (*Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. ou *Neospora caninum*), indicando que a contaminação ambiental ocorre, podendo ser um risco para as populações contactantes. Já nos animais cativos, a verificação de animais sorologicamente positivos também ocorreu, demonstrando que mesmo animais cativos também podem ser fonte de contaminação para outros animais e seres humanos.

Conforme esperado, apesar de baixa, foi verificada a resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli*, a dois dos princípios aqui testados.

Este foi o primeiro estudo no Brasil a estabelecer intervalos de referências hematológicos e bioquímicos séricos hepáticos, renais e musculares em gansos de parques públicos bem como em animais de cativeiro, o que facilitará a comparação de tais resultados com gansos de diferentes estados do país. Não foram encontrados animais positivos por diferentes métodos para Influenza aviária e duas espécies de *Mycoplasma* sp., patógenos estes extremamente preocupantes para a saúde aviária no país. Um animal apresentou sorologia positiva para Orthoavulavirus aviário, demonstrando contato prévio com animal positivo. Devido ao caráter pontual da coleta não é possível afirmar a ausência de tais agentes nas populações de gansos de parques públicos e cativeiro na cidade de Curitiba.

Devido a transmissão de patógenos entre as aves e pela possibilidade de contaminação de espécies domésticas por aves de vida livre, estudos adicionais são encorajados, possibilitando informações a respeito de patogenicidade, eliminação, sazonalidade e potencial zoonótico destes agentes para entender o impacto ambiental gerado nestas populações.

7 REFERÊNCIAS

- ABOULAILA, M. et al. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* in ducks from Behera Governorate, Egypt. **Journal of Protozoology Research**, v. 21, p. 45–49, 2011.
- AGNEW, A. et al. Insights into antimicrobial resistance among long distance migratory East Canadian High Arctic light-bellied Brent geese (*Branta bernicla hrota*). **Irish Veterinary Journal**, v. 69, n. 1, p. 1–5, 2016.
- AHMED, W. et al. Population similarity analysis of indicator bacteria for source prediction of faecal pollution in a coastal lake. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 8, p. 1469–1475, 2008.
- ALLISON, R. Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In: THRALL, M. A. et al. (Eds.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2nd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012. p. 460–475.
- ANDREMONT, A. Commensal Flora May Play Key Role in Spreading Antibiotic Resistance. **Asm News**, v. 69, n. 12, p. 601–607, 2003.
- ARCA-RUIBAL, B. Systemic diseases. In: SAMOUR, J. (Ed.). **Avian Medicine**. 3rd. ed. St. Louis: Elsevier, 2016. p. 359–433.
- ARTACHO, P. et al. Blood biochemistry reveals malnutrition in black-necked swans (*Cygnus melanocoryphus*) living in a conservation priority area. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, n. 2, p. 283–290, 2007.
- BACKUES, K. A. Anseriformes. In: MILLER, R. . E.; FOWLER, M. (Eds.). **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine**. 8th. ed. St. Louis: Elsevier, 2015. p. 116–126.
- BARBOSA, A. D.; MARTINS, N. R. S.; MAGALHÃES, D. F. Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 14, n. 1-2-3, p. 1–9, 2011.
- BARTELS, C. J. M.; WOUDE, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, p. 247–257, 1999.
- BÁRTOVÁ, E.; SEDLÁK, K.; LITERÁK, I. Serologic survey for toxoplasmosis in domestic birds from the Czech Republic. **Avian Pathology**, v. 38, n. 4, p. 317–320, 2009.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, 1966.
- BHATTACHERJEE, A. et al. Haematological and morphometrical analysis of blood cells of Khaki Campbell duck (*Anas platyrhynchos*) in different age groups with respect to sexual dimorphism. **Comparative Clinical Pathology**, v. 27, n. 6, p. 1465–1472, 2018.
- BOEHM, A. B. et al. Tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach: Case study at Avalon Bay, Catalina Island, California. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 673–680, 2003.
- BOLLINGER, T. et al. Concentration of creatine kinase and aspartate aminotransferase in the blood of wild mallards following capture by three methods for banding. **Journal of wildlife diseases**, v. 25, n. 2, p. 225–231, 1989.
- BÖNNER, B. M. et al. Do Canada geese (*Branta canadensis* Linnaeus, 1758) carry infectious agents for birds and man? **European Journal of Wildlife Research**, v. 50, n. 2, p. 78–84, 2004.

- BRACONARO, P. et al. Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 65–72, 2015.
- BUSINGA, N. K.; LANGENBERG, J.; CARLSON, L. Successful Treatment of Capture Myopathy in Three Wild Greater Sandhill Cranes (*Grus canadensis tabida*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 21, n. 4, p. 294–298, 2007.
- CAMPBELL, T. W. Hematology of Birds. In: THRALL, M. A. et al. (Eds.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2nd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012. p. 238–276.
- CAMPBELL, T. W.; SMITH, S. A.; ZIMMERMAN, K. L. Hematology of waterfowl and raptors. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th. ed. [s.l.] Blackwell, 2010. p. 978–979.
- CHALMERS, G. A.; BARRET, M. W. Capture myopathy. In: HOFF, L. G.; DAVIS, J. W. (Eds.). **Noninfectious Diseases of Wildlife**. [s.l.: s.n.]. p. 84–94.
- CHARLES-SMITH, L. E. et al. Hematologic Parameters and Hemoparasites of Nonmigratory Canada Geese (*Branta canadensis*) From Greensboro, North Carolina, USA. **Journa of avian medicine and surgery**, v. 28, n. 1, p. 16–23, 2014.
- CHASKDA, A. A. et al. Assessment of potential sources of protozoan contamination between two avian feeding guilds in a conservation area. **Ostrich**, v. 89, n. 1, p. 25–32, 2018.
- CHEN, J. C.; TSAI, Y. J.; WU, Y. L. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild birds in Taiwan. **Research in Veterinary Science**, v. 102, p. 184–188, 2015.
- CHENG, D.-R. et al. Isolation and Identification of *Escherichia coli* from Goose. **Progress in Veterinary Medicine**, v. 10, p. 41–44, 2008.
- CLARK, P.; RAIDAL, S. R. Haematological indicators of inflammation exhibited by Australian Falconiformes. **Comparative Clinical Pathology**, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2009.
- COLE, D. et al. Free-living Canada Geese and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 935–938, 2005a.
- CONG, W. et al. First report of *Toxoplasma gondii* infection in market-sold adult chickens, ducks and pigeons in northwest China. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.
- CONOVER, M. R.; CHASKO, G. G. Nuisance Canada goose problems in the eastern United States. **Wildlife Society Bulletin**, v. 13, n. 3, p. 228–233, 1985.
- CONTRERAS, A. et al. Epidemiological role of birds in the transmission and maintenance of zoonoses. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 35, n. 3, p. 845–862, 2016.
- COOPER, J. A.; KEEFE, T. Urban Canada goose management: procedures and policies. **Wildl. and Nat. Res. Conf. Trans.**, v. 62, p. 412–430, 1997.
- CORRÊA, S. H. R. **Estudo epidemiológico de doenças infecciosas em anatídeos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo**. [s.l.: s.n.].
- CRAY, C. et al. Serologic Diagnosis of Sarcocystosis in Psittacine Birds: 16 Cases. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 19, n. 3, p. 208–215, 2005.
- CRAY, C.; WACK, A.; ARHEART, K. L. Invalid Measurement of Plasma Albumin Using Bromocresol Green Methodology in Penguins (*Spheniscus* species). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 25, n. 1, p. 14–22, 2011.
- DARWICH, L. et al. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 377–381, 2012.
- DEBROY, C.; ROBERTS, E.; FRATAMICO, P. M. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 169–185, 2011.

- DEHNHARD, N.; QUILLFELDT, P.; HENNICKE, J. C. Leucocyte profiles and H/L ratios in chicks of Red-tailed Tropicbirds reflect the ontogeny of the immune system. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 181, n. 5, p. 641–648, 2011.
- DIAS, D.; TORRES, R. T.; FONSECA, C. Assessment of antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates and screening of *Salmonella* spp. in wild ungulates from Portugal. **Research in Microbiology**, p. 1–10, 2015.
- DOLKA, B. et al. Hematological parameters in relation to age, sex and biochemical values for mute swans (*Cygnus olor*). **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 2, p. 93–100, 2014.
- DONAHOE, S. L. et al. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216–238, 2015.
- DONELEY, B. The physical examination. In: DONELEY, B. (Ed.). . **Avian medicine and surgery in practice: companion and aviary birds**. 2nd. ed. Florida: CRC Press, 2016a. p. 63–70.
- DONELEY, B. Interpreting diagnostic tests. In: DONELEY, B. (Ed.). . **Avian Medicine and Surgery in Practice - Companion and Aviary Birds**. 2nd. ed. Florida: CRC Press, 2016b. p. 117–144.
- DUBE, N.; MBANGA, J. Molecular characterization and antibiotic resistance patterns of avian fecal *Escherichia coli* from turkeys, geese, and ducks. **Veterinary World**, v. 11, n. 6, p. 859–867, 2018.
- DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 275–296, 2003.
- DUBEY, J. P. et al. Isolation and Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* From Striped Dolphin (*Stenella coeruleoalba*) From Costa Rica. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 710–711, 2007.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 60–73, 2010a.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010b.
- DUBEY, J. P. et al. **Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology**. [s.l: s.n.]. v. 139
- EL-MORSEY, A. et al. Morphologic and molecular characteristics of *Sarcocystis atraii* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) infecting the common coot (*Fulica atra*) from Egypt. **Acta Parasitologica**, v. 60, n. 4, p. 691–699, 2015.
- ELARABANY, N. A comparative study of some haematological and biochemical parameters between two species from the Anatidae family within migration season. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 79, n. 1, 2018.
- ELMBERG, J. et al. Potential disease transmission from wild geese and swans to livestock, poultry and humans: a review of the scientific literature from a One Health perspective. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 7, n. 1, p. 1300450, 2017a.
- EWERS, C. et al. Mallard ducks – a waterfowl species with high risk of distributing *Escherichia coli* pathogenic for humans. **Environmental Microbiology Reports** (2009), v. 1, n. 6, p. 510–517, 2009.
- FALLACARA, D. **Survey of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* and *Pasteurella multocida* in free-living waterfowl**. [s.l.] Ohio State University, 2000.

- FALLACARA, D. M. et al. Fecal Shedding and Antimicrobial Susceptibility of Selected Bacterial Pathogens and a Survey of Intestinal Parasites in Free-Living Waterfowl. **Avian Diseases**, v. 45, n. 1, p. 128–135, 2001.
- FALLACARA, D. M. et al. Survey of Parasites and Bacterial Pathogens from Free-Living Waterfowl in Zoological Settings Survey of Parasites and Bacterial Pathogens from Free-Living Waterfowl in Zoological Settings. **Avian Diseases**, v. 48, p. 759–767, 2004.
- FIORELLO, C. Seabirds and Waterfowl. In: HEATLEY, J.; RUSSEL, K. (Eds.). . **Exotic Animal Laboratory Diagnosis, First Edition**. 1st. ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2020. p. 585–606.
- FRANCO, C.; SCHNITTGER, L.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. Sarcocystis. In: M, F.-C.; L, S. (Eds.). . **Parasitic protozoa of farm animals and pets**. Switzerland: Springer, 2018. p. 103–124.
- FRIEDRICH, K. R. et al. ASVCP reference interval guidelines: Determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 4, p. 441–453, 2012.
- GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do Norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 123–127, 2000.
- GEFFRÉ, A. Reference guide for Reference Value Advisor v2 . 1 February 2012. n. February, p. 1–17, 2012.
- GILBERT, M.; PHILIPPA, J. Avian influenza H5N1 virus: Epidemiology in wild birds, zoo outbreaks. In: FOWLER, M. E.; MILLER, E. R. (Eds.). . **Zoo and Wild Animal Medicine, Vol 7**. 7th. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. p. 343–348.
- GONDIM, L. S. Q. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1–2, p. 121–124, 2010.
- GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte Ratio as a Measure of Stress in Chickens. **Avian Diseases**, v. 27, n. 4, p. 972, 1983.
- GUENTHER, S. et al. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1–2, p. 219–225, 2010.
- GULLAND, F. M. D.; HAWKEY, C. M. Avian Hematology. **Vet Annual**, v. 30, p. 26–136, 1990.
- HARFOUSH, M.; TAHOON, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic ducks, free-range chickens, turkeys and rabbits in Kafr El-Sheikh Governorate, Egypt. **J Egypt Soc Parasitol**, 2010.
- HARR, K. E. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, n. 3, p. 140–51, jan. 2002.
- HERMAN, C. M.; BARROW, J. H.; TARSHIS, I. B. Leucocytozoonosis in Canada geese at the Seney National Wildlife Refuge. **Journal of wildlife diseases**, v. 11, n. 3, p. 404–411, 1975.
- HRUDEY, S. E. et al. Walkerton: Lessons learned in comparison with waterborne outbreaks in the developed world. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 1, n. 6, p. 397–407, 2002.
- HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 4, p. 639–659, 2004.
- IBRAHIM, H. M. et al. *Toxoplasma gondii*: Prevalence of natural infection in pigeons and ducks from middle and upper Egypt using serological, histopathological, and

- immunohistochemical diagnostic methods. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, n. December 2017, p. 45–49, 2018.
- INSTITUTE, C. AND L. S. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. [s.l.: s.n.].
- ISHII, S.; MEYER, K. P.; SADOWSKY, M. J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5703–5710, 2007.
- JAHANTIGH, M.; ZAMANI-AHMADMAHMUDI, M. Hematology and serum biochemistry values in greylag geese (*Anser anser*) in Southeast Iran. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 4, p. 671–675, 2016.
- JENNINGS, I. B. Hematology. In: BEYNON, P. H.; FORBES, N. A.; HARCOURT-BROWN, N. (Eds.). **Manual of Raptors, Pigeons and Waterfowl**. 1st. ed. [s.l.] BSAVA, 1996. p. 68–78.
- JIN, W. JIE et al. Distribution of Virulence-Associated Genes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates in China. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 12, p. 1511–1515, 2008.
- KIM, H. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from ducks in Korea. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 2, p. 91–95, 2016.
- KLOSS, C. L.; FEDYNICH, A. M.; BALLARD, B. M. Survey of Blood Parasites in Ross' and White-Fronted Geese in Southern Texas. **The Southwestern Naturalist**, v. 48, n. 2, p. 286–289, 2003.
- KUCZKOWSKI, M. et al. Virulence Genes and the Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli*, Isolated from Wild Waterbirds, in the Netherlands and Poland. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 8, p. 528–536, 2016.
- KULLAS, H. et al. Prevalence of *Escherichia coli* serogroups and human virulence factors in faeces of urban Canada geese (*Branta canadensis*). **International Journal of Environmental Health Research**, v. 12, n. 2, p. 153–162, 2002.
- KUTKIENE, L. et al. The mallard duck (*Anas platyrhynchos*) as intermediate host for *Sarcocystis wobeseri* sp. nov. from the barnacle goose (*Branta leucopsis*). **Parasitology Research**, v. 107, n. 4, p. 879–888, 2010.
- KUTKIENE, L. et al. Description of *Sarcocystis anasi* sp. nov. and *Sarcocystis albifrons* sp. nov. in birds of the order Anseriformes. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 1043–1046, 2012.
- LEVENGOD, J. M. et al. Influence of diet on the hematology and serum biochemistry of zinc-intoxicated mallards. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 1, p. 111–123, 2000.
- LITERAK, I. et al. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Bacteria , Including Strains with Genes Encoding the Extended-Spectrum Beta-Lactamase and QnrS , in Waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 24, p. 8126–8134, 2010.
- LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3–4, p. 215–221, 2006.
- MAKSIMOV, P. et al. Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 140–149, 2011.

- MANCIANTI, F. et al. *Toxoplasma gondii* in Waterfowl: The First Detection of this Parasite in *Anas crecca* and *Anas clypeata* from Italy. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 561–563, 2013.
- MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 349–351, 2011.
- MCGUIRE, A. M. et al. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1525–1529, 1999.
- MCKINNEY, M. Urbanization, Biodiversity and Conservation. **BioScience**, v. 52, n. 10, 2002.
- MILANI, J. F. et al. Hematology, Plasma Chemistry, and Bacteriology of Wild Tundra Swans (*Cygnus columbianus*) in Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 1, p. 212–215, 2012.
- MOLINA-LÓPEZ, R. et al. High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the Common raven (*Corvus corax*) in the Northeast of Spain. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 300–302, 2012.
- MORÉ, G. et al. Toxoplasma. In: FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. (Eds.). **Parasitic protozoa of farm animals and pets**. [s.l.] Springer, 2018. p. 149–168.
- MURAO, T. et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in wild waterfowl in Chukotka, Kamchatka, Russia and Hokkaido, Japan. **J Parasitol**, v. 94, n. 4, p. 830–833, 2008.
- NUNES, G. L. **Soroprevalência da infecção pelo *T. gondii* em patos de corte em feiras livres no município de Belém-PA**. [s.l.] UEPA, 2016.
- O'REILLY, E. L.; ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins: A review of their function, behaviour and measurement in chickens. **World's Poultry Science Journal**, v. 70, n. 1, p. 27–43, 2014.
- OLSEN, G. H. Bacterial and Parasitic Diseases of Anseriformes. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 475–490, 2009.
- OLSEN, J. H. Anseriformes. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. (Eds.). **Avian Medicine: Principles and Application**. Florida: Wingers Publishing Inc, 1994. p. 1237–1275.
- OTRANTO, D. et al. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 1–2, p. 7–18, 2003.
- OTS, I.; MURUMÄGI, A.; HÕRAK, P. Haematological health state indices of reproducing Great Tits: Methodology and sources of natural variation. **Functional Ecology**, v. 12, n. 4, p. 700–707, 1998.
- OULD-AMROUCHE, A. et al. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. **Veterinary Research**, v. 30, n. 5–6, p. 531–538, 1999.
- PIACENTINI, V. Q. et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Ornithology Research**, v. 23, n. 2, p. 91–298, 2015.
- PRAKAS, P. et al. Identification and Intraspecific Genetic Diversity of *Sarcocystis rileyi* from Ducks, *Anas* spp., in Lithuania and Finland. **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 5, p. 657–661, 2014.
- PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, v. 58, n. 1, p. 45–58, 2012.

- PRESTRUD, K. W. et al. Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1–2, p. 6–12, 2007.
- RAIDAL, S. Laboratory diagnostics for birds. In: HEATLEY, J.; RUSSELL, K. (Eds.). . **Exotic animal laboratory diagnosis**. [s.l.] Wiley Blackwell, 2020. p. 429–436.
- RAMEY, A. M. et al. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Migratory Birds Inhabiting Remote Alaska. **EcoHealth**, v. 15, n. 1, p. 72–81, 2017.
- RIBEIRO, M. J. M. et al. Soroepidemiologia de *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora* spp. Em Equinos no Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 142–150, 2016.
- ROCCHIGIANI, G. et al. *Neospora caninum* in wild waterfowl: occurrence of parasite DNA and low antibody titers. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 142–145, 2016.
- RONG, G. et al. Seroprevalence, risk factors and genotyping of *Toxoplasma gondii* in domestic geese (*Anser domestica*) in tropical China. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–4, 2014.
- ROUTH, A.; SANDERSON, S. Waterfowl. In: TULLY, T. N.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. (Eds.). . **Handbook of Avian Medicine**. 2nd. ed. New York: Saunders, 2009. p. 275–308.
- SAKAS, P. Nutritional diseases. In: SAKAS, P. (Ed.). . **Essentials of Avian Medicine: A Guide for Practitioners**. 2nd. ed. [s.l.] American Animal Hospital Association Press, 2002. p. 173–181.
- SAMOUR, J. Diagnostic Value of Hematology. **Clinical Avian Medicine Volume II**, p. 587–598, 2006.
- SANDSTRÖM, C. A. M. et al. Latitudinal variability in the seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in non-migrant and Arctic migratory geese. **Veterinary Parasitology**, v. 194, n. 1, p. 9–15, 2013.
- SANTOS, M. **Frequência da infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas caipira e frangos de corte em regiões dos Estados do Rio Grande do Norte e Paraíba**
Frequência da infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras e frangos de corte em regiões dos estados do Rio. [s.l.: s.n.].
- SHAVE, H. J.; HOWARD, V. A hematologic survey of captive waterfowl. **Journal of wildlife diseases**, v. 12, p. 195–200, 1976.
- SILVA, E. E. et al. Pesquisa de enterobactérias em patos domésticos (*Cairina moschata*) de propriedades localizadas em quatro municípios do Ceará , Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 16–21, 2014.
- SIMKISS, K. **Calcium in reproductive physiology: a comparative study of vertebrates**. New York: Reinhold Publishing Corp, 1967.
- SOUZA, C. et al. Caracterização sorológica dos antígenos de superfície em cepas de *Escherichia coli* isoladas de suínos com diarreia no estado do paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 51–55, 2007.
- STANDRIDGE, J. H. et al. Effect of waterfowl (*Anas platyrhynchos*) on indicator bacteria populations in a recreational lake in Madison, Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 547–550, 1979.
- STOECKEL, D. M. et al. Comparison of seven protocols to identify fecal contamination sources using *Escherichia coli*. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 22, p. 6109–6117, 2004.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, 2000.

- THAKUR, S.; GRAY, G. C. The mandate for a global “one health” approach to antimicrobial resistance surveillance. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 2, p. 227–228, 2019.
- THRALL, M. A. Classification of and diagnostic approach to anemia. In: THRALL, M. A. et al. (Eds.). . **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2nd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012. p. 75–80.
- TOWNSEND, A. K.; STAAB, H. A.; BARKER, C. M. Urbanization and elevated cholesterol in American Crows. **Condor**, v. 121, n. 3, p. 1–10, 2019.
- TREVEJO, R. T.; BARR, M. C.; ROBINSON, R. A. Important emerging bacterial zoonotic infections affecting the immunocompromised. **Veterinary Research**, v. 36, p. 493–506, 2005.
- TRUPPEL, J. H. et al. *Toxoplasma gondii* in Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) antibodies and DNA detected by IFAT and PCR. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 141–146, 2010.
- VAZ, F. F. et al. Reference intervals for biochemical analytes of captive Black-Fronted Piping-Guan (*Aburria jacutinga*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 2, p. 347–351, 2016.
- VERMA, S. K. et al. Toxoplasmosis in geese and detection of two new atypical *Toxoplasma gondii* strains from naturally infected Canada geese (*Branta canadensis*). **Parasitology Research**, v. 115, n. 5, p. 1767–1772, 2016.
- VOGT, NA. A. et al. Carriage of *Campylobacter*, *Salmonella*, and Antimicrobial-Resistant, Non-specific *Escherichia coli* by Waterfowl Species Collected from Three Sources in Southern Ontario, Canada. **Journal of wildlife diseases**, v. 55, n. 4, p. 000–000, 2019.
- WAAP, H. et al. Epidemiological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in urban pigeons from the area of Lisbon (Portugal). **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3–4, p. 306–309, 2008.
- WANG, Y. et al. Distribution of serotypes and virulence-associated genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from ducks. **Avian Pathology**, v. 39, n. 4, p. 297–302, 2010.
- WILLIAMS, E. S.; THORNE, E. T. Exertional myopathy (capture myopathy). In: FAIRBROTHER, A.; LOCKE, L. N.; HOFF, G. L. (Eds.). . **Noninfectious Diseases of Wildlife**. Iowa: Iowa State University Press, 1996. p. 181–193.
- WILLIAMS, J. I.; TRAINER, D. O. A hematological study of snow, blue, and Canada geese. **Journal of wildlife diseases**, v. 7, n. 4, p. 258–265, 1971.
- WOBESER, G. A. **Essential of Disease in Wild Animals**. 1st. ed. [s.l.] Blackwell, 2006.
- WOBESER, G.; LEIGHTON, F. A.; CAWTHORN, R. J. Occurrence of *Sarcocystis lankesteri*, 1882, in wild geese in Saskatchewan. **Canadian Journal of Zoology**, v. 59, n. 8, p. 1621–1624, 1981.
- YAN, C. et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in the domestic goose (*Anser domestica*) in Southern China. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 4, p. 299–302, 2011.
- YANG, N. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Slaughtered Pigs and Cattle in Liaoning Province, Northeastern China. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 2, p. 440–441, 2012.
- YODER, J. et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance for Waterborne Disease and Outbreaks Associated with Recreational Water Use and Other Aquatic Facility-Associated Health Events — United States , 2005 – 2006 and Surveillance for

- Waterborne Disease and Ou. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 57, n. 9, p. 39–63, 2008.
- YU, X.-H. et al. Serotype Identification and Virulence-associated Genes Analysis of Pathogenic *E.coli* Isolated from Ducklings. **Acta Vveterinaria et Zootechnica Sinica**, n. 01, p. 53–59, 2008.
- ZHI, S. et al. Assessing host-specificity of *Escherichia coli* using a supervised learning logic-regression-based analysis of single nucleotide polymorphisms in intergenic regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 92, p. 72–81, 2015.
- ZOU, Y. et al. First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in poultry meat intended for human consumption in eastern China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, n. August, p. 172–174, 2017.
- ZUCHOWSKA, E. **Some blood parameters in zoo birds**. Proc Euro Conf Avian Med Surg. **Anais...**1993

**ANEXO 1 – INTERVALOS DE REFERÊNCIA (IR) ABSOLUTOS E RELATIVOS DE HEMATOLOGIA E PROTEÍNA
PLASMÁTICA TOTAL DE 84 GANSOS (*ANSER SPP.*) ADULTOS E SAUDÁVEIS PROVENIENTES DE PARQUES PÚBLICOS
DA REGIÃO DE CURITIBA, PARANÁ**

Parâmetro	Uni	Média	DP	Mediana	Min	Max	IR	Lim. inferior	Lim. superior	Método
Eritrócitos	10 ³	2,53	0,55	2,42	1,31	4,6	refazer			
Hemoglobina		11,13	4,02	9,85	5,3	23,9	7,20-12,5 (R)	6,78-7,64	12,04-12,95	PUS
Hematócrito	%	43,95	4,97	44	25	54	34-53,9 (S)	32,6-35,5	52,4-55,4	PUS
VGM	µm ³	179,24	32,9	180,85	93,13	319,39	114,74-246,36 (S)	97,75-128,77	231,89-260,41	PUR
CHVM	%	25,34	8,34	23,71	11,63	47,29	13,96-47,2 (S)	13,19-15,02	41,19-55,07	PTR
PPT	g/dL	5,01	0,64	5	3,8	8,6	4-6,58	3,8-4,2	6-8,6	NP
Leucócitos	µL	14250	7428,1	12000	3000	32000	3955,3-33950,7 (S)	3495,3-4643,5	29668,4-38644	PTS
Segmentados	Abs	5671,42	3836,23	4430	570	18800	964-16,152	728,6-1277,4	13560,8-19156,3	PTS
	%	39,72	14,22	40	3	77	11,8-68,7(S)	7,5-16	64,1-73,4	PTS
Bastonetes	Abs	48,67	159,44	0	0	960	0-671,3	0	426,3-960	NP
	%	0,26	0,73	0	0	3	0-3	0	2-3	NP
Linfócitos	Abs	7213,92	4820,43	6140	1080	25520	1245-21835	1080-2003,8	18306,3-25520	NP
	%	50,27	15,94	49,5	16	88	18,4-82,2	13,9-23	77,2-86,9	NP
Eosinófilos	Abs	564,4	657,99	385	0	3750	0-3467,5	0	1391,3-3750	NP
	%	3,8	3,29	3	0	16	0-14,8	0	9,9-16	NP
Monócitos	Abs	214,16	251,4	160	0	13	0-1028,8	0	635-1300	NP
	%	1,91	2,31	1	0	1300	0-12	0	5-13	NP
Basófilos	Abs	214,16	251,4	355	0	2750	0-1887,5	0	1373,8-2750	NP
	%	1,91	2,31	4	0	13	0-11,9	0	8,9-13	NP

Uni: Unidade DP: Desvio padrão IR: Intervalo de referência. IC: Intervalo de confiança. VGM: Volume globular médio. CHGM: Concentração de hemoglobina globular média. PPT: proteína plasmática total (S) outliers suspeitos (R) outliers removidos NP: Não paramétrico PTS: paramétrico transformado standard PTR: paramétrico transformado robusto

ANEXO 2 – INTERVALOS DE REFERÊNCIA (IR) ABSOLUTOS E RELATIVOS DE HEMATOLOGIA E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL DE 43 GANSOS (*ANSER SPP.*) ADULTOS E SAUDÁVEIS PROVENIENTES UM INSTITUTO CONSERVACIONISTA DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ

Parâmetro	Uni	Média	DP	Mediana	Min	Max	IR	Lim. inferior	Lim. superior	Método
Eritrócitos	10 ³	2,92	0,72	2,9	1,64	5,49	1,378-4,33	0,932-1,77	3,95-4,79	PUR
Hemoglobina	g/dL	11,923	1,26	12,1	7,3	13,7	7,34-13,69	7,3-10,34	13,31-13,77	NP
Hematócrito	%	46,18	2,8	46	40	52	40,5-51,9	39,2-41,6	50,7-53,1	PUS
VGM	µm ³	167,49	42,6	156,62	81,96	286,58	75,38-255,22 (S)	56,66-94,87	232,57-276,88	PUR
CHVM	%	25,82	2,45	26,34	17,38	29,5	21,39-31,53	19,89-23,15	29,68-32,88	PUR
PPT	g/dL	5,59	0,91	5,4	3,8	8,2	3,73-7,46	3,36-4,11	7,05-7,84	PUS
Leucócitos	µL	14000	6736,53	13000	2000	29000	2200-28800	2000-5000	26900-29000	NP
Segmentados	Abs	7327,44	4602,5	6720	500	19710	630,4-19305,4	199,3-1412,2	16064,3-22844,3	PTR
	%	50,16	17,22	52	14	84	15-85,3	8,1-22,2	77,7-92,6	PUS
Bastonetes	Abs	33,25	102,37	0	0	560	0-532	0	197-560	NP
	%	0,27	0,82	0	0	4	0-3,9	0	1,9-4	NP
Linfócitos	Abs	5299,76	3142,53	4410	900	15340	1117,2-13553,4	857-1536,1	11077,4-16112,7	PTS
	%	40,55	18,92	36	10	80	11,8-88,1	9,2-15,5	74,9-102,4	PTS
Eosinófilos	Abs	372,09	743,01	160	0	3510	0-3507	0	1144-3510	NP
	%	2,27	3,08	1	0	13	0-12,9	0	7-13	NP
Monócitos	Abs	416,04	369,39	270	0	1700	0-1686	0-15,9	884-1700	NP
	%	3,11	2,15	3	0	10	0-9,7	0-0,1	6-10	NP
Basófilos	Abs	551,39	662,66	320	0	2900	0-2880	0	1840-2900	NP
	%	3,6	2,87	3	0	10	0-10	0	8-10	NP

Uni: Unidade DP: Desvio padrão IR: Intervalo de referência. IC: Intervalo de confiança. VGM: Volume globular médio. CHGM: Concentração de hemoglobina globular média. PPT: proteína plasmática total (S) outliers suspeitos (R) outliers removidos NP: Não paramétrico PTS: paramétrico transformado standard PTR: paramétrico transformado robusto

ANEXO 3 – COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 125/2016, referente ao projeto “ESTADO SANITÁRIO DE ANATÍDEOS EM CONTATO DIRETO COM AVES MIGRATÓRIAS”, sob a responsabilidade de Rosângela Locatelli Dittrich – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 07/12/2016.

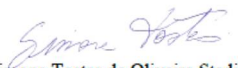
Vigência do projeto	Janeiro/2017 até Junho/2017
Espécie/Linhagem	<i>Anas platyrhynchos domesticus</i> , <i>Anser anser</i> e <i>Cairina moschata momelanotus</i> (aves)
Número de animais	400
Peso/Idade	1 a 6 kg / Variável
Sexo	Ambos
Origem	Fazendas e parques em Curitiba – PR e região metropolitana

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 125/2016, regarding the project “HEALTH STATUS OF ANATIDS IN DIRECT CONTACT WITH MIGRATORY BIRDS” under Rosângela Locatelli Dittrich supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 12/07/2016.

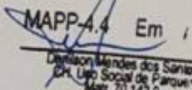
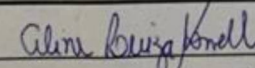
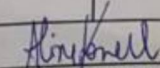
Duration of the project	January/2017 until June/2017
Specie/Line	<i>Anas platyrhynchos domesticus</i> , <i>Anser anser</i> and <i>Cairina moschata momelanotus</i> (birds)
Number of animals	400
Weight/Age	1 to 6 kg / Variable
Sex	Both
Origin	Farms and parks in Curitiba – PR and metropolitan region

Curitiba, 7 de dezembro de 2016.


 Simone Tostes de Oliveira Stedile
 Coordenadora CEUA-SCA

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

ANEXO 4 - AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DOS ANIMAIS DOS PARQUES E BOSQUES DA CIDADE DE CURITIBA, PARANÁ

 PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE DEPARTAMENTO DE PARQUES E PRAÇAS GERÊNCIA DE PARQUES E BOSQUES	
AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA PARQUES E BOSQUES DE CURITIBA - PRORROGAÇÃO	
Pesquisador(es) Solicitante(s): ALINE LUIZA KONELL	
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ Hospital Veterinário - Laboratório de Patologia Clínica Veterinária	
Orientador: Rosangela Locatelli Dittrich	
Endereço: Rua dos Funcionários, 1540 - Juvevê - Curitiba/PR	Contato: Telefone : 3350-5740 email: mvalinekonell@gmail.com
Parque / Bosque:	Parques Barigui, Tingui, Tanguá e São Lourenço
Período: (Prorrogação de prazo) de 24/01/2018 a 24/06/2018.	Horário: 08 às 18 horas
Descrição das atividades: Captura de aves para coleta de amostras sanguíneas e fluidos e imediata soltura no ambiente.	
Utilização de equipamentos para coleta de amostras:	sim (☒) não (☐)
Tipo: Eqto. de Captura, Seringas e material clínico de conservação.	Finalidade: Coleta de amostras de sangue e fluidos.
Utilização de veículos leves ou pesados para carga e descarga:	(☐) Sim (☒) Não
Observações: Esta autorização não dispensa a necessidade de outras autorizações de órgãos tais como IAP, IBAMA, ICMBIO, ANVISA ou do CNPQ. A proteção, segurança e guarda de pessoas e equipamentos fica sob responsabilidade dos pesquisadores.	
Curitiba, 24 de Janeiro de 2018  MAPP-4.4 Em Denise Mendes dos Santos CH. Unid. Social de Parques Matr. 70.142.0	
NORMAS DE UTILIZAÇÃO	
1- FICA O SOLICITANTE RESPONSÁVEL POR QUAISQUER DANOS CAUSADOS DURANTE AS ATIVIDADES 2- O SOLICITANTE DEVERÁ MANTER O LOCAL LIMPO APÓS AS ATIVIDADES. 3- O SOLICITANTE DEVERÁ ATENDER AS SOLICITAÇÕES DOS FISCALIS CREDENCIADOS PELA SMMA. 4- AS ATIVIDADES DEVERÃO SEGUIR RIGOROSAMENTE AS NORMAS ESTIPULADAS PELA SMMA. 5- OS LOCAIS UTILIZADOS DEVERÃO SEGUIR CONFORME ESTIPULADOS PREVIAMENTE PELA SMMA. 6- A PRESENTE AUTORIZAÇÃO DEVERÁ ESTAR NO LOCAL DAS ATIVIDADES 7- O SOLICITANTE TEM 24 HORAS PARA DESMONTAR E RETIRAR EQUIPAMENTOS APÓS AS ATIVIDADES. 8- AS INSTALAÇÕES INCLUSIVE ELÉTRICAS FICARÃO A CARGO DO SOLICITANTE. 9- FICA A CRITÉRIO DESTA SMMA RENOVAR OU NÃO FUTURAS AUTORIZAÇÕES. 10- AS ATIVIDADES PODEM SER INTERROMPIDAS A QUALQUER TEMPO PELA AUTORIDADE COMPETENTE DA SECRETARIA MUN.DO MEIO AMBIENTE PODENDO SEREM REMOVIDAS AS INSTALAÇÕES PELOS FISCALIS DA PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA.	
COMPROMETO-ME A SEGUIR OS TERMOS ACIMA ESTIPULADOS:	
Nome do Responsável: 	Fone:
Data e Assinatura: 24/01/18 	Assinatura

MAPP4G C:\118\EXCEL\MAPP4G\AUTORIZAÇÃO PARA EVENTOS.XLS

Obs.: Terceira prorrogação do prazo, tendo o pedido inicial sido feito em Junho de 2017.

ANEXO 5 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

ISSN 1984-2961 (Electronic)

www.cbvpv.org.br/rbvpv

Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 221-228, apr.-june 2019

Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019042>

Original Article

Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity

Soroprevalência de *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. e *Neospora caninum* em gansos (*Anser* sp.) de parques urbanos e cativeiro

Aline Luiza Konell^{1*} ; Ana Paula Sato¹; Marina Stival²; Nathália Parreira Malaguini²; Alan dos Anjos³; Rafaela Furioso Ferreira⁴; Rosângela Locatelli-Dittrich¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, Brasil

² Médica Veterinária Autônoma, Curitiba, PR, Brasil

³ Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, Brasil

⁴ PhD Student at Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

Received November 13, 2018

Accepted May 8, 2019

Abstract

Geese, ducks, mallards, and swans are birds of the order Anseriformes, which are found in the wild, in zoos and parks, and raised for meat consumption. *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., and *Neospora caninum* are protozoans of several species of animals. Wild and domestic birds can serve as intermediate hosts, disseminators and potential sources of infection of these protozoa to humans through contaminated meat. The aims of this study were: (i) to perform a serological survey of *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. and *N. caninum* in geese (*Anser* sp.) from public parks and from captivity and (ii) to compare seroprevalence between these two locations. Antibodies were detected by Immunofluorescence antibody test using the serum of 149 geese. Antibodies to *Sarcocystis* sp., *T. gondii*, and *N. caninum* were detected in 28.18%, 18% and 0.67% of geese, respectively; 57% of geese from urban parks and 26.53% of geese from captivity were seropositive for at least one protozoa. The results indicate environmental contamination, particularly for the occurrence of antibodies against *T. gondii* – a zoonosis that causes toxoplasmosis and is transmitted through oocyte ingestion. This is the first serological survey of *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. and *N. caninum* in geese from urban parks in Curitiba, Brazil.

Keywords: Serology, IFAT, waterfowl.

Resumo

Gansos, patos, marcos e cisnes são aves da ordem Anseriformes, encontrados em vida livre, zoológicos, parques e criados para consumo da carne. *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. e *Neospora caninum* são protozoários capazes de infectar diversas espécies animais. Aves domésticas e silvestres podem ser hospedeiras intermediárias e servir como disseminadoras e potenciais fontes de infecção para seres humanos por meio da carne. O objetivo do estudo foi 1) realizar a soroprevalência de *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. e *N. caninum* em gansos (*Anser* sp.) provenientes de parques públicos e de um cativeiro e 2) comparar a soroprevalência entre os locais. Foi realizada sorologia de 149 *Anser* sp. pelo método da reação de imunofluorescência indireta. Anticorpos para *Sarcocystis* sp., *T. gondii* e *N. caninum* foram encontrados em 28,18%, 18%, e 0,67% dos animais, respectivamente; 57% dos gansos dos parques públicos e 26,53% dos animais cativos foram soropositivos para algum dos protozoários. A ocorrência de anticorpos para tais protozoários indica contaminação ambiental, ressaltando a alta prevalência de anticorpos para *T. gondii*, zoonose transmitida por ingestão dos oocistos. Sugere-se uma investigação da água e medidas ambientais para reduzir a contaminação dos animais e do ambiente. Este é o primeiro trabalho que avaliou sorologicamente gansos provenientes de parques urbanos de Curitiba, Paraná para *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. e *N. caninum*.

Palavras-chave: Sorologia, RIFI, aves aquáticas.

*Corresponding author: Aline Luiza Konell. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, CEP 80035-050, Curitiba, PR, Brasil. e-mail: mvalinekonell@gmail.com.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Geese, ducks, mallards, and swans (Order: Anseriformes, Family: Anatidae) can be found in wildlife, zoos, parks, and they can also be raised in captivity for meat production. According to Corrêa (2007), waterfowl housed in the ponds of zoos and public parks are under constant risk of exposure to the pathogens of migratory birds that visit these places during a certain period every year. Monitoring both the animals and the ecosystem in areas where guest visiting occurs frequently is suggested by Chaskda et al. (2018). Due to birds' ability to fly and their wide variety of feeds, these animals have greater exposure to parasitic infections.

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that infects mammals and birds (MORE et al., 2018). Birds can be intermediate hosts for *T. gondii* and can become infected following the ingestion of raw meat of animals harboring tissue cysts, particularly given the cannibalistic or scavenger behavior of some carnivorous species; or after the ingestion of soil, water, or plant material contaminated with sporulated oocysts (TENTER et al., 2000; MURAO et al., 2008).

Birds are important to the biological cycle of *T. gondii* and to the epidemiology of toxoplasmosis. Poultry represent a potential risk of *T. gondii* infection to humans through the consumption of contaminated poultry products, in addition to their valuable role as sentinels since chickens are important hosts in *T. gondii* cycle, infecting animals through consume of their undercooked meat and for being resistant to clinical toxoplasmosis (GARCIA et al., 2000; DUBEY, 2010b). In the wild, birds can also be involved in the zoonotic cycle when used as a source of protein to feed felids and humans, and they may act as natural reservoirs for and sources of infection to other hosts and the ecosystem (VERMA et al., 2016).

Sarcocystis sp. is an obligate intracellular coccidian parasite that requires an intermediate and a definitive host (usually an herbivore and carnivore, respectively) and can affect several species of mammals and birds (EL-MORSEY et al., 2015). The genus is composed of more than 100 species (some of which are zoonotic) that differ in their levels of pathogenicity, host specificity, cyst structure and location (FRANCO et al., 2018).

Neospora caninum is an obligate intracellular parasite that can have domestic and wild canids as definitive hosts (GONDIM et al., 2010). In experimental infections, it has been found that Columbiformes may be susceptible to, and may serve as intermediate hosts of *N. caninum* (McGUIRE et al., 1999). Although the role of birds in the life cycle of *N. caninum* is unknown, the presence of birds has been correlated with outbreaks of abortion in cattle in Italy (OTRANTO et al., 2003), France (OULD-AMROUCHE et al., 1999) and Netherlands (BARTELS et al., 1999), suggesting that birds may be involved in the sylvatic cycle of the parasite being a mechanical vector or intermediate hosts (DONAHOE et al., 2015).

Sick birds usually mask any clinical signs of diseases (DONELEY, 2016), and they can act as reservoirs for and disseminators of pathogens given their ability to fly and migrate. Epidemiological studies in birds that share spaces with humans (captivity or free life) are extremely important when monitoring diseases with zoonotic potential as they can reduce emerging diseases and assist in biodiversity conservation through assessment of the risk that the microorganisms

may pose for the birds themselves (BRACONARO et al., 2015). Characterization of the microorganism and distribution of the disease are essential for formulating actions that aim to prevent infections, reducing the long-term complications and transmission of pathogens (IBRAHIM et al., 2018).

Serological surveys in Anseriformes are usually conducted in slaughterhouses (ABOULAILA et al., 2011; YANG et al., 2012; ZOU et al., 2017) or with migratory birds (PRESTRUD et al., 2007; SANDSTRÖM et al., 2013; VERMA et al., 2016); further studies are necessary and critical for assessing the prevalence of protozoan infections in other areas (MURAO et al., 2008). Serological surveys of *T. gondii*, *Sarcocystis* sp., and *N. caninum* in birds in Brazil are scarce, and there is no information about the seroprevalence of these protozoa in geese. Geese maintain contact with humans and migratory birds, and thus can serve as reservoir hosts and vectors of zoonotic pathogens (CORRÊA, 2007; YAN et al., 2011; CONG et al., 2012; VERMA et al., 2016).

Considering the important epidemiologic role these species may play disseminating these protozoa, the aim of this study is to determine the seroprevalence for *T. gondii*, *Sarcocystis* sp., and *N. caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks. We also hypothesize that wild geese (from parks) are more exposed to protozoans than captive geese (kept in a conservationist institute). Therefore, the secondary aim of this study was to determine the seroprevalence of geese kept in captivity in southern Brazil and to compare the results obtained from animals from urban parks.

Materials and Methods

Animals

The study population comprised 149 geese (*Anser anser* and *Anser cygnoides*) caught between June 2017 until February 2018. One hundred from three public parks in the city of Curitiba, Brazil (52 from Barigui Park, 9 from Tingui Park and 39 from São Lourenço Park) and 49 from a conservational institute in São José dos Pinhais, which is the surrounding metropolitan area of Curitiba, Brazil.

Of the total sample, 130 geese were adults and 19 were young. The young were determined when the animal weight less than 2,5kg, had initial plumage and notched tips of tail feathers. The geese were captured by placing a net on the animal and submitted to individual physical examination (assessment of body condition, examination of eye, beak, oral cavity, feathers, wings and legs, palpation of the abdomen, cardiac and respiratory auscultation and search for ectoparasites). All captured animals were sampled and added to the study population. Blood samples were collected via medial metatarsal venipuncture using 5 mL sterile syringes with 25×7 mm gauge needles. After sampled, a plastic numbered leg band was placed on the left leg of each animal for further evaluation of migratory behavior. This study was approved by the animal ethics committee of the Federal University of Paraná (Protocol number 125/2016) and by the Parks and Squares Committee of Curitiba City Hall.

Parks and conservationist institute

Barigui Park (25°25'34.52"S 49°18'27.03"W) has an area of 1,400.000 m² located on the banks of the Barigui River. Flocks of geese (*A. anser* and *A. cygnoides*) are commonly sighted cohabiting with ducks, caracaras, capybaras, preas, agoutis, opossums, and different species of passerines. These geese feed mostly on grass and food provided by park visitors (e.g., popcorn, corn, and bread).

Tingui Park (25°23'36.05"S 49°18'21.71"W) is also located on the banks of the Barigui River and has an area of 380,000 m². Approximately 10 geese cohabit with a large diversity of birds, reptiles, and mammals and feed on grass and various foods provided by visitors.

São Lourenço Park (25°23'2.400"S 49°15'55.440"W) has an area of 204,000 m², it is located on the banks of the Belem River and is home to flocks of up to 70 individuals of geese (*A. anser* and *A. cygnoides*). Geese receive daily feeds of corn by park employees, but they also receive bread and popcorn from park visitors. A large amount of birds (raptors, ducks, galliformes, and passerines) and mammals are seen in the vicinity of the park.

The conservationist institute (25°35'17.624"S 49°10'49.184"W) is located in São José dos Pinhais, surrounding the metropolitan area of Curitiba, Brazil. It is home to several species of mammals and birds, including 49 domestic geese (*A. anser*). The geese are kept in two large open enclosures (approximately 3000m² each) containing artificial lakes, and they cohabit with ducks and swans. They have had their wings clipped and are fed on grass, commercial food, fruits, and vegetables. Due their monitored feeding and environment, they were considered as a "captive control" in comparison to wild animals (from urban parks).

Laboratory testing

Blood samples were immediately conditioned in tubes without anticoagulant and transported at room temperature to the laboratory. Samples were centrifuged for 5 minutes at 5,000 rpm to obtain the serum and then stored at -20°C until serological analysis. Detection of specific *T. gondii*, *S. neurona* and *N. caninum* antibodies were carried out by an immunofluorescent antibody test (IFAT). Slides were prepared with tachyzoites of the *N. caninum* NC-1 strain, tachyzoites of the *T. gondii* RH strain, and merozoites of the *S. neurona* SN37R strain with carbonate-buffered glycerin (pH 9.5) and a coverslip. All the strains were from *in vitro* culture in Vero cells at the Laboratory of Veterinary Clinical Pathology of

Federal University of Paraná. Geese serum samples were diluted in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) at a concentration of 1:25 (MARTINS et al., 2011), and conjugated anti-Duck immunoglobulin (Ig)G (KPL®, Milford, MA, USA) was used as a secondary antibody at 1:50 dilution. Dog sera positive for *N. caninum* and *T. gondii* were used to validate a positive control of positive geese sera, which was used for further analysis. A positive serum sample obtained from a bird of prey was used as a positive control for *Sarcocystis* sp. Only samples that exhibited fluorescence of the entire parasitic surface were considered to be positive (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016). Endpoint titers were determined by serial dilutions from 1:25 to 1:150.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using EZR 1.37 (KANDA, 2013), which is a graphical interface for R commander (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, version 3.4.4). Association between age (adult or young), collection point, and the presence of antibodies against each protozoa were analyzed using a chi-squared test. Statistical significance was set at $P < 0.05$ for all analyses.

Results

Antibodies to either *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. and/or *N. caninum* were detected in 70 of 149 geese (Table 1). Antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected in 42 samples, *T. gondii* in 27 samples, and *N. caninum* in one sample. Co-infection with *T. gondii* and *Sarcocystis* sp. was reported in 8% (12 of 149) of geese – one young and 11 adults.

Seropositive animals were found in all places where this study was performed. Antibodies to *N. caninum* were detected in only one animal, which was kept in captivity (conservationist institute) (Figure 1). The detection of *T. gondii* antibodies was significantly higher in animals from urban parks ($X^2 = 5.9303$; $P = 0.015$) than in animals from captivity, although significant differences were not observed for neither *N. caninum* ($X^2 = 0.1336$; $P = 0.715$) nor *Sarcocystis* sp. ($X^2 = 2.7932$; $P = 0.095$).

Serum antibodies titers ranged from 1:25 to 1:150. Antibodies to *T. gondii* were detected at 1:25 titer in 25 animals (all locations) and at 1:50 titer in two animals from Barigui Park. Antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected at 1:25 titer in 22 animals

Table 1. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., and *Neospora caninum* and their co-infection in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity in Curitiba and metropolitan area, Brazil.

	Public Parks			Captivity
	Barigui (n=52)	Tingui (n=9)	São Lourenço (n=39)	Captivity (n=49)
<i>T. gondii</i>	13 (25%)	2 (22.2%)	9 (23%)	3 (6.1%)
<i>Sarcocystis</i> sp.	13 (25%)	7 (77.7%)	13 (33.3%)	9 (18.3%)
<i>N. caninum</i>	0	0	0	1 (2.04%)
Total	26 (50%)	9 (100%)	22 (56%)	13 (26%)
Co-infection*	5	2	4	1

n = total number of animals from each park and captivity). *Co-infection: Seropositivity for both *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* sp.

(all locations), at 1:50 titer in 17 animals (all locations), at 1:100 titer in two animals (from captivity) and at 1:150 titer in one animal (from captivity). Antibodies to *N. caninum* were detected at 1:25 titer in one animal from captivity.

Age was not significant for the detection of *T. gondii* ($X^2=0.36151$; $P=0.548$), *N. caninum* ($X^2=5.9761e-30$; $P=1$), and *Sarcocystis* sp. ($X^2=0.0062$; $P=0.937$) antibodies. 63 adults and seven young animals were seropositive to at least one of the protozoa (Table 2).

Discussion

The occurrence of antibodies to *Sarcocystis* sp. and to *T. gondii* was 28% and 18% of all geese, respectively. The percentage of seropositive animals for *N. caninum* was low, accounting for 0.74% of the total population.

Antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected in geese from all urban parks and from captivity. Most of the geese (90%) in

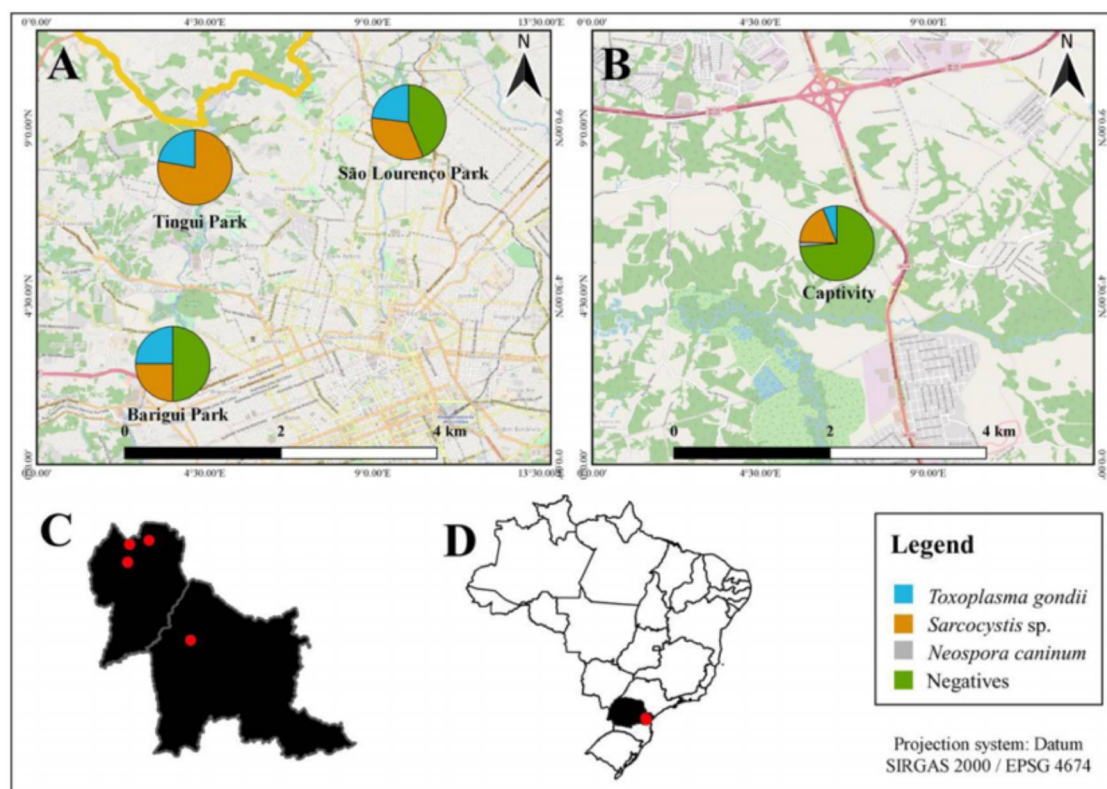


Figure 1. Map showing the location of the study area, including public parks and a breeding center in Paraná, Brazil, and the respective seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., and *Neospora caninum* at each locality. (A) Location of public parks and the respective seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., and *Neospora caninum*; (B) Location of the conservationist institute with seroprevalence of *T. gondii*, *Sarcocystis* sp., and *N. caninum*; (C) Map of Curitiba and the surrounding area, pinpointing the location of urban parks and the breeding center; (D) Map of Brazil showing the location of Paraná state and Curitiba city.

Table 2. Percentage and absolute numbers of young and adult geese seropositive to *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and/or *Neospora caninum*, divided in parks or captivity from Curitiba and metropolitan area, Brazil.

Protozoa	Young	Parks	Captivity	Adult	Parks	Captivity
<i>T. gondii</i>	1 (5.6%)	1 (5.6%)	0	26 (20%)	23 (17.6%)	3 (2.3%)
<i>Sarcocystis</i> sp.	6 (31.5%)	6 (31.5%)	0	36 (27.6%)	27 (20.7%)	9 (6.9%)
<i>N. caninum</i>	0	0	0	1 (0.76%)	0	1 (0.76%)
Total	7 (36.8%)	7 (36.8%)	0	63 (48.4%)	50 (38.4%)	13 (10%)

which antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected were considered healthy at clinical examination (without any changes in evaluated parameters). Four animals seropositive to *Sarcocystis* sp. exhibited nonspecific clinical signs at physical examination, such as cloacal prolapse, diarrhea, and the presence of crackles on chest auscultation. Clinical signs in *Sarcocystis* sp. infection are more evident in old-world psittacines, and they are usually related to neurological and respiratory disorders (CRAY et al., 2005; ARCA-RUIBAL, 2016).

Antibodies to *Sarcocystis* sp. were detected in geese from all urban parks and from captivity. Anseriformes are intermediate hosts of at least four species of *Sarcocystis*: *S. rileyi*, *S. anasi*, *S. albifrons*, and *S. wobeseri* (PRAKAS et al., 2014). However, there are no studies reporting the detection of antibodies to *Sarcocystis* sp. in geese. Antibodies to *Sarcocystis* sp. have been detected in psittacines either with no clinical signs or with nonspecific signs, suggesting that seroconversion did not represent an active infection in these birds but might be related to exposure to the parasite or subclinical infections (CRAY et al., 2005). Diagnosis of sarcosporidiosis is usually performed by post-mortem examinations (KUTKIENĖ et al., 2010, 2012; PRAKAS et al., 2014), and ante mortem examinations are performed by muscle biopsies (CRAY et al., 2005), being therefore underdiagnosed.

Due to the wide variety of *Sarcocystis* species, and the wide variety of definitive and intermediate hosts (FRANCO et al., 2018; PRAKAS & BUTKAUSKAS, 2012), it is difficult to identify the source of goose contamination. Waterfowl that inhabit and feed in shallow waters are more commonly infected than those that inhabit deeper waters (CHEN et al., 2015), suggesting that the infection occurs most commonly in shallow and marshy waters. This result indicates that the population of geese are exposed to *Sarcocystis* sp. in both public parks and captivity probably infected with sporocysts naturally excreted from original host.

The seroprevalence of *T. gondii* in geese in the present study was 18%. There are no previous reports of serological surveys of *T. gondii* antibodies in *Anser* sp. in Brazil. In Europe, seroprevalence ranges from 4.8%–43% (BARTOVÁ et al., 2009; MAKSIMOV et al., 2011; SANDSTRÖM et al., 2013) and from 4.7%–17% in Asia (MURAO et al., 2008; YAN et al., 2011; YANG et al., 2012; RONG et al., 2014). Geese populations from these studies comprised wild, domestic, and hunted animals.

Several serological tests have been employed to detect antibodies to *T. gondii* in anseriformes, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (MURAO et al., 2008; MAKSIMOV et al., 2011; IBRAHIM et al., 2018), direct agglutination test (DAT) (PRESTRUD et al., 2007), indirect hemagglutination (IHA) (HARFOUSH & TAHOON, 2010; RONG et al., 2014; NUNES, 2016), and modified agglutination test (MAT) (YANG et al., 2012; MANCIANTI et al., 2013; SANDSTRÖM et al., 2013; VERMA et al., 2016). However, there is still disagreement regarding the ideal method for detecting antibodies due to the variability of antigenic proteins, as well as differences in the sensitivity, and quality of commercial kits (SANTOS, 2012).

In two serological surveys of geese in Europe, IFAT was also employed: Maksimov et al. (2011) detected antibodies to *T. gondii* in 25.2% of samples and Bartová et al. (2009) detected them in 43% of samples. It is important to emphasize that these studies

were performed on animals from production farms, which are intended for meat consumption. This information is important since *T. gondii* is a zoonosis, the consumption of raw or undercooked meat is one of the main routes of infection (YAN et al., 2011).

Contamination of water by protozoa has also been acknowledged as an important source of infection. The presence of an aquatic environment is one of the few similarities featured in different studies that document seropositive animals from different environments and continents (BARTOVÁ et al., 2009). *T. gondii* oocysts were shown to be viable in the aquatic environment for several months (DUBEY et al., 2003; 2007); hence, surveys of waterfowl infection can serve as good indicators of water and environmental contamination (DUBEY, 2010a; WAAP et al., 2008). Infection of *T. gondii* possibly occurred due to the ingestion of sporulated oocysts in contaminated pasture and water. Oocysts are shed by definitive hosts (felines), as free-roaming cats have unconditional access to urban parks and they have also been sighted in the conservationist institute.

Waterfowls can be a source of toxoplasmosis infection to humans and domestic animals (MURAO et al., 2008), particularly in places where these animals are hunted and consumed, such as in Canada, Europe, and the United States. The presence of visible muscular cysts (macrocysts) is not common in geese, enabling the meat to be consumed without suspicion of contamination (WOBESER et al., 1981). According to park employees from the urban parks documented in this study, it is not unusual for geese to disappear from parks, which may be due to predation by animals and humans. A serological survey of *T. gondii* antibodies in capybaras from Tingui Park revealed the presence of antibodies to *T. gondii* in 62.5% of animals (TRUPPEL et al., 2010). In the present study, 22% of geese were seropositive for *T. gondii* and 77.7% were seropositive for *Sarcocystis* sp., endorsing the need to monitor environmental contamination in Curitiba's urban parks.

Nunes (2016) performed a serological survey of *T. gondii* antibodies in ducks (*Cairina moschata*) sent to a slaughterhouse in Pará, Brazil, and verified a seroprevalence rate of 16.28%, similar to the results of the present study (18%). According to Nunes (2016), the risk of infection is higher in animals raised in extensive systems, a fact that was also supported by the findings of our study, where we found seropositivity to *T. gondii* to be higher in animals from public parks.

The role of birds in the *N. caninum* cycle is still unknown. It has been suggested that they might participate as intermediate hosts, particularly since the report of an immune response to and the presence of parasite DNA in raptors and passerines (GONDIM et al., 2010; DARWICH et al., 2012; MOLINA-LOPEZ et al., 2012). Rocchigiani et al. (2017) reported seropositivity in 34.5% of ducks and mallards (*Anas* sp.) via IFAT in Italy, and suggested that birds that feed on pasture or water plants (like waterfowl) can ingest oocysts and contribute to the transmission of the parasite in the sylvatic cycle as a potential source of infection. In the present study, antibodies to *N. caninum* were detected in only one goose (from captivity). It is possible that the low occurrence of antibodies to *N. caninum* in this study might take place due to the low rate of seroconversion for *N. caninum* in *Anser* sp. or due to different types of feed.

There was no significant difference between the age of the animals and the detection of antibodies to any of the protozoa ($P>0.05$), however, Sandström et al. (2013) evaluated the occurrence of *T. gondii* in geese in the Arctic and in temperate areas and reported that seroprevalence increases with age, suggesting that these birds undergo rapid seroconversion. This author also suggests that juveniles must be sampled in greater numbers to directly link the site of infection with the environment; since the study population in the present study had few samples from young animals (13% of total), further studies are encouraged to evaluate seroconversion in juvenile geese exposed to urban parks in Curitiba.

In conclusion, we observed that wild animals have a higher occurrence of antibodies to *T. gondii* than animals kept in captivity. Waterfowl are considered good indicators of water and environmental contamination (DUBEY et al., 2012; WAAP et al., 2008), suggesting that urban parks are more contaminated with oocysts in water and soil. *Anser anser* and *A. cygnoides* presented with high seropositivity to *T. gondii* and *Sarcocystis* sp., indicating they may have been exposed to these protozoa in urban parks, and that they may serve as a potential source of infection to other animals. This is the first serological survey of *T. gondii*, *N. caninum*, and *Sarcocystis* sp. in geese from urban parks.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Cybelle Souza, Dr. Larissa Reifur, Dr. Rafael Vieira and Dr. Rogério Lange for helping with the manuscript and ANAMI Institute for financial support and assistance during sample procedures.

References

- Aboulaila M, El-Bahy N, Hilali M, Yokoyama N, Igarashi I. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* in ducks from Behera Governorate, Egypt. *J Protozool Res* 2011; 21: 45-49.
- Arca-Ruibal B. Systemic diseases. In: Samour J. *Avian Medicine*. 3rd ed: St. Louis, Missouri: Elsevier; 2016. p. 359-433.
- Bartels CJ, Wouda W, Schukken YH. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 1999; 52(2): 247-257. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00126-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00126-0). PMID:10734392.
- Bártová E, Sedlak K, Literák I. Serologic survey for toxoplasmosis in domestic birds from the Czech Republic. *Avian Pathol* 2009; 38(4): 317-320. <http://dx.doi.org/10.1080/03079450903055405>. PMID:19937517.
- Braconaro P, Saidenberg AB, Benites NR, Zuniga E, Silva AM, Sanches TC, et al. Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. *Microb Pathog* 2015; 88: 65-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.006>. PMID:26279195.
- Chaskda AA, Mwansat GS, Sani D, Turshak L. Assessment of potential sources of protozoan contamination between two avian feeding guilds in a conservation area. *Ostrich* 2018; 89(1): 25-32. <http://dx.doi.org/10.2989/00306525.2017.1368038>.
- Chen J, Tsai Y, Wu Y. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild birds in Taiwan. *Res Vet Sci* 2015; 102: 184-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.010>. PMID:26412541.
- Cong W, Huang S, Zhou D, Xu M, Wu S, Yan C, et al. First report of *Toxoplasma gondii* infection in market-sold adult chickens, ducks and pigeons in northwest China. *Parasit Vectors* 2012; 5(1): 110. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-110>. PMID:22676311.
- Corrêa SHR. *Estudo epidemiológico de doenças infecciosas em anatídeos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
- Cray C, Zieleski-Roberts K, Bonda M, Stevenson R, Ness R, Clubb S, et al. Serologic diagnosis of sarcocystosis in psittacine birds: 16 cases. *J Avian Med Surg* 2005; 19(3): 208-215. [http://dx.doi.org/10.1647/1082-6742\(2005\)019\[0208:SDOSIP\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1647/1082-6742(2005)019[0208:SDOSIP]2.0.CO;2).
- Darwich L, Cabezon O, Echeverria I, Pabón M, Marco I, Molina-López R, et al. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. *Vet Parasitol* 2012; 183(3-4): 377-381. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.024>. PMID:21831525.
- Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Slapeta J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2015; 4(2): 216-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>. PMID:25973393.
- Doneley B. The physical examination. In: Doneley B. *Avian medicine and surgery in practice: companion and aviary birds*. 2nd ed. Florida: CRC Press; 2016. p. 63-70. <http://dx.doi.org/10.1201/b19656-4>.
- Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2010a.
- Dubey JP. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health* 2010b; 57(1): 60-73. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x>. PMID:19744305.
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 2012; 139(11): 1375-1424. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182012000765>. PMID:22776427.
- Dubey JP, Morales JA, Sundar N, Velmurugan GVV, Gonzalez-Barrientos CR, Hernandez-Mora G, et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. *J Parasitol* 2007; 93(3): 710-711. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-1120R.1>. PMID:17626370.
- Dubey JP, Zarnke R, Thomas NJ, Wong SK, Bonn WV, Briggs M, et al. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet Parasitol* 2003; 116(4): 275-296. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00263-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00263-2). PMID:14580799.
- El-Morsey A, El-Seify M, Desouky A, Abdel-Aziz M, El-Dakhly K, Kasem K, et al. Morphologic and molecular characteristics of *Sarcocystis atraii* n.sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) infecting the common coot (*Fulica atra*) from Egypt. *Acta Parasitol* 2015; 60(4): 691-699. <http://dx.doi.org/10.1515/ap-2015-0098>. PMID:26408592.
- Franco CD, Schnittger L, Florin-Christensen M. Sarcocystis. In: Florin-Christensen M, Schnittger L. *Parasitic protozoa of farm animals and pets*. Switzerland: Springer; 2018. p. 103-124. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_4.
- Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Marana ERM. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do Norte do Paraná, Brasil. *Cienc Rural* 2000; 30(1): 123-127. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782000000100020>.

- Gondim LSQ, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MSA, Santos SL, Mota RA, et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the northeast of Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 168(1-2): 121-124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.055>. PMID:19879051.
- Harfoush M, Tahoon A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic ducks, free-range chickens, turkeys and rabbits in Kafr El-Sheikh Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 2010; 40(2): 295-302. PMID:21246937.
- Ibrahim HM, Osman GY, Mohamed AH, Al-Selwi AGM, Nishikawa Y, Abdel-Ghaffar A. *Toxoplasma gondii*: Prevalence of natural infection in pigeons and ducks from middle and upper Egypt using serological, histopathological, and immunohistochemical diagnostic methods. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* 2018; 13: 45-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.04.002>. PMID:31014887.
- Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48(3): 452-458. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2012.244>. PMID:23208313.
- Kutkienė L, Prakas P, Sruoga A, Butkauskas D. The mallard duck (*Anas platyrhynchos*) as intermediate host for *Sarcocystis wobeseri* sp. nov. from the Barnacle goose (*Branta leucopsis*). *Parasitol Res* 2010; 107(4): 879-888. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1945-4>. PMID:20567986.
- Kutkienė L, Prakas P, Sruoga A, Butkauskas D. Description of *Sarcocystis anasi* sp. nov. and *Sarcocystis albifrons* sp. nov. in birds of the order Anseriformes. *Parasitol Res* 2012; 110(2): 1043-1046. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2588-9>. PMID:21845412.
- Locatelli-Dittrich R, Dittrich JR, Richartz RR, Gasino Joineau ME, Antunes J, Pinckney RD, et al. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. *Vet Parasitol* 2006; 135(3-4): 215-221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.010>. PMID:16289863.
- Maksimov P, Buschtöns S, Herrmann DC, Conraths FJ, Görlich K, Tenter AM, et al. Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. *Vet Parasitol* 2011; 182(2-4): 140-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.049>. PMID:21719198.
- Mancianti F, Nardoni S, Mugnaini L, Poli A. *Toxoplasma gondii* in waterfowl: the first detection of this parasite in *Anas crecca* and *Anas clypeata* from Italy. *J Parasitol* 2013; 99(3): 561-563. <http://dx.doi.org/10.1645/12-34.1>. PMID:23145510.
- Martins J, Kwok OCH, Dubey JP. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. *Vet Parasitol* 2011; 182(2-4): 349-351. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.023>. PMID:21676546.
- McGuire AM, McAllister M, Wills RA, Tranas JD. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columba livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol* 1999; 29(10): 1525-1529. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00103-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00103-4). PMID:10608438.
- Molina-López R, Cabezón O, Pabón M, Darwich L, Obón E, Lopez-Gatius F, et al. High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the Common raven (*Corvus corax*) in the Northeast of Spain. *Res Vet Sci* 2012; 93(1): 300-302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.011>. PMID:21645913.
- More G, Venturini MC, Pardini L, Unzaga JM. *Toxoplasma*. In: Florin-Christensen M, Schnittger L. *Parasitic protozoa of farm animals and pets*. Switzerland: Springer; 2018. p. 149-168. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_6.
- Murao T, Omata Y, Kano R, Murata S, Okada T, Konnai S, et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in wild waterfowl in Chukotka, Kamchatka, Russia and Hokkaido, Japan. *J Parasitol* 2008; 94(4): 830-833. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-1434.1>. PMID:18576786.
- Nunes GL. *Seroprevalência da infecção pelo T. gondii em patos de corte em feiras livres no município de Belém-PA* [tese]. Belém: Universidade do Estado do Pará; 2016.
- Otranto D, Llazari A, Testini G, Traversa D, Frangipane di Regalbano A, Badan M, et al. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet Parasitol* 2003; 118(1-2): 7-18.
- Ould-Amrouche A, Klein F, Osdoit C, Mohammed HO, Touratier A, Sanaa M, et al. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet Res* 1999; 30(5): 531-538. PMID:10543387.
- Prakas P, Butkauskas D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. *Ekologija (Liet Moksl Akad)* 2012; 58(1): 45-58. <http://dx.doi.org/10.6001/ekologija.v58i1.2349>.
- Prakas P, Oksanen A, Butkauskas D, Sruoga A, Kutkiene L, Svazas S, et al. Identification and Intraspecific Genetic Diversity of *Sarcocystis rileyi* from Ducks, *Anas* spp., in Lithuania and Finland. *J Parasitol* 2014; 100(5): 657-661. <http://dx.doi.org/10.1645/13-395.1>. PMID:24766223.
- Prestrud KW, Asbakk KA, Fugle E, Mork T, Stien A, Ropstad E, et al. Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. *Vet Parasitol* 2007; 150(1-2): 6-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.006>. PMID:17950534.
- Ribeiro MJ, Rosa MH, Bruhn FR, Garcia AM, Rocha CM, Guimarães AM. Seroepidemiology of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. among horses in the south of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25(2): 142-150. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016029>. PMID:27334814.
- Rocchigiani G, Poli A, Nardoni S, Papini R, Mancianti F. *Neospora caninum* in wild waterfowl: occurrence of parasite DNA and low antibody titers. *J Parasitol* 2017; 103(1): 142-145. <http://dx.doi.org/10.1645/16-34>. PMID:27805842.
- Rong G, Zhou H, Hou G, Zhao J, Xu T, Guan S. Seroprevalence, risk factors and genotyping of *Toxoplasma gondii* in domestic geese (*Anser domestica*) in tropical China. *Parasit Vectors* 2014; 7: 459. PMID:25274416.
- Sandström CAM, Buma AGJ, Hoyer BJ, Prop J, van der Jeugd H, Voslamber B, et al. Latitudinal variability in the seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in non-migrant and Arctic migratory geese. *Vet Parasitol* 2013; 194(1): 9-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.027>. PMID:23339847.
- Santos MCF. *Frequência da infecção por Toxoplasma gondii em galinhas caipira e frangos de corte em regiões dos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba* [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2012.
- Tenter A, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; 30(12-13): 1217-1258. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7). PMID:11113252.
- Truppel JH, Reifur L, Montiani-Ferreira F, Lange RR, Castro Vilani RG, Gennari SM, et al. *Toxoplasma gondii* in Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) antibodies and DNA detected by IFAT and PCR. *Parasitol Res* 2010; 107(1): 141-146. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1848-4>. PMID:20445992.

Verma SK, Calero-Bernal R, Cerqueira-Cézar CK, Kwok OC, Dudley M, Jiang T, et al. Toxoplasmosis in geese and detection of two new atypical *Toxoplasma gondii* strains from naturally infected Canada geese (*Branta canadensis*). *Parasitol Res* 2016; 115(5): 1767-1772. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-4914-8>. PMID:26796021.

Waap H, Vilares A, Rebelo E, Gomes E, Angelo H. Epidemiological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in urban pigeons from the area of Lisbon (Portugal). *Vet Parasitol* 2008; 157(3-4): 306-309. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.017>. PMID:18722717.

Wobeser G, Leighton FA, Cawthorn RJ. Occurrence of *Sarcocystis* Lankester, 1882, in wild geese in Saskatchewan. *Can J Zool* 1981; 59(8): 1621-1624. <http://dx.doi.org/10.1139/z81-224>.

Yan C, Yue CL, Zhang H, Yin CC, He Y, Yuan ZG, et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in the domestic goose (*Anser domestica*) in southern China. *Zoonoses Public Health* 2011; 58(4): 299-302. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01349.x>. PMID:20707861.

Yang N, Mu M, Li H, Long M, He J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered chickens, ducks, and geese in Shenyang, northeastern China. *Parasit Vectors* 2012; 5(1): 237. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-237>. PMID:23078787.

Zou Y, Nie L, Zhang N, Zou F, Zhu X, Cong W. First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in poultry meat intended for human consumption in eastern China. *Infect Genet Evol* 2017; 55: 172-174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.022>. PMID:28842355.